

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

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H. P. Zenner

Professur für Molekulare Hörphysiologie

Leiterin: Professor Dr. M. Knipper-Breer

**Einfluss eines Phosphodiesterasehemmers
auf das Verhalten und Hörvermögen von
Salizylat-traumatisierten Ratten**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin**

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

vorgelegt von

Martin Wolfgang Gubelt

**aus
Friedrichshafen
2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Knipper-Breer

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dipl.-Ing. M. Seeliger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Material und Methoden	13
2.1	Tiere und Haltung	13
2.2	Konditionierungskäfig.....	14
2.2.1	Aufbau	14
2.2.2	Funktion.....	15
2.3	Konditionierungsablauf	16
2.4	Tinnitus-Modell	18
2.4.1	Vortest mit Natrium- Salizylat	18
2.5	Phosphodiesterase-5-Inhibitor (PDE-5-Inhibitor)	19
2.6	Das PDE-5-Inhibitor-Experiment.....	20
2.6.1	Akutttest PDE-5-Inhibitor	20
2.6.2	Orale Langzeitapplikation eines PDE-5-Inhibitors	22
2.7	Datenauswertung.....	24
2.8	Hörmessung	25
2.8.1	Klick-Hörschwelle	26
2.8.2	Frequenzspezifische Hörschwelle	26
2.8.3	Bestimmung der auditorischen Hirnstammpotentiale	27
2.9	Narkose	27
2.10	Statistik	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Konditionierung	29
3.2	Test auf die Induzierbarkeit von Tinnitus	34
3.2.1	Akute Applikation eines PDE-5-Inhibitors	36
3.2.2	Hörmessungen nach dem PDE-5-Inhibitor–Akutttest	40
3.3	Orale Langzeitapplikation eines PDE-5-Inhibitors.....	43
3.3.1	Verhaltenstests.....	43
3.3.2	Hörmessungen	48
4.	Diskussion.....	57

4.1 Verhaltenstests	59
4.2 Hörmessungen	60
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	65
7. Abkürzungsverzeichnis.....	73
8. Danksagungen.....	74
9. Lebenslauf.....	75

1 Einleitung

Tinnitus ist eine subjektive Geräuschempfindung ohne einen externen akustischen Stimulus. Tinnitus wird oft als „Ohrklingeln“ oder „Ohrgeräusch“ beschrieben (Jastreboff and Sasaki, 1994). Für viele Menschen bedingt dieses Ohrgeräusch eine erhebliche Einschränkung ihrer Lebensqualität. So sind Schlafstörungen, Konzentrationsmangel und Depression nicht selten Folgen eines Tinnitus (Dobie, 2003; Moller et al., 2003).

Der genaue Pathomechanismus von Tinnitus ist nicht geklärt. In den meisten Fällen kann er jedoch mit einem akustischen Trauma in Verbindung gebracht werden (Penner und Jastreboff, 1996). Obwohl bei bestehendem Tinnitus meist eine Schädigung des Innenohres, beispielsweise durch akustische Traumata oder ototoxische Substanzen vorliegt, gibt es Anlass, die Manifestierung des Tinnitus zentralen Strukturen zuzuweisen. So schlugen Versuche kurativer Therapien fehl, bei denen eine Durchtrennung des cochleären Anteils des Hörnerven (Nervus cochlearis, Abb. 1.1, 3) Tinnitus beseitigen sollte (Wazen et al., 1997). Messungen der spontanen Feuerrate (SFR) in Hörnervenfasern am Tiermodell zeigten eine Abnahme der SFR in den Hörnervenfasern sowohl nach akustischem Trauma (Liberman und Kiang, 1978) als auch nach Applikation ototoxischer Substanzen, z.B. Salizylat (Müller et al., 2003), Quinin (Mulheran, 1999) oder Aminoglykosiden (Kiang et al., 1970). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Verminderung der SFR einer Manifestation von Tinnitus vorausgeht.

In zentralen Strukturen der Hörbahn und des Hörkortex konnte dagegen nach akustischem Trauma oder substanzinduziertem Tinnitus eine Zunahme der spontanen Feuerrate (SFR) nachgewiesen werden. So zeigt sich eine SFR-Zunahme nach akustischem Trauma im dorsalen Nucleus cochlearis (DCN) (Abb. 1.1, 4) (Kaltenbach et al., 2004), nach Salizylat-Behandlung jedoch im inferioren Colliculus (IC) (Abb. 1.1, 8) (Jastreboff und Sasaki, 1986; Chen und Jastreboff, 1995). Hingegen zeigte eine andere Studie, in der unter gleichen Bedingungen die Auswirkungen von akustischem Trauma

und systemischer Salizylat-Applikation untersucht wurde, nach akustischem Trauma eine Zunahme der SFR im IC, nach Salizylat-Gabe jedoch eine Abnahme der SFR im IC (Ma et al., 2006). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Mitbeteiligung des limbischen Systems, das eng mit der Hörbahn und dem auditorischen Cortex verschaltet ist (Wallhäusser-Franke, 1997).

Aspirin[®] kann in hohen Dosen beim Menschen Tinnitus auslösen (McFadden et al., 1984). Auch im Tiermodell führt die systemische Applikation hochdosierten Natrium-Salizylats verlässlich zu einer Verhaltensänderung, die auf die Wahrnehmung eines Tinnitusgeräusches schließen (Jastreboff und Sasaki, 1994; Rüttiger et al., 2003). Tiere werden in diesem Modell auf ein akustisches Signal konditioniert. Den Erkenntnissen klassischer Konditionierung folgend, entwickelten Jastreboff und Sasaki 1994 ein Verhaltensmodell, in dem ein durch Tinnitus erklärbares Verhalten nach Salizylatgabe erzeugt wurde. Weiterentwickelt und in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen ist das Modell von Rüttiger et al., 2003. Dieses Modell bedient sich, wie das Modell von Jastreboff, der operanten Konditionierung. Versuchstiere (weibliche Wistar-Ratten) werden darauf konditioniert, bei Wahrnehmung eines frequenzlosen Rauschens auf eine Trinkkanüle zuzugreifen. Nach Auslösen eines Tinnitus durch systemische Applikation von Natrium-Salizylat zeigen Ratten das erlernte Verhalten auch ohne dass frequenzloses Rauschen eingespielt wird.

In Analogie zu Studien von McFadden und Plattsmier, 1984 und Tunstall et al., 1995 kann im Tiermodell nach Salizylatgabe ein echter Hinweis auf Tinnitus auch an einer akut verminderten Hörschwelle sowie an verminderten otoakustischen Emissionen erkannt werden. Neben der Induktion eines Tinnitus erhöht Natrium-Salizylat auch dosisabhängig die Hörschwelle und führt zu einer Verminderung otoakustischer Emissionen (McFadden und Plattsmier, 1984), hervorgerufen durch eine verminderte Motilität der äußeren Haarzellen im Innenohr (Tunstall et al., 1995). Die dadurch fehlende Schallverstärkung erklärt den messbaren Hörverlust und die verminderten otoakustischen Emissionen.

Neben Hörverlust und Tinnitus finden sich nach systemischer Salizylat-Gabe auch auf molekularer Ebene Veränderungen im auditorischen System. Als molekularen Marker für plastische Veränderung, bzw. Veränderungen der neuronalen Aktivität, lassen sich aktivitätsabhängige Gene nachweisen, wie beispielsweise c-Fos. C-Fos wird nach anhaltender Erregung, vor allem durch neuartige Reize, im Zellkern von Nerven- und anderen Zellen gebildet und zeigt plastische Veränderung der Zellen als Reaktion auf neue Reizmuster an (Hughes und Dragunow, 1995). Immunhistochemische Untersuchungen im auditorischen System ergaben nach Salizylat-Applikation eine vermehrte c-Fos-Expression, u.a. im auditorischen Kortex (AC) (Abb. 1.1, 10) und im medialen Corpus Geniculatum (MGB) (Abb. 1.1, 9) (Ehret und Fischer, 1991; Friauf, 1992, Wallhäusser-Franke, 1997). Die Expression aktionsabhängiger Gene könnte daher Hinweis auf die Pathophysiologie des Salicylat-induzierten Tinnitus geben.

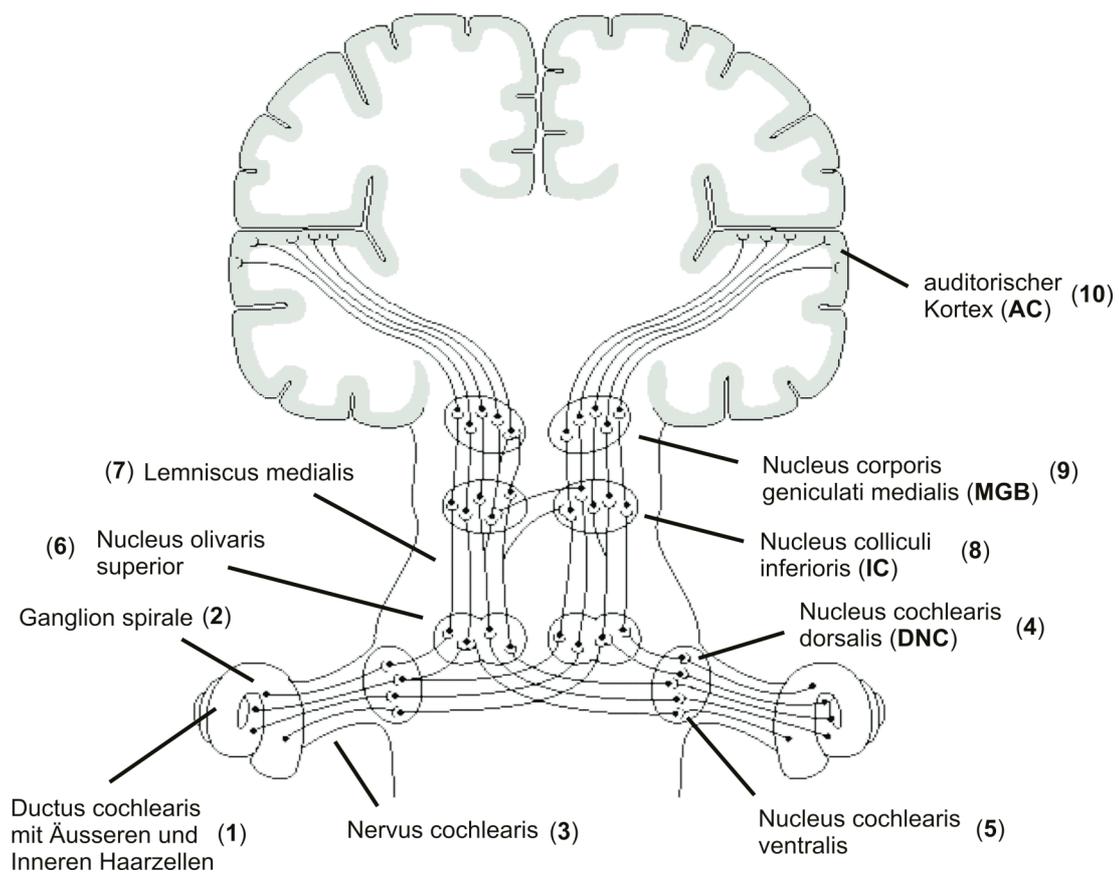


Abb. 1.1: Die Hörbahn

Über das Außen- und Mittelohr ins Innenohr geleitete Schallwellen werden auf die Endolymphe des Ductus cochlearis übertragen. Hier sitzen die Sinneszellen des auditorischen Systems, die inneren Haarzellen. Mechanische Reizung der äußeren Haarzellen regt diese zu einer Motilitätszunahme an, die zu einer Schallverstärkung und schließlich zu einer Erregung der inneren Haarzellen führt. Die Erregung der inneren Haarzellen wird synaptisch auf Dendriten bipolarer Nervenzellen des Ganglion spirale (2) übertragen, deren Axone den Nervus cochlearis (3) bilden und mit ihren Fortsätzen im Nucleus cochlearis dorsalis (4) und Nucleus cochlearis ventralis (5) enden. Hier kreuzen Nervenfasern zur Gegenseite und erregen kontra- und ipsilateral Neuronen im Nucleus olivaris superior (6). Über den Lemniscus medialis (7) gelangt die Erregung zu den Colliculi inferiores (8). Letzte Umschaltstation vor Erreichen des primären auditorischen Kortex (10) sind die Nuclei corporis geniculati medialis (9). Der primäre auditorische Kortex (Area 41 nach Brodman) unterliegt einer tonotopen Organisation, d.h., dass entsprechende Abschnitte der Cochlea in umschriebenen Kerngebieten des primären Hörkortex repräsentiert sind (modifiziert nach: Risto Ilmoniemi Bio Mag-laboratorio).

Für Tinnitus, meist nach Knalltrauma, aber auch mit psychischer oder kieferorthopädischer Ursache, gibt es bislang keine absolut wirksame kausale Therapie. Aktuell gelten Infusionstherapien mit Plasmaexpandern,

Glukokortikoiden, Procaintherapie, sowie psychosomatische Therapien und Retraining Therapien als Behandlungsstandard bei den verschiedenen Tinnitusformen (Leitlinien der Dt. Ges. f. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, AWMF, 2004). All diese Therapien konnten bislang aber keinen durchschlagenden Erfolg aufweisen und Studien zeigen, dass diese Therapien kaum Überlegenheit gegenüber Placebos haben (Lockwood et al., 2002).

Im Hörorgan wird seit Dekaden die Funktion einer NO/cGMP-Signalkaskade für die normale Hörfähigkeit vermutet. cGMP wird durch eine lösliche Guanylyl-Cyclase (sGC) aus Guanidin-Triphosphat gebildet. Primärligand zur Bildung von cGMP ist Stickstoffmonoxid (NO), ein einfaches diatomisches Gas. Seine geringe molare Masse (30.01 g/mol) und seine chemischen Eigenschaften bedingen seine Funktion im biologischen Organismus. Über Diffusion erreicht das unpolare lipophile Molekül verschiedene Zellen und Zellkompartimente und ist somit inter- und intrazellulärer Botenstoff. Nach wenigen Sekunden wird das Radikal durch verschiedene Redox- und Radikalfängersysteme zu inaktiven Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen oxidiert (Moncada et al., 1991; Moncada, 1992). NO wird in einer ATP-abhängigen Reaktion aus dem terminalen Guanidinstickstoff des L-Arginin und freiem Sauerstoff durch eine Stickoxidsynthase (NOS) synthetisiert (Abb. 1.2 A). Hierbei entstehen NO und Citrullin (Ignarro, 1999; Loscalzo und Welch, 1995). Derzeit werden drei verschiedene Stickoxidsynthasen unterschieden. Zum einen zwei konstitutiv exprimierte NOS (NOS I+III), die beide mit einem kalziumabhängigen Calmodulin-Komplex assoziiert sind. Aktivierung des Calmodulins durch Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) (Abb. 1.2, 1) überführt die NOS in ihre aktive Form (Abb. 1.2, 2). Die NOS I wird vor allem in neuronalen, die NOS III überwiegend in epithelialen Geweben exprimiert. Eine weitere Form der NOS, die NOS II, kommt vor allem in Makrophagen vor und wird beispielsweise durch Kontakt mit bakteriellen Lipopolysacchariden und mechanischer Reizung induziert (Hess et al., 1999; Takumida et al., 2000). Auch in der Cochlea und in zentralen Strukturen des auditorischen Systems wurden NOS und lösliche Guanylyl-Cyclase (sGC)

(Abb. 1.2, 3) in inneren , und äußeren Haarzellen, Stützzellen, dem Spiralganglion, Afferenzen und Efferenzen nachgewiesen (Fessenden und Schacht, 1998; Shen et al. 2005; Reuss und Riemann, 1999; Michel et al., 1999; Fessenden et al., 1999; Heinrich et al., 2004). Sowohl in äußeren als auch in inneren Haarzellen sowie in den Stützzellen des Cortischen Organs kommt es zu einer Co-Expression der beiden NOS-Isoformen NOS I und NOS III, wobei meist eine höhere NOS-III-Expression nachgewiesen werden konnte (Franz et al., 1996; Hess et al., 1998; Heinrich et al., 2004)

Durch Aktivierung der löslichen Guanyl-Zyklase (sGC) (Abb. 1.2, 3) induziert NO die Bildung von cGMP (Abb. 1.2, 4). cGMP wiederum stimuliert die Phosphorylierung verschiedener Proteinkinasen (PK), vor allem der Proteinkinase-G-I/II (PKG-I/II) (Abb. 1.2, 5), und wird über eine Phosphodiesterase (PDE) (Abb. 1.2, 6) wieder abgebaut. Hieraus folgen eine Vielzahl verschiedener und teils nur bedingt bekannter Regulationsmechanismen. Gut verstanden ist die Einflussnahme des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweges auf die intrazelluläre Kalzium-Homöostase durch Regulation von Kalziumkanälen (Clementi, 1998), die u.a. für den Tonus glatter Muskulatur eine entscheidende Rolle spielt (Ignarro, 2002).

Im zentralen Nervensystem (ZNS) konnten weitere Funktionen des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweges nachgewiesen werden. Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-R) (Abb. 1.2, B) und der so bedingte Kalzium-Einstrom in Nervenzellen führen über Kalzium-Calmodulin-Komplexe (Abb. 1.2, 1) zur Aktivierung des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalwegs (Shin und Linden, 2005). Dieser Mechanismus nimmt eine zentrale Rolle bei NO-vermittelten Funktionen im ZNS, beispielsweise bei Lern- und Gedächtnisvorgängen (Long-Term-Potentiation) und Neurotransmission ein (Abb. 1.2, C). Neben Einflüssen auf die Kalzium-Homöostase moduliert NO auch die Expression von Immediate Early Gens (IEG) (Haby et al., 1994, Ciani et al., 2002) zu denen u.a. auch c-Fos gehört und vermittelt so seinen Einfluss auf die neuronale Plastizität (Hopper und Garthwaite, 2006; Deora et al., 1998). Weiterhin scheinen NO-vermittelte Funktionen eine neuro- oder zytoprotektive Wirkung zu haben (Abb. 1.2, D) (Ciani et al. 2002, Dawson et

al., 1993). Die genaue Rolle der NO-vermittelten Wirkung im Innenohr ist noch unklar. Es gibt Hinweise auf einen möglicherweise protektiven Einfluss des NO, das seine Wirkung, wie schon in Muskel- und Nervenzellen gezeigt (Clementi, 1998; Ignarro, 2002; Shin und Linden, 2005), über eine Regulation der Ca^{2+} -Homöostase entfaltet. So konnten Heinrich et al., 2005 eine verstärkte Expression der NOS III im Innenohr nach akustischem Trauma feststellen, nachdem Heinrich et al., 2004 bereits ein „NO-Sicherungs-System“ im Cortischen Organ postuliert hatten und so dem NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweg eine protektive Rolle zuschrieben. Darüber hinaus zeigen verschiedene Studien die den Ca^{2+} -Einfluss auf NOS in Haarzellen in vitro untersuchen (Shen et al., 2005, Shen et al., 2006) ebenfalls eine mögliche protektive Funktion des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalwegs.

Ziel dieser Arbeit war es nun über eine Modulation von cGMP zu prüfen, ob der NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweg ein Salizylatrauma bei Ratten positiv beeinflusst. So wurde für diese Arbeit folgende Hypothese aufgestellt: Wenn traumatische Einflüsse zu einer gesteigerten NOS-Aktivierung führen und somit den NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweg induzieren, sollte eine pharmakologisch erzeugte Anhebung der cGMP-Konzentration über eine Manipulation der nachweislich in der Cochlea exprimierten PDE (Abb. 1.2, 6) den pathophysiologischen Phänotyp abschwächen.

Um diese These zu prüfen, wurden Ratten im Verhaltensmodell operant konditioniert und mit Salizylat traumatisiert, um Tinnitus zu induzieren. Über die Applikation eines s (Abb. 1.2, 7) sollte der Abbau von cGMP durch die PDE-5 (Abb. 1.2, 6) vermindert werden. So wird die Konzentration von cGMP erhöht und damit der gesamte NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweg verstärkt.

Die Arbeit umfasste zwei Testphasen: In der ersten Phase wurden Tinnitus und Hörverlust der Ratten nach einer akuten, posttraumatischen Applikation des PDE-5-Inhibitors geprüft. In einer zweiten Testphase wurde den Ratten der PDE-5-Inhibitor über einen Zeitraum von mehreren Tagen zugeführt und die Wirkung auf das Salizylatrauma über einen Zeitraum von drei Wochen getestet.

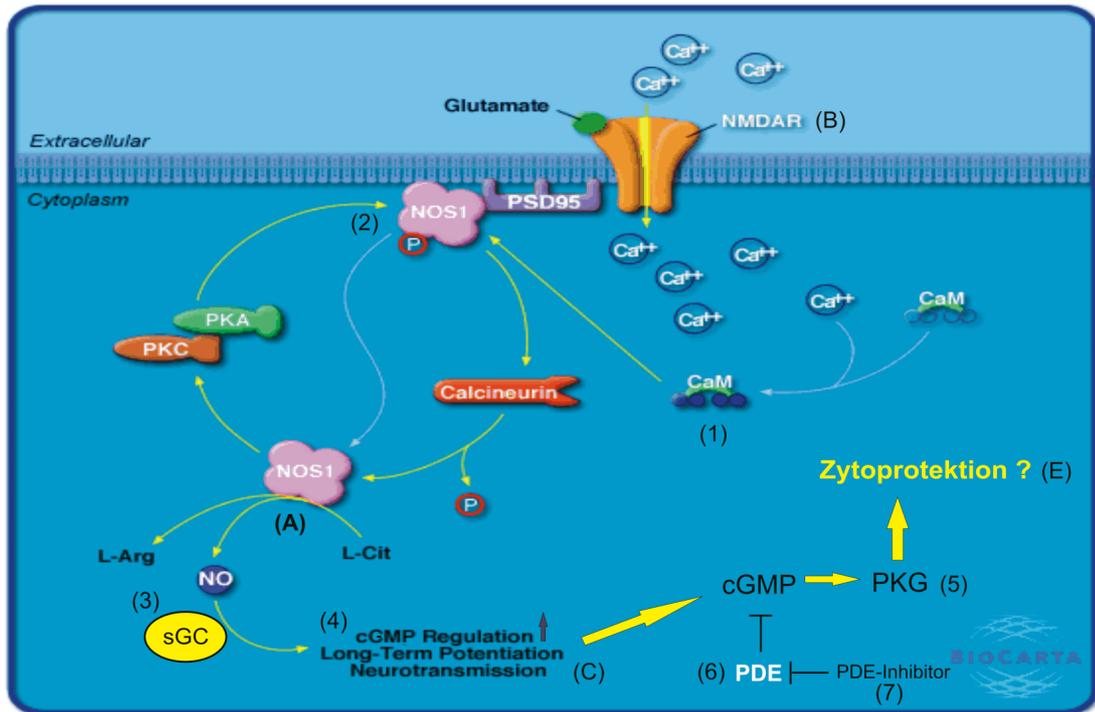


Abbildung 1.2: NO/cGMP/PKG-I/II-Pfad

Nach Überführung von Calmodulin in seine aktivierte Form durch Ca²⁺-Ionen induziert dieser Komplex (1) die NO-Synthese durch Aktivierung einer Stickoxid-Synthase (NOS) (2). NO seinerseits führt über Induktion der löslichen Guanulyl-Cyclase (sGC) (3) zu einer Hochregulation von cGMP (4). Dieser Pfad wird mit der Aktivierung von Proteinkinasen (PK), insbesondere der Proteinkinase-G-I/II(PKG) (5), fortgesetzt und erreicht verschiedene Zielstrukturen, die u.a. eine Zytoprotektion bewirken könnten (E). Abgebaut wird cGMP durch eine Phosphodiesterase (PDE) (6), dieser Prozess kann durch Hemmung der PDE mit einem PDE-5-Inhibitor (7) beeinflusst werden, woraus eine verstärkte cGMP-Wirkung resultiert (modifiziert nach: www.biocarta.com/pathfiles/h_nos1Pathway.asp).

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltung

Für den Versuch wurden 20 weibliche Albino-Ratten (Wistar, Eigenzucht) ausgewählt, je zehn stammten aus dem gleichen Wurf und waren zu Beginn der Konditionierung 13 bzw. 10 Wochen alt. Die Ratten wurden zu fünft in einem Käfig (Typ IV Hochhaltungskäfig) gehalten und konnten nach Belieben fressen (Futter für Versuchstiere, Prodimi Kliba SA, Kaiseraugst, CH-4303) und trinken (Leitungswasser). Lediglich in der Nacht vor einem Konditionierungstraining oder einem Verhaltenstest wurden sie Wasser- und Futter-depriviert (12h vor Konditionierungstraining/Verhaltenstest kein Wasser und 3 Pallets (10g) pro Tier), um eine Motivationssteigerung zu erreichen. Folgten ein oder mehrere Tage mit Versuchen bzw. Konditionierung aufeinander, wurde den Tieren mindestens 1 Stunde am Tag Wasser und Futter frei zur Verfügung gestellt. Das durchschnittliche Gewicht der Ratten lag zu Beginn bei 240g, wobei die jüngeren Tiere etwa 210g wogen, die älteren etwa 270g. Das Gewicht wurde vor jeder Konditionierungssitzung und jedem Verhaltenstest mit einer Laborwaage (Viper SW 3, Mettler Toledo) kontrolliert.

2.2 Konditionierungskäfig

Die Konditionierung und die Verhaltenstests wurden alle in einem Konditionierungskäfig, im Folgenden „Skinnerbox“ genannt, durchgeführt. Die Skinnerbox basiert auf der Grundaufbau der Firma TSE (Konditionierungskäfig Ratte, 30 x 30 cm) und wurde für den Versuch zusätzlich mit Lautsprechern, Lichtern, einem metallenen Bodengitter, einer Kunststoffplattform als Ruheplattform, einer Trennwand und zwei Zuckerwasserspendern ausgestattet (Abbildung 2.1).

2.2.1 Aufbau

Die Skinnerboxen standen in einer schallisolierten Kammer (typische Abschwächung 40dB). Der Grundriss der Box wurde durch eine Kunststofftrennwand in zwei gleichgroße Korridore geteilt. Das Bodengitter und die Kanten der Trennwand konnten zur Applikation schwacher elektrischer Schocks unter Strom gesetzt werden; an einer Seite der Kammer befand sich eine Ruheplattform, auf der die Ratte vor elektrischen Schocks geschützt war. Ein Mikrosensor unter der Plattform registrierte, wenn die Ratte sich auf der Plattform befand. Gegenüber der Ruheplattform befanden sich zwei Erker, in denen jeweils eine Trinkkanüle und eine Lichtschranke installiert waren. Das Unterbrechen der Lichtschranke wurde computergestützt registriert und öffnete unter Belohnungsbedingungen (s. 2.3) ein Magnetventil (magnetic shutters, neoLab 3-1167) für 0.5 Sekunden, wodurch ein Tropfen Zuckerwasser (3%ige Saccharoselösung) aus der Kanüle abgegeben wurde. Feinreguliert wurde die Tropfengröße über einen Durchflussminderer. Über einen Lautsprecher (Beyerdynamik DT 911) konnte die Kammer beschallt werden. Schallereignisse wurden über eine digital-analoge Soundkarte (PCI-MIO-16 E, National Instruments, USA)

generiert. Gegenüber den Trinkkanülen waren zwei Leuchtquellen angebracht. Über eine Kamera (Dexxa WebCam, USB) im Deckel der Box konnte das Verhalten der Tiere auf einem externen Monitor beobachtet werden.

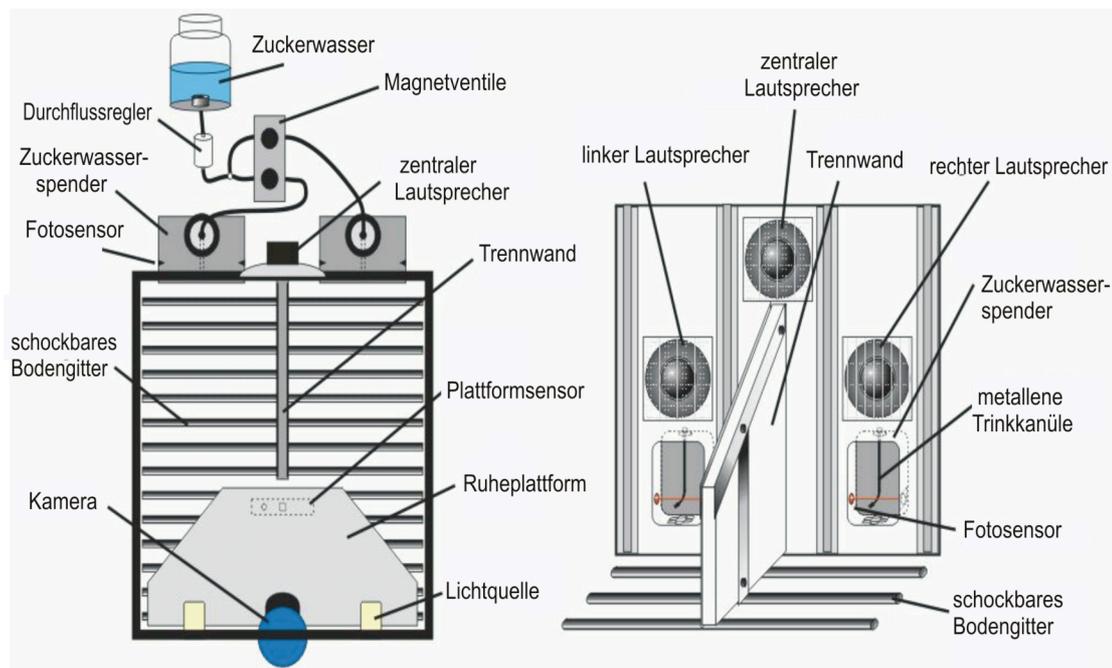


Abbildung 2.1: Gezeigt ist der schematische Aufbau der verwendeten Skinnerbox.

Durch Zugriffe während der Tonphase auf die metallenen Trinkkanülen der Zuckerwasserspender konnten sich die Versuchstiere „belohnen“. Jeder Zugriff wurde von einem Fotosensor registriert und computergestützt aufgezeichnet. Das metallene, schockbare Bodengitter diente der Lernverstärkung bei „falschen“ Zugriffen, d.h. Zugriffen während der Stillephasen. Über eine USB-Kamera wurden Training und Versuch auf einen Monitor außerhalb des Versuchsraumes übertragen.

2.2.2 Funktion

Ziel der Konditionierung war es, die Ratten auf ein Schallereignis (breitbandiges Rauschen) zu prägen. So wurde den Ratten die Möglichkeit gegeben, bei einem Schallereignis durch Unterbrechen der Lichtschranke

einen Zuckerwassertropfen als Belohnung zu bekommen. Durchbrach die Ratte die Lichtschranke dagegen in einer Stillephase, folgte ein elektrischer Schock, appliziert über das Bodengitter, als Bestrafung („footshock“). Die Stromstärke betrug in der Regel minimal 0.1 mA und konnte in 0.1 mA-Schritten bis maximal 0.5 mA gesteigert werden. Zugriffe, Belohnungen und Bestrafungen wurden in einem digitalen Protokoll computergestützt aufgezeichnet.

2.3 Konditionierungsablauf

Um das Ziel der Ton/Stille-Unterscheidung zu erreichen, wurden die Ratten über einen Zeitraum von 14 Wochen darauf konditioniert, ein frequenzloses Bandrauschen von Stille zu unterscheiden. Pro Woche wurde zwischen drei und fünf Mal konditioniert. Die Konditionierung basierte auf zahlreichen Erfahrungen und einer etablierten Trainingsmethode von Rüttiger et al (Rüttiger et al., Hearing Research 2003).

Um den Versuchsbedingungen gerecht zu werden, erfolgte ein mehrstufiges Konditionierungsprogramm, in dem die Ratten sukzessiv mit neuen, höheren Anforderungen umgehen mussten. Begonnen wurde mit einem Konditionierungstraining ohne Bestrafung durch elektrische Schläge. Hier sollten die Tiere zuerst lernen, dass bei Zugriff auf die Kanüle während einer Tonphase eine Belohnung folgt. Im weiteren Verlauf wurde dann nicht mehr jeder Zugriff belohnt bzw. nur noch belohnt, wenn die Ratte abwechselnd auf die Trinkkanülen zugriff. Ein solches Konditionierungstraining dauerte zwischen 20 und 30 Minuten und begann beispielsweise mit einer Tonphase (70 dB SPL) von 120 Sekunden und wechselte danach zu einer Stillephase von 60 Sekunden. Die Dauer der verschiedenen Phasen wurde nach den ersten „Trainingseinheiten“ verändert (z.B. 120 Sekunden Tonphase und 120 Sekunden Stillephase) und später auch variabel gestaltet (per Computer

eingestellt auf z.B. 60 +/- 20 Sekunden Tonphase, 60 +/- 20 Sekunden Stillephase). So sollte gewährleistet werden, dass die Ratten kein „Zeitgefühl“ entwickeln, sondern strikt nach „Ton“ oder „Stille“ ihre Entscheidung für oder gegen einen Zugriff auf die Kanüle treffen.

Nach dem sechsten Konditionierungstraining wurde zusätzlich eine Bestrafung in Form leichter elektrischer Schocks bei Zugriff auf die Kanülen während der Stillephase eingeführt. Der applizierte elektrische Schock war anfangs schwach (0.1-0.2 mA) und wurde bei jedem fehlerhaften Zugriff ausgelöst. Im Verlauf der Konditionierung wurde der Schock randomisiert (z.B.: durchschnittlich nur jeder vierte Fehler wird bestraft) dafür aber deutlich stärker in der Intensität (0.4-0.5 mA).

Eine weitere Modifizierung bestand darin, die Lautstärken während der Tonphase zu variieren. So wurden die Ratten beispielsweise während 120 Sekunden Tonphase 40 Sekunden mit 70 dB SPL, die folgenden 40 Sekunden mit 50 dB SPL und die letzten 40 Sekunden nur noch mit 20 dB SPL beschallt. Auch hier wurden viele unterschiedliche Konstellationen eingesetzt (z.B. 70-40-70-20 dB SPL oder 40-20-70 dB SPL während einer Tonphase). So sollte gewährleistet werden, dass die Ratten auch bei der Wahrnehmung leiser Ohrgeräusche noch auf die Kanülen zugreifen.

Um der Versuchssituation, in der es über einen längeren Zeitraum keine Belohnung gibt, gerecht zu werden und die Motivation der Ratten aufrecht zu erhalten, immer weiter auf die Kanülen zuzugreifen, wurde in mehreren sechzigminütigen Konditionierungstrainings nur sehr vereinzelt eine Belohnung auf einen Zugriff gewährt.

2.4 Tinnitus-Modell

Dem gesamten Versuch zugrunde liegt die Erkenntnis, dass Salizylat auch in niedrigen Dosen im Verhaltensmodell ein durch Tinnitus bedingtes Verhalten erwirkt werden kann (Jos J. Eggermont und Larry E. Roberts, *Neurosciences* No 11, November 2004). Der Aufbau des Modells und die applizierten Mengen von Natrium-Salizylat und Saline orientieren sich an Rüttiger et al., 2003.

2.4.1 Vortest mit Natrium- Salizylat

Nachdem die Ratten 14 Wochen lang darauf konditioniert worden waren breitbandiges Rauschen von Stille zu unterscheiden, sollte der Konditionierungserfolg durch reversible Induktion von Tinnitus durch Natrium-Salizylat im Versuch überprüft werden. Mit diesem Experiment sollte zum einen gezeigt werden, dass die Tiere gelernt haben, Rauschen von Stille zu unterscheiden, zum anderen, dass sich die applizierte Dosis Natrium-Salizylat eignet, um eine durch Tinnitus erklärbare Verhaltensänderung hervorzurufen.

Dazu wurden die Ratten in zwei Gruppen à zehn Tiere geteilt und mit 350 mg/kg Körpergewicht (KG) Natrium-Salizylat (Sodium-Salicylate, Minimum 99.5%, Firma: Sigma) intraperitoneal appliziert. Dazu wurde Natrium-Salizylat in Injektionswasser (Ampuwa, Fresenius, Deutschland) gelöst (70mg Natrium-Salizylat/ml Injektionswasser). Die Kontrollgruppe wurde mit 2 ml Saline (Natrium-Chlorid-Lösung, 0,9%, Fresenius, Deutschland), intraperitoneal (i.p.) appliziert, behandelt. Drei Stunden nach der Applikation wurde der Verhaltenstest gestartet, da hier das Maximum des Natrium-Salizylat-induzierten Tinnitus zu erwarten ist (Chen und Jastreboff, 1995;

Eggermont und Kenmochi, 1998). In den ersten 180 Sekunden glich der Versuch einem Konditionierungstraining bei dem jeder Zugriff auf die Trinkkanüle belohnt wurde, allerdings ohne Bestrafung bei einem Zugriff während der Stilleperiode. Alle 60 Sekunden wurde zwischen Ton- und Stillephase gewechselt. Nach 180 Sekunden wurde dann in den Versuchsmodus umgeschaltet in dem nur noch selten Belohnungen (alle 120 Sekunden) gegeben wurden. Mindestens 20 Minuten musste ein solcher Verhaltenstest andauern, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Nach zwei Tagen wurde das Experiment mit umgekehrter Behandlung wiederholt. Ratten, die zuvor mit Natrium-Salizylat behandelt wurden, bekamen nun Saline, die Kontrollgruppe bekam nun entsprechend Natrium-Salizylat. Dieser Verhaltenstest wurde in einen Zeitraum von 14 Tagen zweimal durchgeführt.

2.5 Phosphodiesterase-5-Inhibitor (PDE-5-Inhibitor)

Für diesen Versuch wurde ein selektiver Phosphodiesterase-5-Inhibitor (PDE-5-Inhibitor) ausgewählt, den man für diesen Versuch in Injektionswasser löste. Als Lösungsansatz wurden 5 mg PDE-5-Inhibitor pro 1 ml Injektionswasser gewählt. Die zu applizierende Menge PDE-5-Inhibitor für eine Ratte betrug 3 mg/kg KG, woraus sich 1,2 ml/kg KG i.p. applizierte Lösung ergaben. Die Kontrollgruppe bekam stattdessen 0,5 ml Saline/Tier i.p. injiziert. Drei Stunden vor dem Verhaltenstest wurde zehn Ratten Natrium-Salizylat (350mg/kg KG) und zehn Ratten Saline (2 ml) i.p. injiziert.

2.6 Das PDE-5-Inhibitor-Experiment

Mit diesem Experiment sollte ein möglicher Einfluss eines PDE-5-Inhibitors auf den Natrium-Salizylat-induzierten Tinnitus überprüft werden. In zwei unterschiedlichen Versuchen wurde ein möglicher Effekt geprüft. Im ersten Teil des Versuchs (Akuttest) erfolgte die einmalige Gabe des PDE-5-Inhibitors, 2.5 Stunden nach der Applikation von Natrium-Salizylat. Hierbei ging es um die Frage eines möglichen akuten Einflusses auf den Tinnitus. Der zweite Teil des Versuchs (orale Langzeitapplikation) stand unter der Fragestellung eines möglichen Einflusses des PDE-5-Inhibitors auf die Remission des mit Natrium-Salizylat induzierten Tinnitus. Dazu wurde der PDE-5-Inhibitor über einen Zeitraum von 5 Tagen kontinuierlich appliziert.

2.6.1 Akut-Test mit dem PDE-5-Inhibitor

Die Fragestellung, die diesem Versuch zugrunde lag, war, ob der PDE-5-Inhibitor schon einmalig, kurz nach dem Salizylatrauma appliziert, einen Einfluss auf das Verhalten von Ratten mit Natrium-Salizylat induziertem Tinnitus bzw. auf die mit Saline behandelten Kontrolltiere hat. Dazu wurden die Ratten in vier Gruppen eingeteilt und in vier Einzelversuchen im Zeitraum von drei Wochen behandelt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Aufteilung der Versuchsgruppen für die intraperitoneale Applikation des PDE-5-Inhibitor

	Block I	Block II	Block III	Block IV
Gruppe A	SCY / PDE-5-I	Sal / PDE-5-I	SCY / Sal	Sal/ Sal
Gruppe B	Sal/ Sal	SCY / PDE-5-I	Sal / PDE-5-I	SCY / Sal
Gruppe C	SCY / Sal	Sal/ Sal	SCY / PDE-5-I	Sal / PDE-5-I
Gruppe D	Sal / PDE-5-I	SCY / Sal	Sal/ Sal	SCY / PDE-5-I

Legende: PDE-5-I = PDE-5-Inhibitor i.p.

Sal = Saline i.p.

SCY = Salicylat i.p.

Drei Stunden vor dem Verhaltenstest wurde zehn Ratten Natrium-Salizylat (350mg/kg KG; gelöst in Injektionswasser (Fresenius, Deutschland), zwischen 1.5 ml und 2.1 ml Injektionsvolumen) und zehn Ratten Saline (2 ml) i.p. injiziert. 30 Minuten vor dem Verhaltenstest bekamen dann zehn Ratten (fünf mit Na-Salizylat und fünf mit Saline behandelt) i.p. einen appliziert, den anderen zehn Ratten (wieder fünf mit Natrium-Salizylat und fünf mit Saline) wurden 0.5 ml Saline als Kontrollsubstanz injiziert.

Der nun folgende Verhaltenstest lief nach dem gleichen Schema ab, wie im „Vortest mit Natrium-Salizylat“ (2.4.1) bereits beschrieben. Dieser Akuttest wurde in insgesamt vier Versuchsblöcken (Tabelle 2.1) durchgeführt, die insgesamt 20 Tage umfassten. Jede Ratte hatte am Ende jede der vier möglichen Behandlungen erfahren (Abb. 2.2). Am jeweils ersten Tag eines Versuchsblocks wurde der Verhaltenstest durchgeführt. Darauf folgten vier Tage, in denen sich die Ratten erholen konnten und noch einmal konditioniert wurden, um Ergebnisveränderungen durch Verlernen vorzubeugen.

2.6.2 Orale Langzeitapplikation eines PDE-5-Inhibitor

Mit diesem Versuchsteil sollte eine mögliche Wirkung eines PDE-5-Inhibitor auf das Verhalten von Ratten mit Natrium-Salizylat-induziertem Tinnitus und Ratten mit Saline-Behandlung bei einer konstanten, diesmal oralen Gabe eines s (10 mg/kg KG) über einen Zeitraum von fünf Tagen überprüft werden. Der wurde in einem Gemisch aus Solutol (gelartige Trägersubstanz, Bayer), Injektionswasser und Zucker gelöst (Tabelle 2.2). Der PDE-5-Inhibitor, in Solutol gelöst, wird im Folgenden nur noch PDE-5-Inhibitor genannt und Saline in Solutol gelöst im Folgenden nur noch Saline.

Tabelle 2.2: Ansatz für die orale Applikationslösung des s

Lösungsansatz für den PDE-5 Inhibitor, oral appliziert	
Ein Milliliter enthält:	5 mg
	0.8 ml Injektionswasser
	0.2 ml Solutol
	0.3 g Zucker

Eine Einwegspritze mit einem modifizierten Aufsatz wurde zur Applikation benützt. Als Spritzenaufsatz wurde eine Einwegkanüle (Durchmesser 0,5 mm, BD Microlance) per Hand abgeschliffen und mit einem kurzen Silikonschlauch überzogen. Den Ratten konnten so peroral die entsprechenden Lösungen in den Rachen vor den Ösophagus auf den Zungengrund appliziert werden.

Es wurden wieder zwei Gruppen mit je zehn Tieren gebildet. Der Versuch bestand aus zwei Blöcken à einer Woche in denen die Behandlungen und die Verhaltenstests durchgeführt wurden. Zwischen diesen beiden Wochen lagen 14 Tage, in denen sich die Tiere erholen konnten und noch einmal nachkonditioniert wurden. Drei Wochen nach dem zweiten Verhaltenstest wurde ein letzter Verhaltenstest –„Langzeittest“ (Tabelle 2.3)- durchgeführt, um mögliche Langzeitauswirkungen des s zu erfassen. Hier schloss sich eine

weitere Woche mit - und Saline-Applikation an, in der noch fehlende Hörmessungen durchgeführt wurden. Dazu wählte man zwei Gruppen à sechs Tiere.

Tabelle 2.3: Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen des oralen Langzeittests

Woche	1	2+3	4	5+6+7	8
Versuchsteil	Block I	Erholung und Konditionierung	Block II	Erholung und Ende Woche 7 Langzeittest	Applikation für Hörmessungen

Die Applikation von bzw. Saline begann morgens am Tag 1 eines Versuchsblocks und wurde zweimal täglich (morgens und abends) fünf Tage lang weitergeführt. Am Nachmittag des ersten Tages wurde der erste Verhaltenstest (Vortest, ohne vorherige Natrium-Salizylat-Applikation) durchgeführt. Dieser Test konnte so Auskunft darüber geben, ob der PDE-5-Inhibitor per se einen Effekt auf Verhalten und Hörmessungen hat. Am Abend des ersten Tages begann dann die Natrium-Salizylat-Applikation (250mg/kg KG) und wurde bis zum Morgen des dritten Tages vier Mal wiederholt. Vom dritten bis zum fünften Tag wurden nachmittags die Verhaltenstests durchgeführt (Tabelle 2.4). An jeden Verhaltenstest schlossen sich bei sechs Ratten noch Hörmessungen an.

Tab. 2.4: Schematischer Ablauf eines Versuchsblocks im oralen Langzeittest

	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Morgens	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I Saline oral
		SCY/Saline i.p.	SCY/Saline i.p.		
Mittags	Vortest	Kein Veraltentest	"Nach 8 Std." Hörmessungen	"Nach 30 Std." Hörmessungen	"Nach 50 Std." Hörmessungen
Abends	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	
	SCY/Saline i.p.	SCY/Saline i.p.			

Legende: PDE-5-I = , oral
SCY = Natrium-Salizylat, i.p.

2.7 Datenauswertung

Um das Verhalten zu quantifizieren, wurde die Zahl der Zugriffe auf die Belohnungsquellen, erfasst durch die Unterbrechung der Lichtschranke pro Minute, herangezogen. Als Maß für den Konditionierungserfolg wurde eine Zugriffsrate der Ratten während der Stilleperiode berechnet. Zur leichteren Unterscheidung der Begriffe Zugriffshäufigkeit und Zugriffsrate bei Stille wurde die Zugriffsrate bei Stille als Tinnitusindex definiert. Der Tinnitusindex beschreibt das Verhalten der Tiere während der Stilleperiode und ist nicht gleichzusetzen mit einer subjektiven Geräuschwahrnehmung. Während der Konditionierungsphase und den Kontrollversuchen wird bei den Versuchstieren medikamentös kein Tinnitus induziert.

Trotzdem gibt es hier Zugriffe auf die Trinkkanülen während der Stilleperioden. Eine Aussage über Tinnitus gibt nur der direkte Vergleich von Versuchs- und Kontrollgruppe im Experiment.

Der Tinnitusindex wird nach der folgenden Formel definiert:

$$\text{Tinnitusindex: } \frac{\text{Zugriffe bei Stille (pro Minute)/Dauer der Stille}}{\text{Zugriffe bei Geräusch (pro Minute)/Dauer des Geräusch}}$$

Nach Abschluss der Konditionierung musste der Tinnitusindex als Ausdruck des Konditionierungserfolges kleiner als 0.1 sein, und, um im Experiment zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ausreichend große Unterschiede zu erreichen, sowie dem Experiment die nötige Aussagekraft zu geben. Erst wenn der Tinnitusindex 0.1 wiederholt unterschritten wurde, konnte ein Tier in die Versuchsreihen aufgenommen.

2.8 Hörmessung

Im Anschluss an einen Verhaltenstest wurde an einer Gruppe von jeweils 6 Versuchs- und Kontrolltieren das Hörvermögen bestimmt, um den Hörverlust durch Natrium-Salizylat und die mögliche Wirkung des s objektiv zu quantifizieren (Hörmesskammer, IAC 400 Industrial Acoustic Company, Niederkrüchten Germany und ein zusammengesetzter elektrophysiologischer Aufbau mit einer Multi IO Karte E-6052, National Instruments, Austin, TX).

Die Hörschwelle wurde durch BERA-Messungen bestimmt (brain stem evoked response audiometry). Hierbei werden über externe Elektroden die auditorisch evozierten Hirnstammpotentiale erfasst. Dazu wurden am narkotisierten Tier drei Silberdrahtelektroden (Durchmesser: 0.25 mm,

Goodfellow, England) subdermal mit Hilfe einer Einwegkanüle angebracht. Direkt hinter dem zu messenden Ohr wurde die Signalelektrode platziert, die Referenzelektrode über der Stirn und die Erdungselektrode am Rücken des Tieres. Die gesamte Hörmessung dauerte etwa 45 Minuten.

2.8.1 Klick-Hörschwelle

Die Ratten wurden mit Klickreizen der Lautstärke 20-210 dB SPL beschallt (Beyerdynamik DT 911). Die Lautstärke erhöhte sich in 5 dB SPL Schritten. Die Signale wurden jedem Ohr mit 64-256 Wiederholungen präsentiert. Die Klick-Reize hatten eine Länge von 0.1 ms, die Aufnahmezeit des Hirnstammpotentials betrug 10 ms und die Aufnahmeintervalle 14 ms. Zur Kontrolle der Schallreize wurde direkt neben der Ohrmuschel der Ratten ein Mikrofon (Brüel & Kjaer, Typ 2670, 3.51 mV/pa) aufgestellt.

2.8.2 Frequenzspezifische Hörschwelle

Zur Messung der frequenzspezifischen Hörschwelle wurde ein Ohr mit Sinustönen mit einem Frequenzspektrum von 1 kHz -45.25 kHz beschallt (Dauer: 3 ms, Ein- und Ausblendrampe jeweils 1 ms Dauer). Hierzu wählte man das nach der Klick-Hörschwellen-Messung Ohr mit der niedrigeren Hörschwelle aus. Aufnahmezeit und Aufnahmeintervall waren 10 bzw. 14 ms. Bei jeder Frequenz wurden Messungen für aufsteigende Schalldrücke

zwischen 20-100 dB SPL Abschwächung durchgeführt und über 32-128 Wiederholungen gemittelt.

2.8.3 Bestimmung der auditorischen Hirnstammpotentiale

Die Schwellen wurden durch visuellen Vergleich, das heißt nach Abschätzung durch den Versuchsleiter bestimmt. Die Summenpotentiale hoher Schalldruckexposition wurden mit denen niedriger Schalldruckexposition verglichen. Der niedrigste Schalldruck, ab dem eine synchrone Signalform des Summenpotentials in der Messung zu erkennen war, wurde als Schwelle definiert.

2.9 Narkose

Als Narkose wurde eine Mischung aus Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml, Pfizer Erlangen) und Rompun (Xylzinhydrochlorid, 2%, Bayer Leverkusen) verwendet. Drei Teile des Hypnotikums Ketavet wurden mit einem Teil des Muskelrelaxanz Rompun gemischt. Von diesem Ansatz bekamen die Ratten 0,01 ml/kg ihres Körpergewichts gespritzt.

2.10 Statistik

Die Ergebnisse der Verhaltenstests und Hörmessungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (parameterfreier statistischer Test zum Vergleich des Mittelwerts zweier Stichproben gleicher Verteilungen) und dem Student's t-Tests auf Signifikanz überprüft ($p < 0.05$).

3 Ergebnisse

3.1 Konditionierung

Um einen möglichen Einfluss eines selektiven *s* auf das Verhalten von Ratten mit Natrium-Salizylat induziertem Tinnitus zu untersuchen, wurden 20 adulte Ratten über einen Zeitraum von 14 Wochen - wie in „Material und Methoden“ beschrieben - konditioniert. Durch Konditionierung auf ein frequenzloses Rauschen (bedingter Reiz) kann im Verhaltensmodell Tinnitus gezeigt werden (Rüttiger et al., 2003). Als Vorgabe wurde ein Konditionierungsziel definiert, bei dem die Ratten einen Tinnitusindex von 0.1 – definiert in Material und Methoden (2.7) – unterschreiten mussten. Der Tinnitusindex trifft eine Aussage über das konditionierte Verhalten, bei dem Zugriffe auf die Trinkkanülen während der Stillephase vermieden werden sollen. Nimmt dieser Index zu, d.h. greifen die Ratten während der Stillephase vermehrt auf die Trinkkanülen der Zuckerwasserspender zu, kann (1) entweder das konditionierte Verhalten von den Ratten verlernt worden sein oder (2) die Ratten zeigen die Verhaltensänderung auf Grund eines subjektiven Ohrgeräusches, also Tinnitus. Um Fehler, die durch Lernverlust der Tiere zustande kommen, auszuschließen, wurden für Versuchs- und Kontrollgruppe Tiere mit möglichst gleichem Konditionierungsstand ausgewählt.

Die Konditionierungsphase wurde in progressiven Konditionierungseinheiten durchlaufen. Zu Beginn erfolgte die Gewöhnung an den Konditionierungskäfig (Skinnerbox) und an das Prinzip der Belohnung während einer Tonphase bzw. keiner Belohnung während der Stillephase. Ab der zweiten Woche wurde als negative Verstärkung („Bestrafung“) ein elektrischer Schock bei Zugriffen auf den Zuckerwasserspender während der Stillephase

eingeführt. Weitere Maßnahmen zur intensiveren Konditionierung waren das Trainieren mit randomisierter Belohnungsgabe, bei der durch intermittierende Verstärkung eine dauerhafte Motivation erreicht werden sollte. Auch die Bestrafung wurde randomisiert und durch höhere Intensität qualitativ verstärkt. Eine weitere Neuerung stellte die Einführung variabler Lautstärken dar. So sollte die Fähigkeit der Ratten, das frequenzlose Rauschen von Stille zu unterscheiden, geschult werden, damit auch ein bei der Ratte schwacher Tinnitus im Verhaltenstest mit Zugriffen auf den Zuckerwasserspender während der Stillephase beantwortet wird und sich in einer signifikanten Änderung im Tinnitusindex niederschlägt. Wie die in Abbildung 3.1 dargestellte Entwicklung des Tinnitusindex zeigt, sinkt dieser nach Einführung von Bestrafung rapide ab (Abb. 3.1, mit * markiert) und erreicht nach sechs bis sieben Wochen ein konstant niedriges Niveau. Die leichte Zunahme im Tinnitusindex in der achten und neunten Woche ist auf ein solches Konditionierungstraining mit variabler Lautstärke zurückzuführen (Abb. 3.1, mit ** markiert). Das bei diesem Training gespielte Rauschen umfasste auch schwächere Schalldruckpegel, die für die Ratten nicht so klar von reiner Stille abgrenzbar sind wie die bisher gewohnten 65 dB SPL.

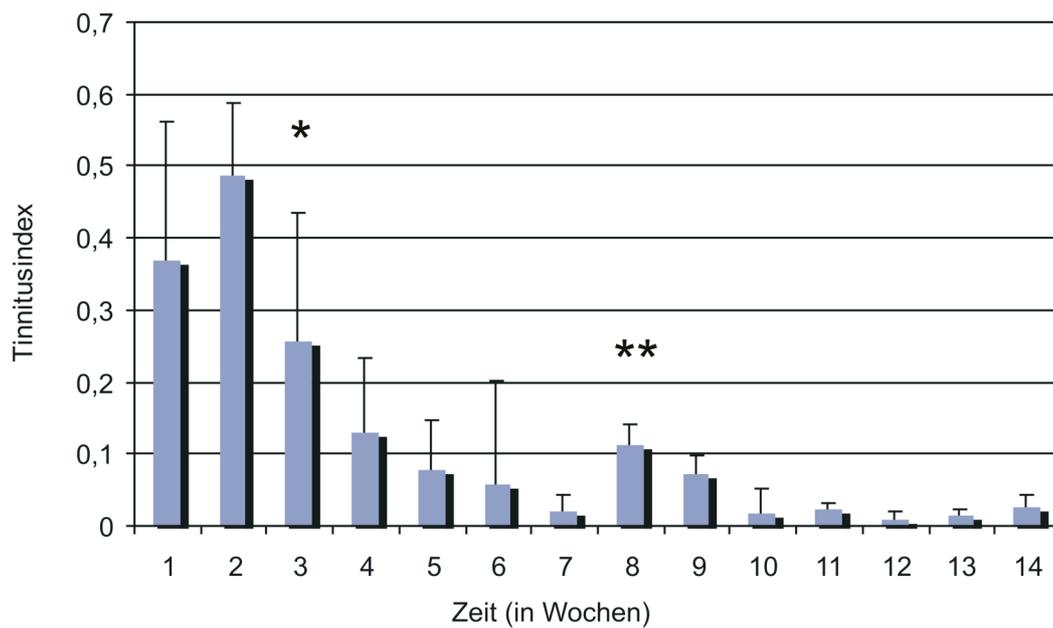


Abb. 3.1 Entwicklung des Tinnitusindex im Konditionierungsverlauf

Dargestellt ist der Konditionierungserfolg 20 adulter Ratten (Wistar, Eigenzucht) über einen Zeitraum von 14 Wochen. Aufgetragen sind die Mittelwerte des Tinnitusindex (n=20) eines repräsentativen Konditionierungstrainings jeder Woche. Die vertikalen Markierungen auf den Balken zeigen die Standardabweichung. Mit (*) markiert ist die Einführung von „Bestrafung“ in Form elektrischer Schocks bei Zugriffen in der Stilleperiode; mit (**) markiert ist die Einführung von Konditionierungen mit variabler Lautstärke.

Abb. 3.2 zeigt exemplarisch ein Konditionierungstraining mit variabler Lautstärke. Zu erkennen ist, dass ein Zusammenhang zwischen Tinnitusindex und Lautstärke besteht, d.h. die Ratten nicht nur „Ton“ oder „kein Ton“ unterscheiden, sondern die verschiedenen Lautstärken unterschiedlich wahrnehmen und sich dies in ihrem Verhalten widerspiegelt (Rüttiger et al., 2003).

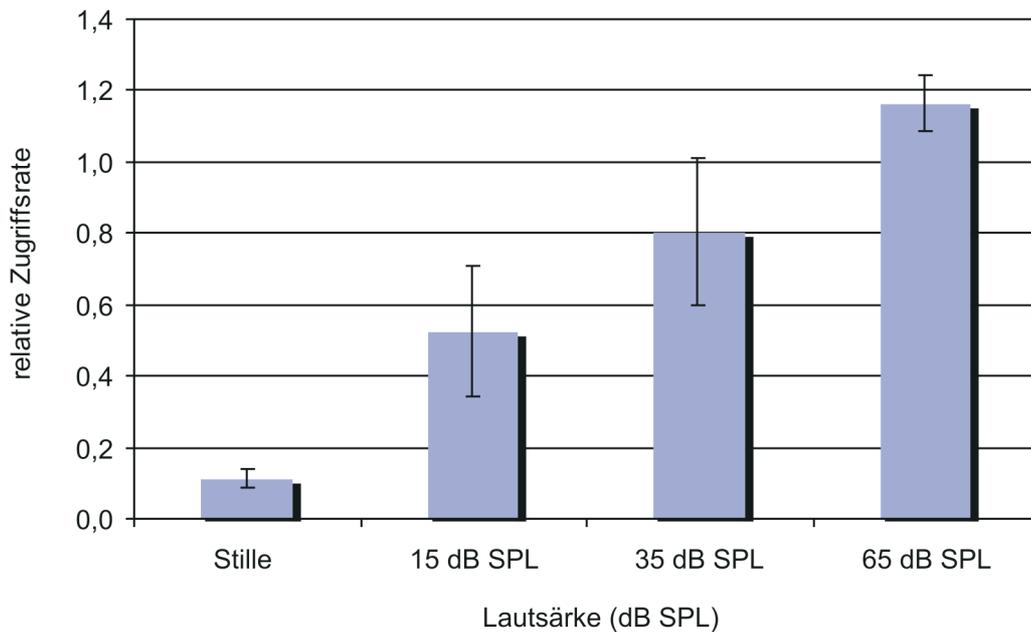


Abb. 3.2: Relative Zugriffsrate während eines Konditionierungstrainings mit variabler Lautstärke während der Tonphase

Dargestellt sind relative Mittelwerte ($n=20$) eines einzelnen Trainings bezogen auf die Zugriffe pro Minute bei variablen Schalldruckpegeln. Die vertikalen Markierungen auf den Balken stellen die Standardabweichung dar. Während des Konditionierungstrainings wurde in der Tonphase zwischen 65 dB SPL und 15 bzw. 35 dB SPL abgewechselt (65-35-65-15 dB SPL, bzw. 65-15-65-35 dB SPL). Mit jeder Intensität wurde 30 Sekunden lang beschallt, sodass die Tonphase insgesamt immer 120 Sekunden dauerte. Die Stillephase dauerte immer 40 Sekunden. Zu erkennen ist eine analog zum Schalldruckpegel stetige Zunahme der Zugriffsrate. Bei den mittleren Lautstärken 15 und 35 dB SPL fällt außerdem eine größere Standardabweichung auf als bei 65 dB SPL und Stille.

Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis des letzten Konditionierungstrainings vor Beginn der Testphase. Gefordertes Konditionierungsziel für den Eintritt in die Versuchsphase war ein Tinnitusindex $< 0,1$. Alle zwanzig Ratten erfüllten dieses Zulassungskriterium für die Versuche und unterschritten den Tinnitusindex von 0,1.

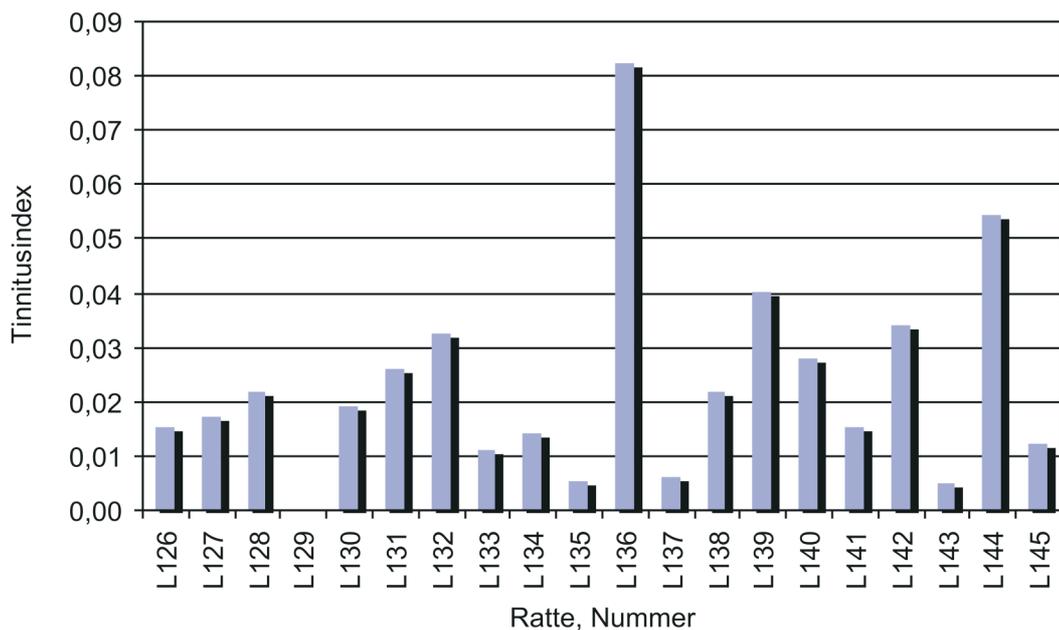


Abb. 3.3: Tinnitusindex nach abschließendem Konditionierungstraining

Die Abbildung zeigt den Tinnitusindex aller Ratten (n=20) im letzten Konditionierungstraining vor Eintritt in die Versuchsphase. Alle Ratten erfüllten das definierte Kriterium; einen Tinnitusindex < 0.1. Diese Abbildung steht exemplarisch für die letzten 6-10 Konditionierungstage, in denen jedes Tier den Tinnitusindex von < 0.1 im Durchschnitt unterschritt.

Weiterhin musste für das Experiment eine durchgehend hohe Motivation, gemessen in Zugriffen pro Minute während der Tonphase, sichergestellt werden, um dem Ergebnis Aussagekraft zu verleihen. Die in Abbildung 3.4 dargestellten Mittelwerte zeigen die absolute Zahl der Zugriffe auf die Zuckerwasserspender pro Minute über einen Zeitraum von 24 Wochen. Während der reinen Konditionierungsphase (Wochen 1-14) greifen die Ratten relativ konstant häufig zu. Nach Eintritt in die Versuchsphase bieten die Zugriffe pro Minute beim Konditionierungstraining, das der „Auffrischung“ des erlernten Verhaltens diene, ein heterogeneres Bild. Da eine genaue Beurteilung aller Tiere auf Grund individuellen Verhaltens schwer zu verwirklichen war, wurden zur Orientierung Mittelwerte herangezogen. Keine der Ratten hatte jedoch in der Einzelbetrachtung während der Konditionierungstage im Durchschnitt weniger als zehn Zugriffe pro Minute während der Tonphase, womit die Motivation der Tiere ausreichend hoch war, um dem Ergebnis die nötige Aussagekraft zu verleihen.

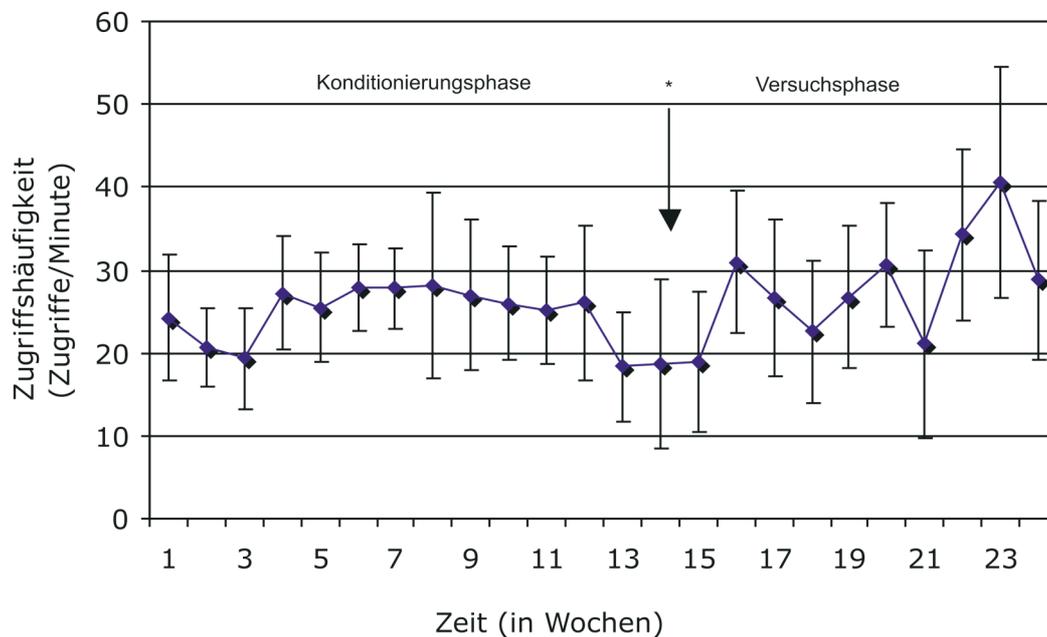


Abb. 3.4: Entwicklung der Zugriffshäufigkeit bei Konditionierungstrainings über einen Zeitraum von 24 Wochen

Aufgetragen gegen die Zeitachse sind die Mittelwerte der absoluten Zugriffe von 20 Tieren während der Tonphase. Die vertikalen Striche stellen die Standardabweichung dar. Während der ersten 14 Wochen wurde ausschließlich konditioniert (Konditionierungsphase), ab der 15. Woche zusätzlich Verhaltenstests (Versuchsphase) durchgeführt. Ab der Pfeilmarkierung (*) dargestellt sind die Mittelwerte der Konditionierungstrainings zwischen den Verhaltenstests in der Versuchsphase (n=20); hiermit konnte zum einen überprüft werden, in wie weit konditioniertes Verhalten verlernt wurde. Zum anderen wurde das Konditionierungsniveau stabilisiert.

Zusammenfassung

Alle Tiere erreichten das angestrebte Konditionierungsniveau, ausgedrückt durch einen Tinnitusindex <0.1 .

3.2 Test auf die Induzierbarkeit von Tinnitus

Der Test auf die Induzierbarkeit von Tinnitus verifizierte das Verhaltensmodell von Rüttiger et al., 2003 und diente als Erfolgskontrolle der Konditionierungsphase. Die pharmakologische Induktion eines Phantom-Geräuschs mit Natrium-Salizylat wurde an zwei aufeinanderfolgenden

Versuchstagen an allen 20 Ratten unter Versuchsbedingungen je zweimal getestet (n=20, doppelt gemessen).

Drei Stunden vor dem Verhaltenstest bekamen die Ratten intraperitoneal 350 mg/kg KG Natrium-Salizylat bzw. Kontrollsubstanz (0,5 ml Saline) injiziert, da nach drei Stunden das Maximum der Natrium-Salizylat-Wirkung zu erwarten ist (Chen und Jastreboff, 1995; Eggermont und Kenmochi, 1998). Der Verhaltenstest dauerte mindestens 20 Minuten und wurde wie in Material und Methoden beschrieben, ohne Bestrafung und nur mit vereinzelter Belohnung durchgeführt (siehe 2.4). Das Balkendiagramm in Abbildung 3.5 zeigt die Mittelwerte des Tinnitusindex aller 20 Ratten aus beiden Tests (n=20, doppelt gemessen). Der Tinnitusindex von Tieren die mit Natrium-Salizylat behandelt wurden war signifikant höher als der der Kontrollgruppe [0.30 ± 0.22 SD gegen 0.067 ± 0.13 SD, n=20, doppelt gemessen, $p < 0.01$]. Die durchschnittliche Aktivität, gemessen in Zugriffen pro Minute während der Tonphase, war mit 13.5 bei der Kontrollgruppe gegenüber 12.7 bei der Versuchsgruppe (Natrium-Salizylat) vergleichbar hoch; es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dieser Verhaltenstest bildete die Grundlage für die folgenden Versuche in denen mögliche Einflüsse eines s auf das Verhalten von Tieren untersucht wurde, die mit Natrium-Salizylat behandelt wurden.

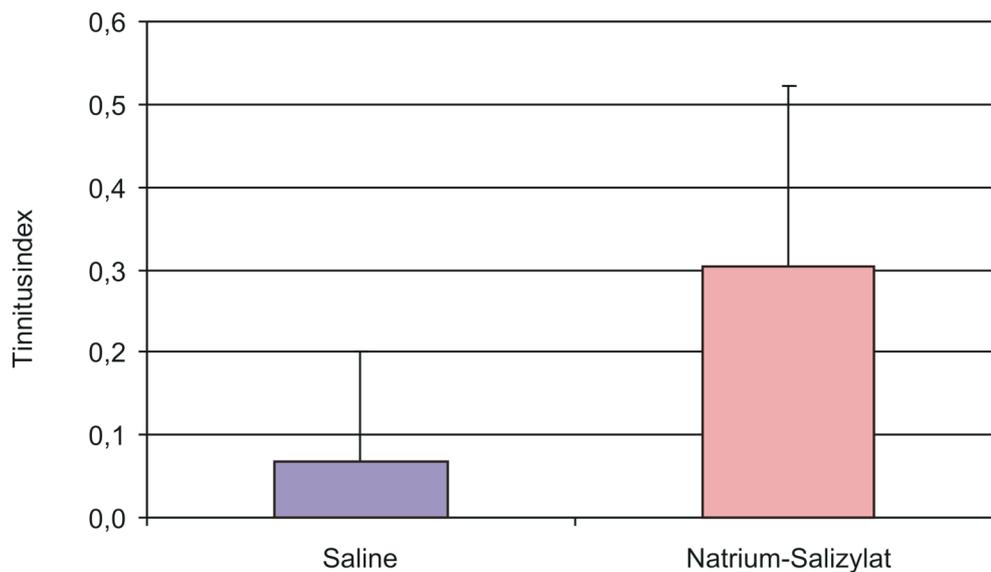


Abb. 3.5: Tinnitusindex bei Ratten mit Natrium-Salizylatbehandlung und Kontrolle (Saline)

Dargestellt ist der Tinnitusindex von 20 Ratten bei zwei Verhaltenstests. Die Balken zeigen die Mittelwerte, die vertikalen Striche die Standardabweichung. Jede Ratte wurde innerhalb von 14 Tagen zweimal mit Natrium-Salizylat und zweimal mit Kontrollsubstanz (Saline) behandelt (n=20 doppelt, getestet). Der Tinnitusindex der mit Natrium-Salizylat behandelten Tiere war dabei signifikant höher als der Tinnitusindex der Kontrolltiere [0.30 ± 0.22 SD gegen 0.067 ± 0.13 SD, n=20, doppelt gemessen, $p < 0.01$].

Zusammenfassung

Die Ergebnisse des Verhaltenstests zeigen eine deutliche Zunahme im Tinnitusindex bei Ratten, die zuvor mit Natrium-Salizylat behandelt worden sind, gegenüber den Kontrolltieren. Das konditionierte Verhalten wurde auch ohne Bestrafung und Belohnung beibehalten.

3.2.1 Akute Applikation eines PDE-5-Inhibitors

Nach Konditionierung und Prüfung der Induzierbarkeit von Tinnitus im Verhaltensmodell konnte nun im nächsten Schritt geprüft werden, ob die

intraperitoneale Applikation eines PDE-5-Inhibitors kurz nach der Tinnitusinduktion mit Natrium-Salizylat einen Einfluss auf das Verhalten der Versuchstiere hat. Hierzu wurden 20 Ratten in vier Versuchsgruppen (A-D) à fünf Tiere aufgeteilt. Jedes Tier wurde einmal mit jeder der vier Behandlungsmöglichkeiten, die in Tabelle 3.1 dargestellt sind, behandelt. Daraus resultierten vier Behandlungstage, die auf vier Wochen verteilt wurden. Zwischen den Behandlungstagen sollten sich die Versuchstiere drei Tage erholen und anschließend durch einmaliges Nachkonditionieren gegen Verlernen des konditionierten Verhaltens geschützt werden. Eine solche Woche wird in Tabelle 3.1 als „Block“ beschrieben.

Tabelle 3.1: Aufteilung der Versuchsgruppen für die intraperitoneale Applikation des PDE-5-Inhibitors

	Block I	Block II	Block III	Block IV
Gruppe A	SCY/PDE-5-I	Sal/PDE-5-I	SCY/Sal	Sal/Sal
Gruppe B	Sal/Sal	SCY/PDE-5-I	Sal/PDE-5-I	SCY/Sal
Gruppe C	SCY/Sal	Sal/Sal	SCY/PDE-5-I	Sal/PDE-5-I
Gruppe D	Sal/PDE-5-I	SCY/Sal	Sal/Sal	SCY/PDE-5-I

PDE-5-I=PDE-5-Inhibitor i.p.	Sal=Saline i.p.	SCY=Salizylat i.p.
------------------------------	-----------------	--------------------

Jeder dieser vier Versuche begann drei Stunden vor der Testsitzung mit der intraperitonealen Applikation von Natrium-Salizylat (350mg/kg KG), bzw. Saline als Kontrollsubstanz. 2.5 Stunden nach der Applikation von Natrium-Salizylat oder Kontrollsubstanz bekamen die Ratten 3 mg/kg KG PDE-5-Inhibitor intraperitoneal bzw. 0.5 ml Saline als Kontrollsubstanz injiziert. 30 Minuten später wurde der Verhaltenstest durchgeführt. Die Aktivität während der Tonphase im zwanzigminütigen Verhaltenstest erreichte in allen Testgruppen ein ähnlich hohes Niveau (Abb. 3.6). Dabei mussten bei jedem Verhaltenstest mindestens drei Zugriffe pro Minute während der Tonphase

durch das Versuchstier erfolgen, um als aussagekräftig gewertet zu werden. Alle Ratten erfüllten bei jedem Verhaltenstest dieses Kriterium (n=20).

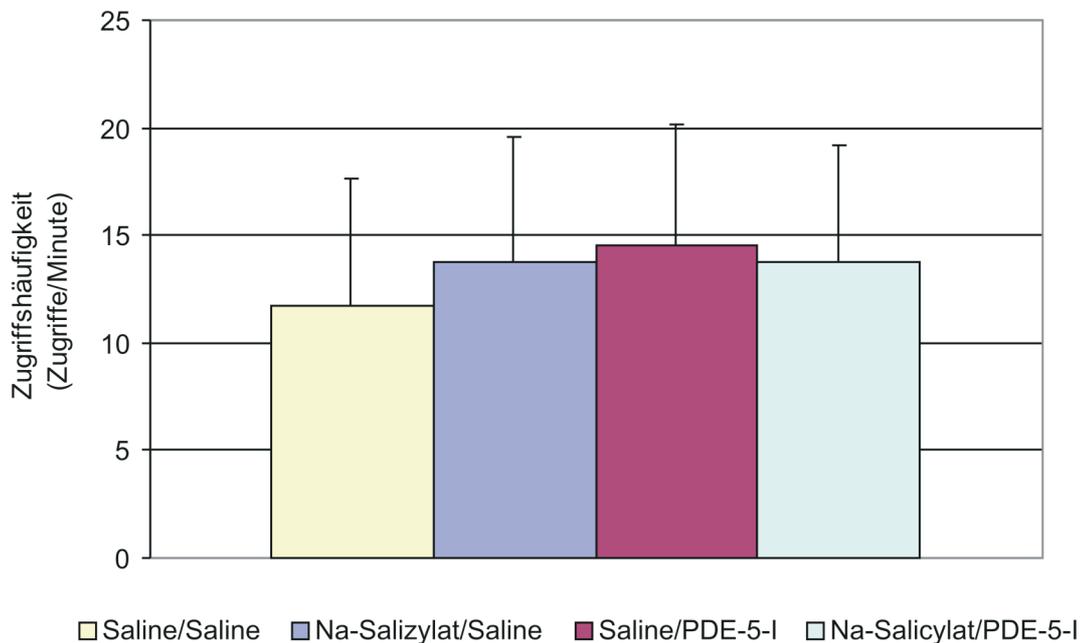


Abb. 3.6: Zugriffshäufigkeit von Ratten auf die Zuckerwasserspender während der Tonphase im 20minütigen Verhaltenstest ohne Bestrafung bzw. Belohnung

Die Balken stellen die Mittelwerte der Zugriffshäufigkeit dar, die vertikalen Striche die Standardabweichung, Stichprobengröße n=20. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p < 0.05$, nichtparametrischer Paarvergleichstest nach Wilcoxon). PDE-5-I=.

Wie erwartet, unterschieden sich die mit Saline vorbehandelten Tiere (Saline/Saline, Saline/) durch einen deutlich geringeren Tinnitusindex von denen, die mit Natrium-Salicylat (Natrium-Salicylat/Saline, Natrium-Salicylat/) behandelt wurden (Abb. 3.7). Diese beiden Gruppen sind im Vergleich signifikant verschieden und somit ist das Tinnitus-Modell auf der Basis von Natrium-Salicylat erneut bestätigt (Vergleich der zusammengezogenen Mittelwerte beider mit Saline behandelten Gruppen mit den zusammengezogenen Mittelwerten der mit Natrium-Salicylat behandelten Gruppen [0.049 ± 0.048 gegen 0.45 ± 0.27 , n=20, $p < 0.05$]). Zwischen den Tieren, die mit Natrium-Salicylat und einem PDE-5-Inhibitor behandelt worden sind und den Kontrolltieren (Natrium-Salicylat/Saline) konnte jedoch

leider kein signifikanter Unterschied im Tinnitusindex gemessen werden [0.50 ± 0.29 gegen 0.41 ± 0.25, n=20, n.s.] (Abbildung 3.7, mit „n.s.“ markiert).

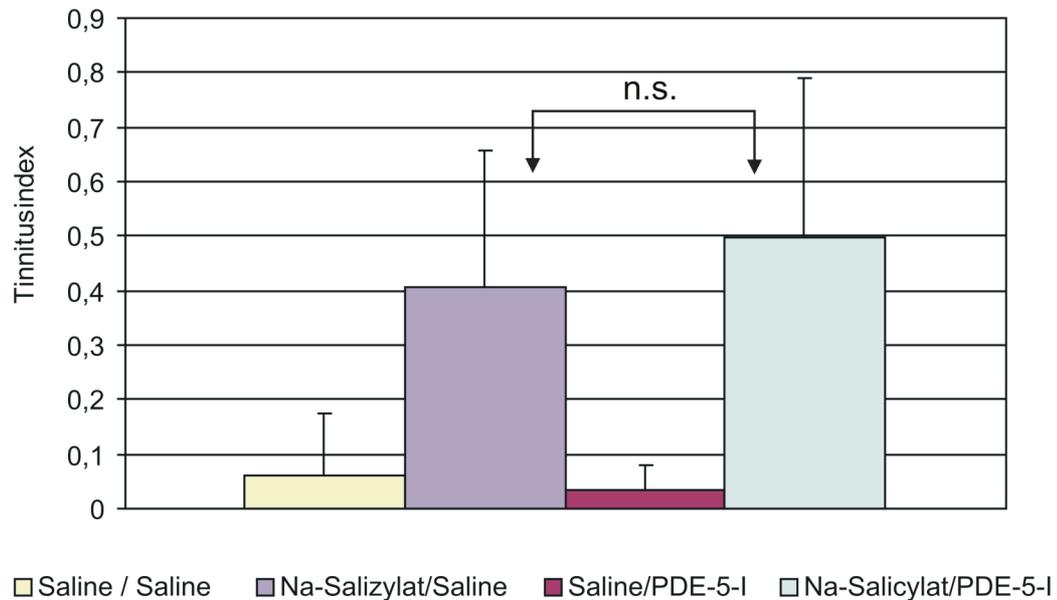


Abb. 3.7: Tinnitusindex bei vier Versuchsgruppen nach einem 20 minütigen Verhaltenstest (ohne Bestrafung bzw. Belohnung)

Die Balken repräsentieren den Tinnitusindex von vier Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Vorbehandlung: 3h vor der Testsitzung wurde den Ratten Natrium-Salizylat bzw. Saline intraperitoneal appliziert, 30 min. vor dem Verhaltenstest wurde dann Saline als Kontroll- oder ein PDE-5-Inhibitor als Testsubstanz gespritzt. Die Balken stellen die Mittelwerte des Tinnitusindex dar, die vertikalen Striche die Standardabweichung (Stichprobengröße n=20). Signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen den mit Saline vorbehandelten Tieren (Saline/Saline, Saline/PDE-5-Inhibitor) und den Tieren, die Natrium-Salizylat zur Tinnitusinduktion bekommen haben (Natrium-Salizylat/Saline, Natrium-Salizylat/PDE-5-Inhibitor). Es konnte kein signifikanter Unterschied (*n.s.) zwischen den Versuchsgruppen Natrium-Salizylat/Saline und Natrium-Salizylat/PDE-5-Inhibitor im Paarvergleich nach Wilcoxon festgestellt werden.

Zusammenfassung

Der PDE-5-Inhibitor hat in der verabreichten Form und Konzentration keinen im Verhaltenstest statistisch nachweisbaren Effekt auf die durch Applikation von Natrium-Salizylat erwirkte Verhaltensänderung. Auch in der mit Saline behandelten Kontrollgruppe konnte durch den PDE-5-Inhibitor kein statistisch messbarer Unterschied festgestellt werden.

3.2.2 Hörmessungen nach dem PDE-5-Inhibitor–Akuttest

Natrium-Salizylat in hohen Dosen führt bekanntermaßen zu akutem, reversiblen Hörverlust. Um zu prüfen, ob sich die PDE-5-Inhibitor-Behandlung auf eine Salizylat-induzierte Hörminderung auswirkt, wurde eine Stunde nach dem Verhaltenstest bei sechs Ratten eine Hörschwellenprüfung mittels BERA (Brain Stem Evoked Response Audiometry) durchgeführt. Zwei Verfahren kamen dabei zur Anwendung: zum einen eine frequenzunspezifische Hörschwellenermittlung mit „Klick-Reizen“, zum anderen eine frequenzspezifische Hörschwellenermittlung, aufsteigend in zwölf Schritten von 1 kHz bis 45.25 kHz.

Bei der Hörschwellenermittlung durch „Klick-Reize“ zeigte sich ein deutlicher Hörverlust in der mit Natrium-Salizylat behandelten Gruppe gegenüber den mit Saline behandelten Tieren [33.3 ± 2.8 gegen 7.5 ± 2.6 , $n=6$, $p < 0.05$]. Die Hörschwellen der Ratten, die 30 Minuten vor dem Verhaltenstest zusätzlich mit dem PDE-5-Inhibitor behandelt worden waren, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den Hörschwellen der Tiere, die mit Natrium-Salizylat und Saline behandelt worden waren [34.2 ± 3.03 gegen 32.3 ± 2.6 , $n=6$, n.s.] (Abb. 3.8).

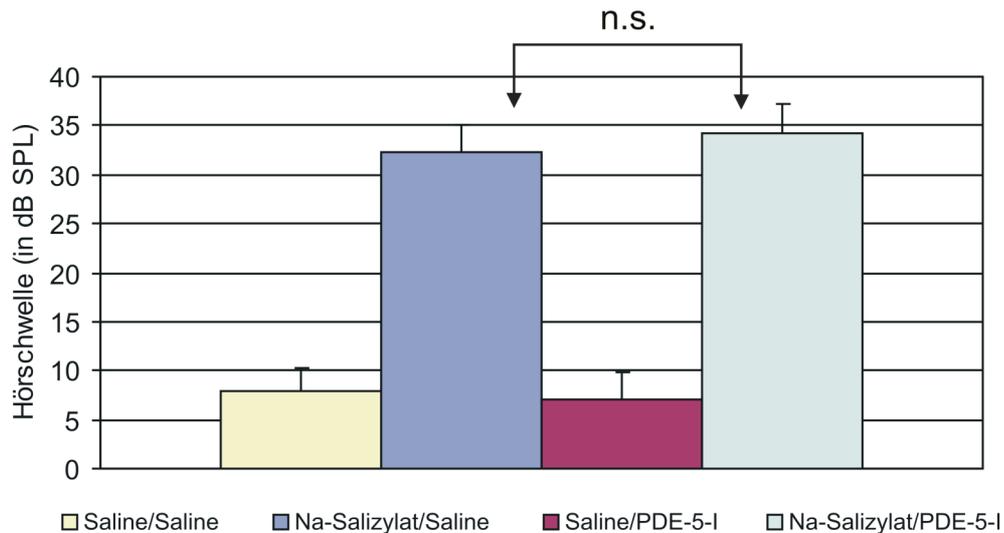


Abb. 3.8: Hörschwellen bei Stimulation durch "Klick-Reize" nach akuter Behandlung mit Natrium-Salizylat und einem PDE-5-Inhibitor

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Hörschwellen (in dB SPL) derselben Ratten (n=6) nach unterschiedlicher Behandlung. Die Versuchsgruppen wurden gegeneinander auf statistisch signifikante Unterschiede mit dem nicht-parametrischen Paarvergleichstest nach Wilcoxon verglichen. Signifikante Unterschiede (bei $p < 0.05$) ergaben sich zwischen den Tieren, die Natrium-Salizylat zur Tinnitusinduktion bekommen hatten (Natrium-Salizylat/Saline, bzw. Natrium-Salizylat/ PDE-5-Inhibitor), und den mit Saline vorbehandelten Tieren (Saline/Saline, Saline/PDE-5-Inhibitor) [33.3 ± 2.8 gegen 7.5 ± 2.6 , n=6, $p < 0.05$]. Der PDE-5-Inhibitor selbst hatte keinen statistisch messbaren Effekt auf die Hörschwelle (kein signifikanter Unterschied zwischen Saline/Saline und Saline/PDE-5-Inhibitor und zwischen Natrium-Salizylat/Saline und Natrium-Salizylat/PDE-5-Inhibitor) [34.2 ± 3.03 gegen 32.3 ± 2.6 , n=6, n.s.] (n.s.).

Die Auswertung der frequenzspezifischen Hörschwellenermittlung ergab ein ähnliches Bild wie die Hörschwellenermittlung bei „Klick-Reizen“. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der „Tinnitus-Gruppe“, die mit Natrium-Salizylat behandelt wurde und den mit Saline behandelten Kontrolltieren ($p < 0.01$).

Der Vergleich von PDE-5-Inhibitor behandelten Ratten mit den Kontrolltieren weist auch bei der frequenzspezifischen Hörschwelle keinen statistisch messbaren Unterschied auf (Abb. 3.9). Die größte Differenz zeigt sich zwischen den beiden mit Saline behandelten Gruppen bei 2.83 kHz, weist aber im nicht-parametrischen Paarvergleich nach Wilcoxon statistisch keinen messbaren Unterschied auf [54 ± 8.9 (Saline/PDE-5-Inhibitor) gegen 48.8 ± 8.5 (Saline/Saline), n=6, n.s.].

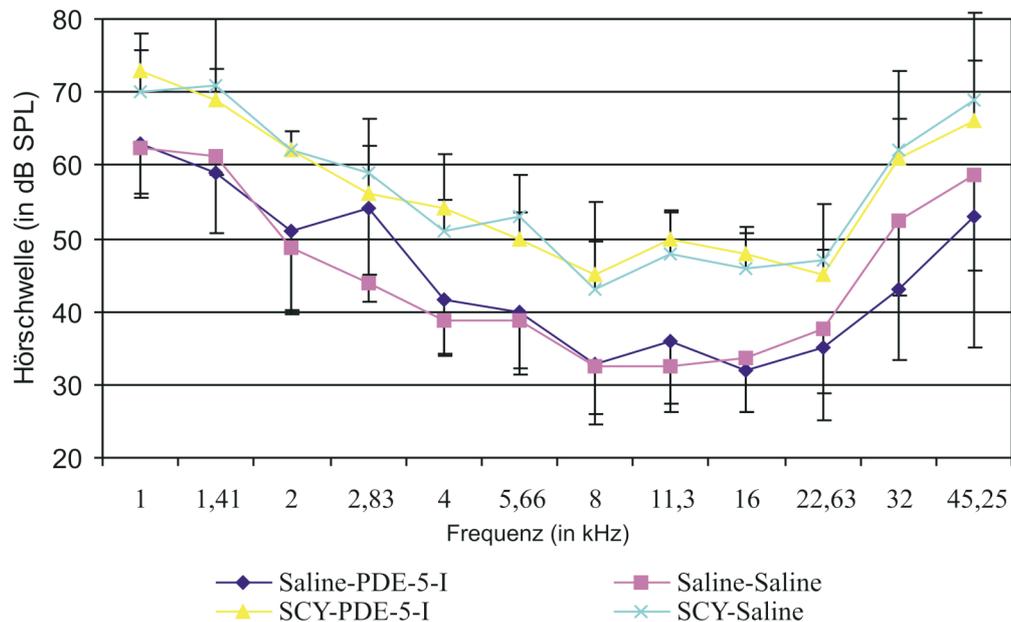


Abb. 3.9: Frequenzspezifische Hörschwellen von Versuchs und Kontrollgruppen nach Behandlung mit einem PDE-5-Inhibitor

Das Liniendiagramm zeigt die Hörschwellen von Ratten ($n=6$) mit unterschiedlicher Behandlung bei Frequenzen von 1 kHz bis 45.3 kHz. Die vertikalen Striche zeigen die Standardabweichung. Zu erkennen ist ein durchschnittlicher Hörverlust von 10 bis 15 dB SPL zwischen der Tinnitusgruppe (behandelt mit Natrium-Salizylat=SCY, also SCY/ PDE-5-Inhibitor bzw. SCY/Saline) und der Kontrollgruppe (behandelt mit Saline/Saline, bzw. Saline/PDE-5-Inhibitor). Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Paarvergleich nach Wilcoxon zwischen den mit einem PDE-5-Inhibitor behandelten Tieren und den Kontrolltieren ($p < 0.05$).

Zusammenfassung

Auch in der Hörmessung des Akuttest zeigt sich, dass die Behandlung mit einem PDE-5-Inhibitor in der durchgeführten Art, bei der angewendeten Applikationsform und bei der injizierten Konzentration keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollbehandlung mit Saline aufweist. Weder die absolute Hörschwelle bei „Klickreizen“ noch die frequenzspezifische Hörschwelle wurden durch den PDE-5-Inhibitor beeinflusst.

3.3 Orale Langzeitapplikation eines PDE-5-Inhibitors

3.3.1 Verhaltenstests

In einem zweiten Ansatz sollte geprüft werden, ob die kontinuierliche, mehrtägige Gabe eines PDE-5-Inhibitors einen Effekt auf die Remission von Natrium-Salizylat-induziertem Tinnitus hat.

Die bereits im Akuttest behandelten 20 Ratten wurden in zwei Gruppen à zehn Tiere aufgeteilt und in zwei Versuchsblöcken je einmal als Versuchsgruppe und einmal als Kontrollgruppe verwendet. Jeder Versuchsblock umfasste fünf ähnlich aufgebaute Behandlungstage (Tab. 3.2)

Tab. 3.2: Zeitplan für einen Block der PDE-5-Inhibitor Langzeitapplikation

	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
	PDE-5-I/	PDE-5-I/	PDE-5-I/	PDE-5-I/	PDE-5-I
Morgens	Saline oral	Saline oral SCY/Saline i.p.	Saline oral SCY/Saline i.p.	Saline oral	Saline oral
Mittags	Vortest	Kein Veraltenstest	"Nach 8 Std." Hörmessungen	"Nach 30 Std." Hörmessungen	"Nach 50 Std." Hörmessungen
Abends	PDE-5-I/ Saline oral SCY/Saline i.p.	PDE-5-I/ Saline oral SCY/Saline i.p.	PDE-5-I/ Saline oral	PDE-5-I/ Saline oral	

Legende: PDE-5-I = PDE-5-Inhibitor, oral
SCY = NatriumSalizylat, i.p.

Morgens und abends erfolgte jeweils die orale Applikation des PDE-5-Inhibitors (10mg/kg KG) bzw. der Kontrollsubstanz (Saline), sowie vom Abend des ersten bis zum Morgen des dritten Tages insgesamt viermal eine intraperitoneale Gabe von Natrium-Salizylat (je 200mg/kg KG, insgesamt 800mg/kg KG), bzw. Kontrollsubstanz (Saline) bei allen Versuchstieren (Tab. 3.2). Durch die im Abstand von 12 Stunden wiederholt erfolgende Verabreichung des PDE-5-Inhibitors sollte ein gleichmäßig hoher Blutspiegel erzielt werden.

Zwischen den Applikationen wurden dann die Verhaltenstests und Hörmessungen durchgeführt (Tab. 3.2). Am ersten Tag wurde ein „Vortest“ durchgeführt, vor dem lediglich eine orale Dosis PDE-5-Inhibitor sowie Kontrollsubstanz, aber noch kein Natrium-Salizylat appliziert wurde. Die Ergebnisse des Vortests dienten als Referenzwert zu den folgenden Verhaltenstests, um einen möglichen Effekt des PDE-5-Inhibitors per se auf das Verhalten der Ratten zu detektieren. Nach Gabe des PDE-5-Inhibitor, bzw. Saline, viermaliger Gabe von Natrium-Salizylat (je 200mg/kg KG, insgesamt 800mg/kg KG) ebenfalls im Abstand von 12 Stunden wurde am dritten Tag acht Stunden nach der letzten Injektion von Natrium-Salizylat der Verhaltenstest „Nach acht Stunden“ durchgeführt, mit anschließender Hörmessung an 4-6 ausgewählten Ratten (Tab. 3.2). Es folgten nach gleichem Schema die Tage vier und fünf mit den Verhaltenstests 30 Stunden (Abb. 3.10 + 3.11, „Nach 30 Stunden“) und 50 Stunden (Abb. 3.10 + 3.11, „Nach 50 Stunden“) nach der letzten Salizylatapplikation, an die sich ebenfalls Hörmessungen anschlossen (n=5–6, siehe Kapitel 3.3.2). Nach Abschluss der beiden fünftägigen Versuchsblöcke, zwischen denen zwei Wochen mit Erholung (freier Zugang zu Futter und Wasser) und Rekonditionierung lagen, wurde drei Wochen später ein einmaliger Verhaltenstest durchgeführt. Für diesen Verhaltenstest wurden die verbliebenen Ratten entsprechend der Einteilung aus dem letzten Versuchsblock in zwei Gruppen à neun (mit einem PDE-5-Inhibitor behandelt) und à sieben Versuchstiere (Kontrolle, mit Saline behandelt) aufgeteilt. Dieser Verhaltenstest nach drei Wochen sollte Aufschluss geben

über die Persistenz von Tinnitus über die Zeit und das Wirkungsprofil des PDE-5-Inhibitors. Im Anschluss an den Verhaltenstest wurde ebenfalls eine Hörmessung durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.2).

Während der Versuche verstarben fünf Tiere, so dass die Anzahl der Versuchstiere im Verlauf von 20 auf 15 reduziert werden musste. Hierdurch ergeben sich Variationen in den „n-Zahlen“ der Versuchsauswertung. Um dem Experiment die nötige Aussagekraft beizumessen, wurden nur Verhaltenstests gewertet, in denen die Zugriffshäufigkeit von drei Zugriffen pro Minute nicht unterschritten wurde.

Abbildung 3.10 zeigt, dass sich die Zugriffshäufigkeiten innerhalb der Versuchsgruppen an den einzelnen Versuchstagen nur gering unterschieden. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p < 0.05$). Im Vergleich der einzelnen Verhaltenstesttage gegeneinander lag die Zugriffshäufigkeit im Test nach drei Wochen signifikant höher als im Test 50 Stunden ($p < 0.01$) und 30 Stunden ($p < 0.05$) nach der letzte Applikation von Natrium-Salizylat.

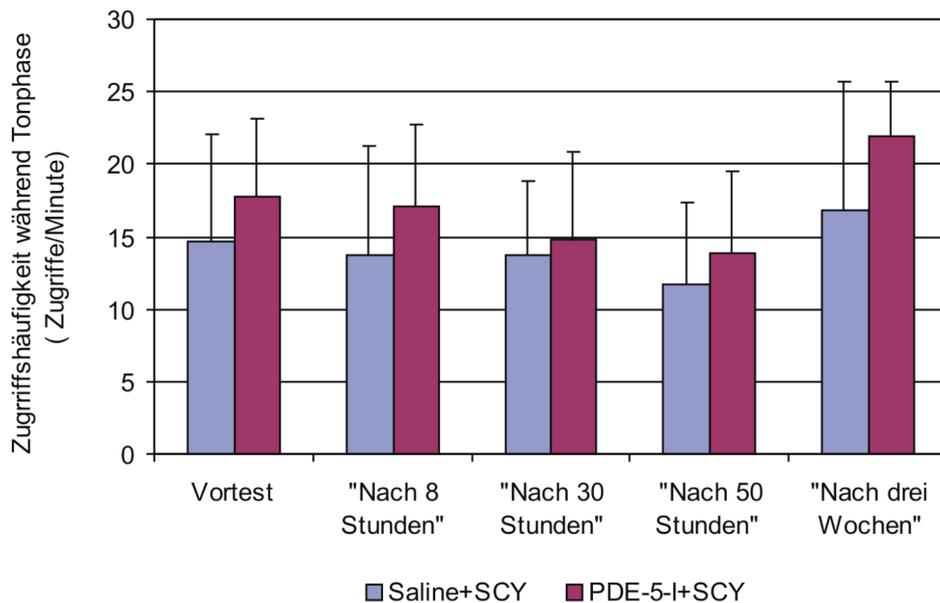


Abb. 3.10: Zugriffshäufigkeit von Ratten auf die Zuckerwasserspender während der Tonphasen in fünf Verhaltenstests (jeweils mindestens 20 min ohne Bestrafung bzw. Belohnung)

Dargestellt sind Mittelwerte aller Ratten (n=16-20). Statistisch signifikant (im Wilcoxon-Paarvergleich) getestet wurde „nach drei Wochen“ gegen nach „30 Stunden“ (p<0.05) (*) und „nach 50 Stunden“ (p<0.01) (**). Beachte: Es zeigt sich in keiner Testphase ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Wirksubstanz.

Der Tinnitusindex der verschiedenen Versuchsgruppen im Test mit kontinuierlicher Gabe des PDE-5-Inhibitors ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Eine signifikante Erhöhung des Tinnitusindex zeigt sich nach Natrium-Salizylat-Applikation verglichen mit dem Vortest gegen die Versuchsgruppen im Test „Nach acht Stunden“ (im Paarvergleich nach Wilcoxon getestet) [0.02 ± 0.07 , n=18-19, doppelt gemessen, gegen 0.55 ± 0.52 , n=16 doppelt gemessen, p < 0.05] dieser statistisch messbare Unterschied im Tinnitusindex bleibt auch im Verhaltenstest „Nach 50 Stunden“ noch bestehen [0.02 ± 0.07 , n=18-19, doppelt gemessen, gegen 0.16 ± 0.24 , n=16-17 doppelt gemessen, p < 0.05]. Erst im Verhaltenstest „Nach drei Wochen“ gibt es keinen statistisch messbaren Unterschied im Tinnitusindex im Vergleich zum Vortest mehr.

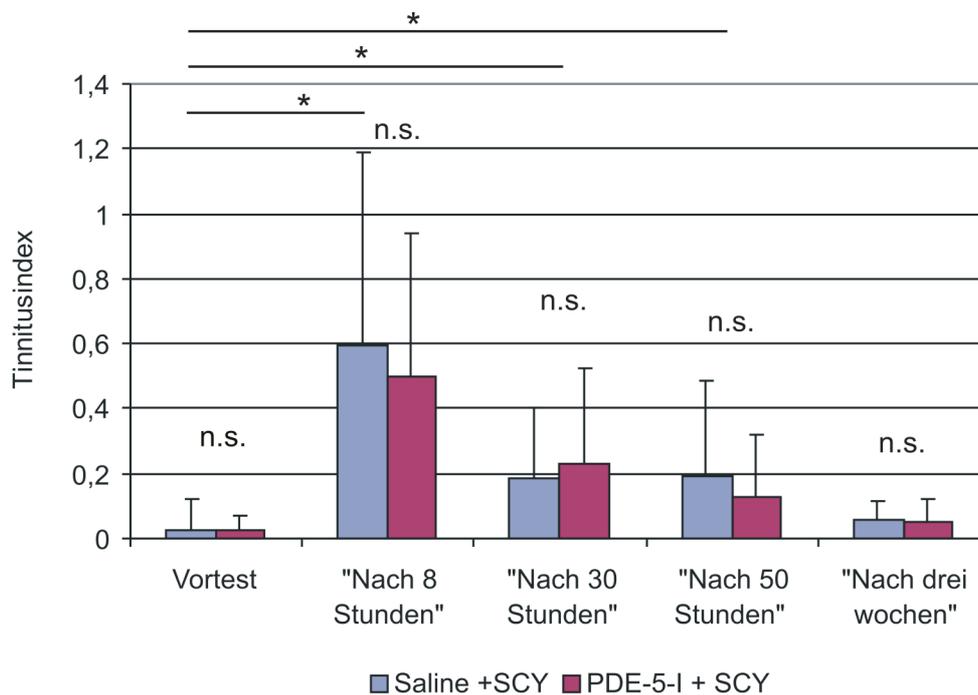


Abb. 3.11: Tinnitusindex von Ratten nach oraler Langzeitbehandlung mit einem PDE-5-Inhibitor

Als Balken dargestellt sind die Mittelwerte der Zugriffshäufigkeit auf Zuckerwasserspender von Ratten mit Natrium-Salicylat (SCY) und einem PDE-5-Inhibitor, bzw. Kontrollsubstanz (Saline) behandelt wurden. Die vertikalen Striche zeigen die Standardabweichung an. Die Stichprobengröße variiert, da fünf Tiere während der Behandlung verstarben (n=15-20). Statistisch signifikante Unterschiede ergibt der Vergleich des Tinnitusindex (Paarvergleich nach Wilcoxon) des Vortests (sowohl Versuchsgruppe als auch Kontrollgruppe) gegen die Verhaltenstests nach 8, 30 und 50 Stunden (*). Nach drei Wochen findet sich kein Unterschied im Tinnitusindex mehr. Die Versuchs- und die Kontrollgruppe sind zu den einzelnen Zeitpunkten nicht statistisch signifikant verschieden (n.s.).

Zusammenfassung

Mit der Langzeitapplikation eines PDE-5-Inhibitors sollte primär ein Effekt auf die Remission des Natrium-Salicylat-induzierten Tinnitus geprüft werden. Vergleicht man Versuchs- und Kontrollgruppe an den einzelnen Tagen miteinander, so zeigt sich, dass bei keinem der Verhaltenstests eine statistisch signifikante Differenz im Tinnitusindex zwischen der Versuchsgruppe (PDE-5-Inhibitor) und der Kontrollgruppe (Saline) nachweisbar wurde. Betrachtet man den Verlauf der Tinnitus-Remission, so scheint es, dass die mit einem PDE-5-Inhibitor behandelten Ratten einen tendenziell gleichmäßigeren Erholungsverlauf zeigen als die Kontrolltiere

(Saline). Die Kontrolltiere weisen bereits im Verhaltenstest 30 Stunden nach der letzten Natrium-Salizylat-Applikation bereits einen niedrigeren Tinnitusindex auf als im Verhaltenstest „Nach 50 Stunden“. In der Versuchsgruppe aber sinkt im Verhaltenstest „Nach 50“ Stunden der Tinnitusindex im Vergleich zum Verhaltenstest „Nach 30 Stunden“ noch einmal deutlich (Abbildung 3.11)

Ein signifikanter Effekt des PDE-5-Inhibitors auf das Verhalten der mit Natrium-Salizylat behandelten Versuchstiere konnte jedoch zu keiner Phase des Langzeittests nachgewiesen werden.

3.3.2 Hörmessungen

Wie bereits im Akuttest (Kapitel 3.2), wurden auch nach der kontinuierlichen oralen Applikation des PDE-5-Inhibitors Hörmessungen durchgeführt. An vier Tagen in jedem Versuchsblock (Tabelle 3.2), sowie einmalig drei Wochen nach der letzten Applikation von Natrium-Salizylat wurde das Hörvermögen der Versuchstiere getestet. Für die Hörmessungen wurden zu Beginn 12 Ratten ausgewählt, die in zwei Gruppen à 6 Tiere aufgeteilt wurden. An einer Gruppe wurde die Wirkung des PDE-5-Inhibitors untersucht, die zweite Gruppe mit Kontrollsubstanz (Saline) behandelt. Da direkt zu Anfang eine Ratte der Kontrollgruppe verstarb, reduzierte sich die n-Zahl hier auf fünf. Im Verlauf der Versuche verstarben weitere Tiere, bzw. wurde ein Tier wegen schlechtem Allgemeinzustand und hierdurch deutlich beeinflussten Ergebnissen aus der Auswertung gestrichen (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Übersicht über die den Versuchen zugrundeliegenden „n“-Zahlen

Vortest:	n=11
„Nach acht Stunden“:	n=11
„Nach 30 Stunden“:	n=8
„Nach 50 Stunden“:	n=9
„Nach drei Wochen“:	n=9

Wie in Material und Methoden (Kapitel 2.8) beschrieben, gliedert sich die Hörmessung in zwei Teile. Zum einen die Ermittlung der Hörschwelle durch breitbandige „Klick-Reize“, zum anderen frequenzspezifisch im Bereich von 1 kHz bis 45.3 kHz. Beide Messungen wurden nacheinander durchgeführt, für die frequenzspezifische Hörschwellenmessung wurde das in der „Klick-Reiz“-Messung bessere Ohr ausgewählt.

In Abbildung 3.12 ist der Hörschwellenverlauf nach „Klick-Reizung“ dargestellt. Der „Vortest“ zeigt die frequenzunspezifische Hörschwelle nach einmaliger oraler PDE-5-Inhibitor-Applikation (10mg/kg KG) ohne Tinnitus-Induktion. Es folgten dann 4 intraperitoneale Injektionen Natrium-Salizylat (200mg/kg KG) über einen Zeitraum von 48 Stunden. Parallel dazu erfolgte die orale Applikation des PDE-5-Inhibitors.

Statistisch wurden die Daten mit einem „Student’s t-Test“ ausgewertet. Zu erkennen ist eine signifikante Hörschwellenerhöhung acht Stunden nach der vierten und letzten Natrium-Salizylat-Injektion im Vergleich der addierten Mittelwerte von Versuchsgruppe (PDE-5-Inhibitor) und der Kontrollgruppe (Saline) verglichen mit den entsprechenden Mittelwerten des „Vortest“ [33.6 ± 6.36 gegen 6.1 ± 2.14 , $n=11$, $p < 0.05$]. Im Verlauf zeigt sich eine konstante Remission des Tinnitus. Ab 50 Stunden nach der letzten Natrium-Salizylat-Injektion ist keine signifikante Hörschwellenerhöhung im Vergleich zum „Vortest“ (=Ausgangsniveau) mehr nachweisbar. Vergleicht man die mit einem PDE-5-Inhibitor behandelte Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe

(Saline), so zeigen sich bei der Ausgangsmessung („Vortest“) und bei Messungen nach Wiedererlangen des Ausgangsniveaus („Nach 50 Stunden“, bzw. „Nach drei Wochen“) keine signifikanten Unterschiede. Wie aber stellt sich die Erholung, die Remission des Natrium-Salizylat-induzierten Tinnitus bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus im Test „Nach 50 Stunden“ dar?

Acht Stunden nach der letzten Injektion von Natrium-Salizylat haben Versuchs- und Kontrollgruppe einen fast identischen Hörverlust von etwa 30 dB. 22 Stunden später ist die Hörschwelle beider Testgruppen weiter gesunken (Abb. 3.12, „Nach 30 Stunden“). Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen der Versuchs- (PDE-5-Inhibitor) und der Kontrollgruppe (Saline). Die Versuchsgruppe weist eine um 7 dB niedrigere Hörschwelle auf als die mit Saline behandelte Kontrollgruppe. Dieser Unterschied verfehlt jedoch die festgelegte Signifikanzgrenze von $p < 0.05$ [13.8 dB SPL \pm 10.37 dB gegen 20.5 dB SPL \pm 4.14 dB, n=8, n.s. bei $p < 0.05$].

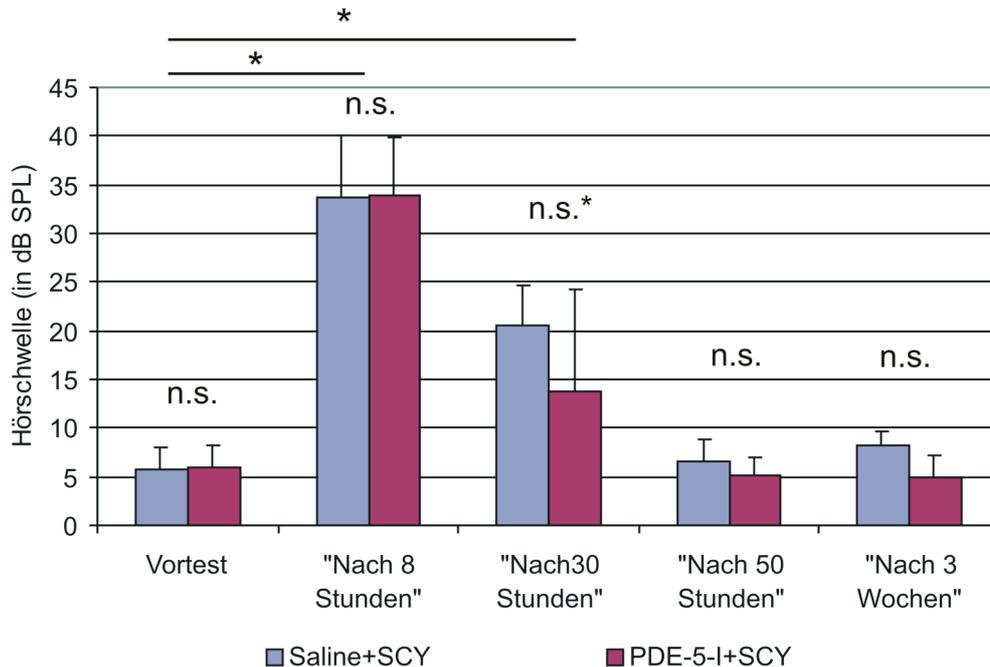


Abb. 3.12 : Frequenzunspecifische Hörschwellen nach Tinnitus-Induktion und oraler PDE-5-Inhibitor-Applikation

Die Abbildung zeigt den Hörverlust (in dB) nach Tinnitus-Induktion durch viermalige Applikation von Natrium-Salizylat (200mg/kg KG). Fünf Messungen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt (n=15-20). Die vertikalen Striche beschreiben die Standardabweichung. Auf der Ordinate ist die relative Lautstärke in dB SPL, auf der Abszisse der Zeitpunkt der Hörmessung, angegeben in Stunden nach der letzten Applikation von Natrium-Salizylat, aufgetragen. Bis 30 Stunden nach der letzten Applikation von Natrium-Salizylat sind die Hörschwellen signifikant zum Vortest erhöht (*). Der Hörschwellenunterschied zwischen Versuchs- (PDE-5-I) und Kontrollgruppe (Saline) „Nach 30 Stunden“ bleibt marginal oberhalb der Signifikanzgrenze (n.s.*). Auch die zu anderen Zeitpunkten gemessenen Hörschwellen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Versuchsgruppe (PDE-5-I + SCY) und Kontrollgruppe (Saline + SCY) (n.s.).

Einen detaillierteren Überblick über den Hörverlust bietet die frequenzspezifische Hörmessung.

In den Abbildungen 3.13-3.17 ist im Liniendiagramm der Hörverlust zu den Zeitpunkten „Vortest“, „Nach acht Stunden“, „Nach 30 Stunden“, Nach „50 Stunden“ und „Nach drei Wochen“ dargestellt. Die Frequenzmessungen wurden im Anschluss an eine „Klick-Reiz“-Messung nur auf dem in dieser Untersuchung besseren Ohr durchgeführt. Gemäß des Hörvermögens der Ratte zeigt sich eine „Bestfrequenz“ bei ca. 8 kHz. Erkennbar ist dies durch einen wannenförmigen Kurvenverlauf. Abbildung 3.13 zeigt die Hörschwellen der Frequenzmessungen des „Vortest“ ohne Tinnitusinduktion durch

Natrium-Salizylat. Versuchsgruppe und Kontrollgruppe beschreiben nahezu identische Kurvenverläufe. Lediglich bei 43.5 kHz unterscheiden sich beide Gruppen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Acht Stunden nach der letzten von vier Natrium-Salizylat Injektionen (Abbildung 3.13) zeigt sich eine Erhöhung der Hörschwelle. Im Mittel steigt die Hörschwelle um 10 dB, am stärksten verändert sich die Hörschwelle um die Bestfrequenz herum (4-16 kHz) und bei hohen Frequenzen (bis 45.3 kHz). Hier findet man durchschnittlich 11 dB Hörschwellenerhöhung, wohingegen die sehr niedrigen Frequenzen im Durchschnitt nur 8 dB Hörverlust zeigen.

Im Remissionsverlauf nimmt die Hörschwelle dann wieder ab. Bei einigen Frequenzen erreichen die Ratten schon 30 Stunden nach der Tinnitusinduktion (nahezu) ihren Ausgangswert aus dem Vortest (4, 5.66, 16, 22.3 kHz; Abbildung 3.14), während bei anderen Frequenzen erst 50 Stunden nach der Tinnitusinduktion eine ausgeprägte Schwellenabnahme eintritt (Abbildung 3.15). Auch hier lässt sich aber, ähnlich wie bei der „Klick-Reiz“-Messung, über alle Versuchstage hinweg ein kontinuierlicher Remissionsverlauf feststellen. 50 Stunden nach der Tinnitusinduktion haben Versuchs- und Kontrollgruppe dann das Ausgangsniveau vom „Vortest“ erreicht. Es zeigt sich aber vor allem in der Versuchsgruppe (PDE-5-Inhibitor) ein inhomogeneres Bild: Verglichen mit den Werten aus dem Vortest (Abb. 3.13) weichen die Hörschwellen 50 Stunden nach Tinnitusinduktion bei einigen Frequenzen zum Teil deutlich von denen aus dem Vortest ab. Sowohl Verbesserungen (z.B. bei 4 und 16 kHz, jeweils 4 dB) als auch Verschlechterungen (z.B. bei 2.83 und 11.3 kHz 4 bzw. 5 dB) lassen sich verzeichnen. Bei der mit Saline behandelten Kontrollgruppe gibt es ebenfalls Differenzen; hier sind die gemessenen Hörschwellen „Nach 50 Stunden“ aber durchweg niedriger als im Vortest.

Im Vergleich von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe sind in der Gesamtbetrachtung der einzelnen Testtage keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Lediglich bei Einzelbetrachtung der Frequenzen können im „Student's t-Test“ signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe ausgemacht werden. Die deutlichsten Unterschiede zeigen

sich, wie in Abbildung 3.14 zu sehen, „Nach acht Stunden“ bei hohen Frequenzen (32 und 45.3 kHz). Während bei der Kontrollgruppe (Saline) ein Hörverlust von 6 dB (32 kHz) und 8 dB (45.3 kHz) zu verzeichnen ist, nimmt die Hörschwelle bei der Versuchsgruppe (PDE-5-Inhibitor) um 14 dB (32 kHz), bzw. 11 dB (43.5. kHz) zu. Statistisch signifikant ist nur der Unterschied bei 45.3 kHz. Nach 30 Stunden (Abb. 3.15) sind zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar. 50 Stunden nach der letzten Natrium-Salizylat-Injektion (Abb. 3.16) gibt es dann mehrere Frequenzen, bei denen signifikante Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe bestehen. Bei 11.3, 16 und 32 kHz ist die Hörschwelle der Versuchsgruppe jeweils signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0.05$). Für alle anderen Frequenzen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die in diesem Versuchsteil untersuchte Langzeitwirkung eines PDE-5-Inhibitors zeigt damit keine eindeutige Verbesserung der Hörschwellenabwanderung nach Natrium-Salizylat-induziertem Tinnitus.

In der Gesamtbetrachtung der einzelnen Versuchstage konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

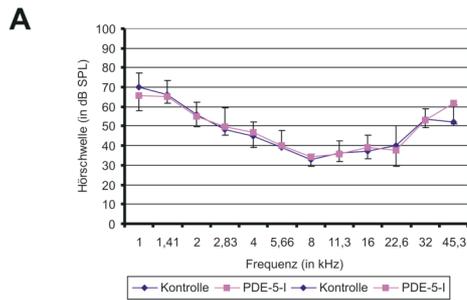


Abb. 3.13: Vortest

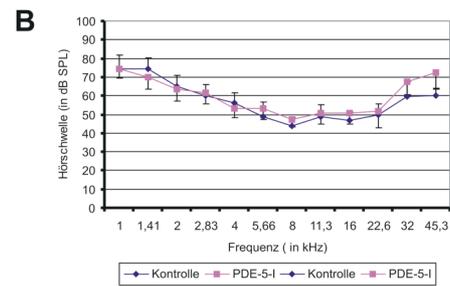


Abb. 3.14: Nach Acht Stunden

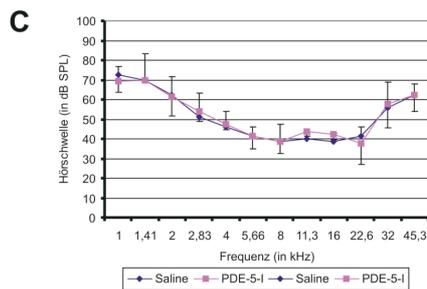


Abb. 3.15: Nach 30 Stunden

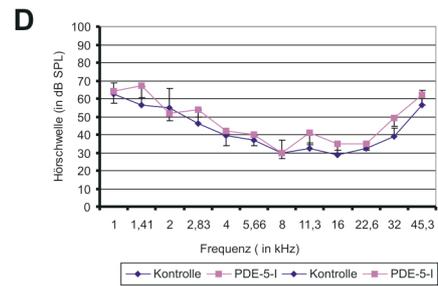


Abb. 3.16: Nach 50 Stunden

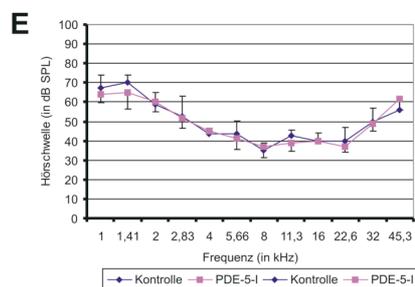


Abb. 3.17: Nach drei Wochen

Abbildungen 3.13 bis 3.17 (A–E): Frequenzspezifische Hörschwelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation eines PDE-5-Inhibitors und vor bzw. nach Tinnitusinduktion

In den Liniendiagrammen dargestellt sind die Mittelwerte ($n=5$ - $n=6$) frequenzspezifischer Hörschwellen. Frequenzen sind aufsteigend von 1 kHz bis 45,3 kHz auf der Abszisse abgetragen, die Ordinate gibt den Hörverlust in dB an. Durch vertikale Striche ist die Standardabweichung (SD) markiert; die der Kontrollgruppe nach oben, die der Kontrollgruppe nach unten.

Die Abbildungen A-E beginnen mit der frequenzspezifischen Hörschwelle des Vortest (A) und zeigen den Remissionsverlauf von der Tinnitusinduktion (B) bis zum Test „Nach drei Wochen“ (E).

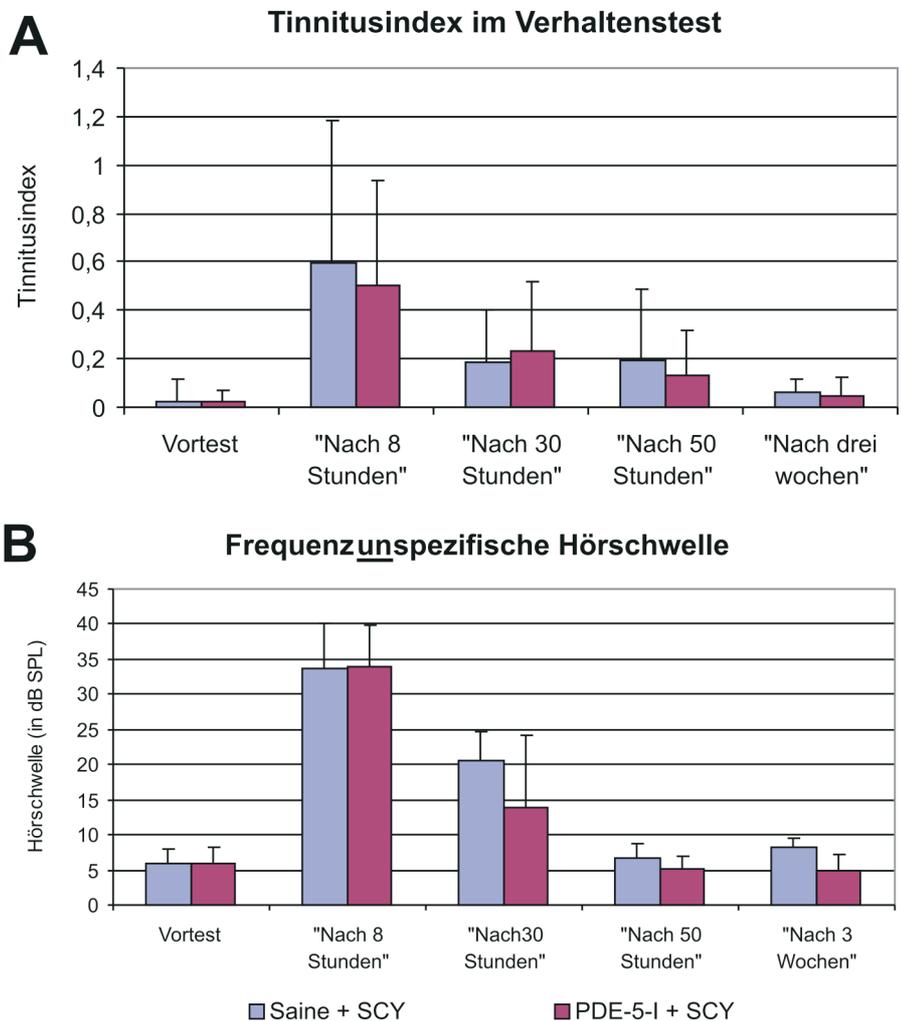


Abb. 3.18: Erholung im Langzeittest – Vergleich zwischen Tinnitusindex (A) und Hörschwellenverschiebung (B)

Die Abbildung (A) zeigt den Tinnitusindex an den einzelnen Versuchstagen vom Vortest bis zum Test drei Wochen nach der letzten Applikation von Natrium-Salizylat (n=15-20). Darunter abgebildet (B) ist der entsprechende Hörverlust in der frequenzunspezifischen Hörschwellenmessung (n=5-6). Zu erkennen ist, dass sich die Hörschwelle bereits im Test „Nach 50 Stunden“ wieder auf dem Niveau des „Vortest“ befindet, wohingegen der Tinnitusindex zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum Vortest noch signifikant erhöht ist und erst im Test „Nach drei Wochen“ das Ausgangsniveau erreicht hat.

Zusammenfassend zeigt die Auswertung der Experimente, dass es zwischen der Behandlung mit einem PDE-5-Inhibitor und der Kontrollbehandlung

(Saline) in keinem der vier Versuchsteile einen signifikanten Unterschied gegeben hat. Weder für die akute Applikation des PDE-5-Inhibitors, noch für eine orale Langzeitbehandlung konnte ein signifikanter Einfluss auf den Tinnitusindex oder den Hörverlust gezeigt werden.

In einem parallelen Projektabschnitt wurde mit identischer Applikationsmethode der gleiche PDE-5-Inhibitor in Tinnitus-induzierendem akustischem Trauma studiert. Hier zeigte sich interessanterweise – im völligen Gegensatz zur vorliegenden Studie – eine signifikante Wirkung des PDE-5-Inhibitors. Damit deutet sich zum ersten Mal an, dass Salizylat und akustisches Trauma Tinnitus über unterschiedliche Signalwege induzieren (siehe Kapitel 4, Diskussion).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt eines PDE-5-Inhibitors auf das Tinnitusverhalten und die Hörfähigkeit der Ratte nach systemischer Gabe von Salizylat mit Hilfe von Verhaltenstest und Hörmessungen untersucht.

Salizylat in ausreichender Menge systemisch appliziert führt bei Menschen und Tieren zu Tinnitus (McFadden et al., 1984, Jastreboff und Sasaki, 1994, Rüttiger et al., 2003).

Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge des Salizylat-induzierten Tinnitus sind ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Man geht zurzeit davon aus, dass Salizylat eine direkte Wirkung auf das zentrale aber auch auf das periphere Hörorgan hat. Während einige Autoren die Ursache von Tinnitus nach Salizylatgabe primär in der pathologischen Aktivierung cochleärer NMDA-Rezeptoren sehen (Guitton et al., 2003; Peng et al., 2003; Ruel et al., 2008; Panford Walsh et al., 2007), wird von anderen ein Ungleichgewicht in der lateralen Inhibition von zentralen auditorischen Projektionen für die Manifestation von Tinnitus verantwortlich gemacht (Eggermont, 2003).

Unabhängig von der primären Ursache des Tinnitus herrscht Einigkeit, dass Tinnitus, sowohl nach einem Schalltrauma, als auch nach Salizylat-Applikation, mit Veränderungen neuronaler Aktivität im auditorischen System einhergeht (Panford-Walsh et al.; 2007, Cazals et al. 2000; Bauer et al. 2000). So wurden in elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen des auditorischen Systems mehrfach Erhöhungen von spontanen neuronalen Aktivitäten (SFR) beobachtet (für Reviews: Eggermont und Roberts, 2004; Cazals, 2000).

Immunhistochemische Untersuchungen der „Immediate Early Genes“ cFos und dem „Brain Derived Neurotrophic Factor (bDNF)“, Markern für Plastizität im Nervensystem (Hughes und Dragunow, 1995), geben weitere stützende Hinweise auf eine neuronale Aktivitätszunahme nach Salizylat-Applikation in

weiten Teilen des zentralen Hörsystems (Wallhäusser-Franke et al., 2003) und der Cochlea (Panford-Walsh et al., 2007).

Geht man von einer kausal peripheren Genese des Tinnitus durch eine vorausgegangene Schädigung der Haarzellen aus, so wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Tinnitus einen Schaden an Hörzellen einzugrenzen. Salizylat führt über eine Veränderung der NMDA-Rezeptoren in Haarzellen (Ruel et al., 2008) und im Spiralganglion zu einer Blockade von GABA (Bauer et al., 2000; Eggermont und Kenmochi, 1998) oder Interaktion mit dem Protein Prestin der äußeren Haarzellen (Oliver et al., 2007) zu einer Schädigung von Haarzellen, bzw. afferenten Nerven. Geht man von einer neuroprotektiven Funktion des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweges in Haarzellen, Afferenzen und Spiralganglien aus, so könnte in der Manipulation dieses Signalwegs durchaus therapeutisches Potential liegen. Heinrich et al., 2005 konnten eine verstärkte Synthese von eNOS nach akustischem Trauma im Innenohr feststellen. Er vermutete in der Aktivierung des NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweges einen möglichen endogenen zytoprotektiven Mechanismus gegen Stress im Innenohr. Untersuchungen an Stützzellen des Cortischen Organs, ebenfalls nach Schalltrauma, ergaben einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration und weisen auch hier dem NO/cGMP/PKG-I/II-Signalweg eine ausschlaggebende Rolle zu (Matsunobu und Schacht, 2000). Geht man von solch einer Hypothese aus, dann könnten PDE-5-Inhibitoren durch eine putative protektive NO-Wirkung traumatische Einflüsse im Innenohr antagonisieren und so Tinnitus aufhalten. Über eine pharmakologische Erhöhung der Wirkkaskade von NO durch einen PDE-5-Inhibitor, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, lässt sich prüfen, ob diese Kaskade auf den Salizylat-induzierten Schaden des Innenohres Einfluss nimmt. Die Arbeitsgruppe um Yamashita zeigte sowohl für innere Haarzellen, als auch für äußere Haarzellen (Shen et al., 2005, 2006), dass der traumainduzierte Anstieg von Ca^{2+} über die Aktivierung der NO/cGMP/PKG-I/II-Kaskade inhibiert wird. Er vermutet, dass so die Zellen vor einer Ca^{2+} -Intoxikation geschützt werden.

4.1 Verhaltenstests

Operante Konditionierung als Grundlage für ein Tiermodell, in dem Tinnitus nachgewiesen werden kann, hat zahlreiche Anwendung gefunden und ist eine etablierte Methode (Rüttiger et al., 2003; Bauer et al., 2000; Salvi et al., 2004). Mit Hilfe der operanten Konditionierung können Nagetiere wie Ratten erlernen, Tinnitus durch eine Verhaltensänderung anzuzeigen. Durch Applikation von Salizylat oder durch ein akustisches Trauma kann ein Tinnitusverhalten induziert werden. Ein solches Tier-Verhaltensmodell zur Tinnitus-Prüfung ist nur in wenigen Laboratorien weltweit etabliert. In der vorliegenden Studie wurde Natrium-Salizylat eingesetzt, das ab einer Dosis von 150mg/kg KG im Tiermodell ein subjektives Ohrgeräusch auslöst (Rüttiger et al., 2003; Lobarinas et al., 2004). Es sollte explizit geprüft werden, ob der PDE-5-Inhibitor nach einmaliger Gabe den zuvor mit Natrium-Salizylat induzierten Tinnitus verändern bzw. optimalerweise vermindern kann. Hierzu wurde 2,5 Stunden nach der Natrium-Salizylat-Applikation der PDE-5-Inhibitor (3mg/kg KG) intraperitoneal appliziert und 30 Minuten später ein Verhaltenstest durchgeführt. In einem alternativen Ansatz sollte geprüft werden, ob der PDE-5-Inhibitor einen Einfluss auf die Remission des induzierten Tinnitus ausübt. Hier erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen eine tägliche, orale Applikation des PDE-5-Inhibitors. Innerhalb dieser Zeit wurden die Tiere dreimal nach Salizylat-Applikation auf Tinnitus getestet (Abb. 3.2, Kapitel 3.3.1).

Kontroll- und die mit dem PDE-5-Inhibitor behandelte Versuchsgruppe zeigten in Kurz- und Langzeitexperiment nach Tinnitusinduktion eine deutliche, signifikante Zunahme im Tinnitusindex, d.h. die Verhaltensänderung zeigte die Wahrnehmung von Tinnitus in beiden Versuchsansätzen an. Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Weder nach

Saline- noch nach Natrium-Salizylat-Applikation konnte der PDE-5-Inhibitor das Verhalten signifikant beeinflussen.

Sicherlich lässt sich nicht ausschließen, dass der Versuchsaufbau das Ergebnis beeinflusst hat. Daher sollte geprüft werden, ob eine Applikation des PDE-5-Inhibitors im Akuttest vor der Tinnitusinduktion ebenfalls ohne Effekt bleibt. Auch sollte, bevor eine Wirkung völlig ausgeschlossen wird, der Effekt einer Erhöhung der applizierten Dosis untersucht werden. Diese Versuchsvarianten scheinen sinnvoll, da nicht veröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass der PDE-5-Inhibitor Hörverluste nach Schalltrauma positiv beeinflussen kann. Da Hörverlust und Tinnitus eng korreliert sind (Tan et al., 2007) gilt es der Frage nach einer Wirkung des PDE-5-Inhibitors weiter nachzugehen.

4.2 Hörmessungen

Verschiedene Studien zeigen einen Hörverlust nach Applikation hoher Dosen Salizylats (Myers und Bernstein, 1965; McFadden et al., 1984; Wecker und Laubert, 2004). Pathophysiologisch wird ein Motilitätsverlust der äußeren Haarzellen angenommen. Salizylat scheint mit seinen positiven Ladungen eine kompetitive Bindung mit der Chlorid-Bindungsstelle des Motorproteins Prestin einzugehen. Dadurch, so wird vermutet, könnte der aktive Verstärkungsmechanismus der äußeren Haarzellen blockiert werden, wodurch der Effekt der Hörminderung durch Salizylat erklärt wird (Kakehata und Santos-Sacchi 1996; Tunstall et al., 1995; Wecker und Laubert, 2004). Alternativ wurde vorgeschlagen, dass Salizylat auf die NMDA-Rezeptoren des auditorischen Nervens in der Postsynapse (Ruel et al., 2008), bzw. den Spiralganglien (Peng et al., 2003) wirkt oder über die Blockade von inhibitorischen GABAergen Efferenzen (Panford-Walsh, 2007) die Hörfähigkeit beeinflusst. Offenbar als Folge all dieser Salizylataktivitäten wurde eine Schwellenverschiebung von 20-30 dB SPL im primären Hörkortex

(AI) nach Salizylat-Behandlung bei Versuchstieren beschrieben (Ochi und Eggermont, 1996).

Auch die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse reproduzieren den Hörverlust nach Natrium-Salizylat-Applikation. Sowohl die Kontrolltiere, als auch die mit dem PDE-5-Inhibitor behandelten Tiere wiesen in den frequenzspezifischen und frequenzunspezifischen Hörmessungen einen reversiblen Hörverlust von durchschnittlich 20 dB nach Applikation von Natrium-Salizylat (vergleichbar mit den Studien von Ochi und Eggermont, 1995) auf. In der Ausprägung des Hörschwellenverlusts unterschieden sich Kontroll- und Versuchsgruppe nur gering. Lediglich nach Langzeitapplikation von PDE-5-Inhibitor und Natrium-Salizylat ergeben sich einige Unterschiede. So ist die Hörschwelle in der BERA-Messung nach „Klick-Reiz“-Stimulation 30 Stunden post Salizylat bei den mit dem PDE-5-Inhibitor behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt. Statistisch kann hier jedoch nur eine Tendenz, keine Signifikanz ausgemacht werden [$13.8 \text{ dB} \pm 10.37 \text{ dB}$ (PDE-5-Inhibitor) gegen $20.5 \text{ dB} \pm 4.14 \text{ dB}$ (Saline), $n=8$, n.s.]. In den frequenzspezifischen Hörmessungen zeigt sich nach der Langzeitapplikation das umgekehrte Bild: Hier scheint die Kontrollgruppe bei Einzelbetrachtung einiger Frequenzen eine tendenziell, teilweise auch signifikant, niedrigere Hörschwelle zu haben als die Versuchsgruppe. In der Gesamtbeurteilung der frequenzspezifischen Hörmessungen relativiert sich dieser Eindruck jedoch: Es kann zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss des PDE-5-Inhibitors auf die Hörschwellen gefunden werden. Die Kontroversität der Ergebnisse erschwert die Interpretation, legt aber den Schluss nahe, einen signifikanten Effekt von PDE-5-Inhibitoren auf einen durch Natrium-Salizylat erzeugten Hörverlust auszuschließen. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf eine detaillierte Studie in der ein identischer PDE-5-Inhibitor auf Tinnitus, durch akustisches Trauma verursacht, getestet wurde, durchaus interessant. So zeigen unveröffentlichte Ergebnisse, dass der PDE-5-Inhibitor aus der vorliegenden Studie, vor einem Schalltrauma appliziert, signifikant protektive Effekte zeigt. Weitere Studien zu den Unterschieden zwischen Salizylat-induziertem Hörverlust und Hörverlust

durch Schalltrauma werden Aufschluss geben, ob Tinnitus tatsächlich auf der Ebene von Haarzellen und Hörnerv über unterschiedliche Signalwege ausgelöst wird.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Studie dargestellten Ergebnisse keinen Effekt von PDE-5-Inhibitoren auf die Tinnitusinduktion und den Hörverlust durch Salizylat. Dieses Ergebnis weist aber – zusammen mit den in einer parallelen Studie beobachteten positiven Effekten des gleichen PDE-5-Inhibitors auf Tinnitus und Hörverlust durch akustisches Trauma – erstmals auf verschiedene Signalwege mit denen Noxen in Haarzellen und Hörnerv akustische Fehlwahrnehmungen induzieren können hin.

5. Zusammenfassung

Als Tinnitus beschreibt man eine Phantomwahrnehmung aufgrund einer Fehlfunktion des auditorischen Systems. Von Tinnitus sind mehr als 8% der Bevölkerung in Industriestaaten betroffen. Tinnitus kann bei Menschen und Tieren durch akustisches Trauma, aber auch durch hohe Konzentrationen von Salizylat (Aspirin®) ausgelöst werden. Im Hinblick auf die Suche nach neuen Therapien ist die endogene Neuroprotektion von besonderem Interesse. Bei der endogenen Neuroprotektion kommt dem durch Ca^{2+} -Einstrom aktivierten NO/cGMP/PKG-Signalweg eine besondere Bedeutung zu. In In-vitro-Experimenten verschiedener Autoren wurde nachgewiesen, dass der NO/cGMP/PKG-Signalweg in den Haarzellen über einen Rückkopplungsmechanismus einen Trauma-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Haarzellen blockiert. Mögliche toxische intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen können dadurch reduziert, und die Zellen so geschützt werden. Darüber hinaus konnten NO-synthetisierende Enzyme und NOS-Aktivität in cochleären Neuronen und Haarzellen nachgewiesen werden. Um eine putativ protektive Funktion des NO/cGMP/PKG-Signalweges auf ototoxische Traumata zu prüfen, bietet sich eine pharmakologische Manipulation des cGMP-Spiegels, zum Beispiel durch PDE-5-Inhibitoren, an. Vorstudien zeigen, dass cGMP im Innenohr, besonders in den Haarzellen, vor allem durch PDE-5 hydrolysiert wird. In der vorliegenden Studie wurde daher ein eingesetzt um den Einfluss der Verstärkung des zytoprotektiven Signalwegs auf Salizylat-induzierten Tinnitus zu prüfen. Die Studie wurde mit 20 Ratten durchgeführt, die über drei Monate in einem Verhaltensmodell für Tinnitus konditioniert wurden. Der Effekt des s auf das Hörvermögen und Tinnitus nach Salizylatrauma wurde im Akut- und im Langzeittest studiert. Im Akut-

Test wurde der direkt im Anschluss an die Gabe von Salizylat appliziert. Im Langzeittest wurde der PDE-5-Inhibitor an fünf aufeinander folgenden Tagen mehrfach täglich verabreicht. An zwei der fünf Tagen wurde mit Salizylat Tinnitus erzeugt. In diesem Test sollte explizit die Abklingphase von Hörverlust und Tinnitus nach Tagen und Wochen beobachtet werden. In beiden Tests konnte nach statistischer Auswertung von Tinnitusverhalten und Hörmessung im Vergleich von - und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen zeigte der auf den Salizylat-induzierten Hörverlust und korrelierten Tinnitus keinen Einfluss. Interessanterweise zeigte sich in einer parallelen Studie, in der die Wirkung des gleichen PDE-5-Inhibitors unter vergleichbaren Bedingungen auf die Hörfunktion von Ratten nach akustischem Trauma getestet wurde, ein signifikanter Effekt: Die Hörfähigkeit blieb hier im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant besser erhalten. Bewertet man das Ergebnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie im Kontext dieses parallel erbrachten Befundes, so deutet sich an, dass Salizylat und akustisches Trauma einen Hörverlust und Tinnitus möglicherweise über unterschiedliche Signalwege induzieren. Das Ausbleiben eines Effekts der -Behandlung auf Salizylat-induzierten Tinnitus und Hörverlust in der vorliegenden Studie ist ein weiterer, interessanter Befund, der einen besseren Einblick in die therapeutischen Strategien bei der Behandlung von Hörverlust und Tinnitus gewährt.

6. Literaturverzeichnis

Berridge, M J, Bootman M D, Lipp P (1998). "Calcium-a life and death signal." *Nature* 395:645-8.

Cazals, Y (2000) "Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate." *Progress in neurobiology* 62:583-631.

Chen, G D and P J Jastreboff. (1995) "Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats." *Hearing research* 82:158-78.

Ciani E, Guidi S, Bartesaghi R, Contestabile A (2002) "Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide." *Journal of neurochemistry* 82:1282-9.

Ciani E, Guidi S, Della Valle G, Perini G, Bartesaghi R, Contestabile A, et al. (2002) "Nitric oxide protects neuroblastoma cells from apoptosis induced by serum deprivation through cAMP-response element-binding protein (CREB) activation." *The Journal of biological chemistry* 277:49896-902.

Clementi E (1998) "Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis." *Biochemical pharmacology* 55:713-8.

Deora A A, Win T, Vanhaesebroeck B, and Lander H M (1998) "A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress." *The Journal of biological chemistry* 273:29923-8.

Dobie R A (2003) "Depression and tinnitus." *Otolaryngologic clinics of North America* 36:383-8.

Eggermont J J and Kenmochi M (1998) "Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex." *Hearing research* 117:149-60.

Ehret G, Fischer R (1991) "Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression." *Brain research* 567:350-4.

Fessenden J D, Schacht J (1998) "The nitric oxide/cyclic GMP pathway: a potential major regulator of cochlear physiology." *Hearing research* 118:168-76.

Fessenden J D, Altschuler R A, Seasholtz A F, Schacht J (1999) "Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the peripheral and central auditory system of the rat." *The Journal of comparative neurology* 404:52-63.

Franz P, Hauser-Kronberger C, Böck P, Quint C, Baumgartner W D (1996) "Localization of nitric oxide synthase I and III in the cochlea." *Acta otolaryngologica* 116:726-31.

Friauf E (1992) "Tonotopic Order in the Adult and Developing Auditory System of the Rat as Shown by c-fos Immunocytochemistry." *Eur J Neurosci* 4:798-812.

Haby C, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J (1994) "Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells." *Journal of neurochemistry* 62:496-501.

Heinrich U-R, Maurer J, Mann W (2004) "Evidence for a possible NOS back-up system in the organ of Corti of the guinea pig." *Head and Neck Surgery* 261:121-8.

Hess A, Bloch W, Arnhold S, Andressen C, Stennert E, Addicks K (1998) "Nitric oxide synthase in the vestibulocochlear system of mice." *Brain research* 813:97-102.

Hess A, Bloch W, Huverstuhl J, Su J, Stennert E, Addicks K et al. (1999) "Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanic endotoxin-treatment." *Brain research* 830:113-22.

Hopper, Rachel A and Garthwaite J (2006) "Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:11513-21.

Hughes P, Dragunow M (1995) "Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system." *Pharmacological reviews* 47:133-78.

Ignarro LJ (1999) "Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology." *Bioscience reports* 19:51-71.

Ignarro LJ (2002) "Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview." *Journal of physiology and pharmacology* 53:503-14.

Jastreboff PJ, Sasaki CT (1986) "Salicylate-induced changes in spontaneous activity of single units in the inferior colliculus of the guinea pig." *The Journal of the Acoustical Society of America* 80:1384-91.

Jastreboff PJ, Sasaki CT (1994) An animal model of tinnitus: a decade of development. *The American journal of otology*, 15, 19-27.

Takehata S, Santos-Sacchi J (1996) "Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge." *The Journal of neuroscience* 16:4881-9.

Kaltenbach, James A, Mark A Zacharek, Jinsheng Zhang, and Frederick S. 2004. "Activity in the dorsal cochlear nucleus of hamsters previously tested for tinnitus following intense tone exposure." *Neuroscience letters* 355(1-2):121-5.

Kaltenbach JA, Jinsheng Zhang, Finlayson P (2005) "Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus." *Hearing research* 206:200-26.

Kiang NY, Moxon EC, Levine RA (1970) "Auditory-nerve activity in cats with normal and abnormal cochleas." *Ciba Foundation symposium*:241-73.

Lieberman MC, Kiang N Y (1978) "Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity." *Acta oto-laryngologica. Supplementum* 358:1-63.

Lobarinas E, Wei Sun, Cushing R, Salvi R. (2004) "A novel behavioral paradigm for assessing tinnitus using schedule-induced polydipsia avoidance conditioning (SIP-AC)." *Hearing research* 190:109-14.

Lockwood AH, Salvi RJ, Burkard RF (2002) "Tinnitus." *The New England journal of medicine* 347:904-10.

Loscalzo J, Welch G (1995) "Nitric oxide and its role in the cardiovascular system." *Progress in cardiovascular diseases* 38(2):87-104.

Ma, W-LD, Hidaka H, Bradford JM (2006) "Spontaneous activity in the inferior colliculus of CBA/J mice after manipulations that induce tinnitus." *Hearing research* 212:9-21.

Mahlke C, Wallhäusser-Franke E (2004) "Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry." *Hearing research* 195:17-34.

McFadden D, Plattsmier HS (1984) "Aspirin abolishes spontaneous otoacoustic emissions." *The Journal of the Acoustical Society of America* 76:443-8.

McFadden D, Plattsmier HS, Pasanen EG (1984) "Aspirin-induced hearing loss as a model of sensorineural hearing loss." *Hearing research* 16:251-60.

Michel O, Hess A, Bloch W, Stennert E, Su J, Addicks K et al. (1999) "Localization of the NO/cGMP-pathway in the cochlea of guinea pigs." *Hearing research* 133:1-9.

Moncada S (1992) "The L-arginine nitric oxide pathway." *Acta physiologica Scandinavica* 145:201-27.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacological reviews* 43:109-42.

Møller, Aage R (2003) "Pathophysiology of tinnitus." *Otolaryngologic clinics of North America* 36:249-66, v-vi.

Mulheran M (1999) "The effects of quinine on cochlear nerve fibre activity in the guinea pig." *Hearing research* 134:145-52.

Müller M, Klinke R, Arnold W, Oestreicher E (2003) "Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited." *Hearing research* 183:37-43.

Myers EN, Bernstein JM. (1965) "Salicylate ototoxicity; a clinical and experimental study." *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)* 82:483-93.

Ochi K, Eggermont JJ. (1996) "Effects of salicylate on neural activity in cat primary auditory cortex." *Hearing research* 95:63-76.

Panford-Walsh R, Singer W, Rüttiger L, Hadjab S, Tan J, Knipper M (2008) "Midazolam Reverses Salicylate Induced Changes in BDNF and Arg3.1 Expression: Implications for Tinnitus Perception and Auditory Plasticity." *Mol Pharmacologie* 2008 Jun 4

Peng BG, Chen W, Lin X (2003) "Aspirin selectively augmented N-methyl-D-aspartate types of glutamate responses in cultured spiral ganglion neurons of mice." *Neuroscience Letter* 343:21-4.

Riemann R, Reuss S (1999) "Nitric oxide synthase in identified olivocochlear projection neurons in rat and guinea pig." *Hearing Research* 135:181-9.

Ruel J, Chabbert C, Nouvian R, Puel JL (2008) "Salicylate enables cochlear arachidonic-acid-sensitive NMDA receptor responses" *Neuroscience* 28:7313-23.

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

Shen J, Harada N, Nakazawa H, Kaneko T, Izumikawa M, Yamashita T (2006) "Role of nitric oxide on ATP-induced Ca^{2+} signaling in outer hair cells of the guinea pig cochlea." *Brain Research* 1081:101-12.

Shen J, Harada N, Nakazawa H, Yamashita T (2005) "Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca^{2+} signalling in cochlear inner hair cells." *Eur J Neuroscience* 21:2912-22.

Stypulkowski PH (1990) "Mechanisms of salicylate ototoxicity." *Hearing research* 46:113-45.

Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang D.M. (2000) Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hearing research*, 140:91-8.

Tunstall MJ, Gale JE, Ashmore JF (1995) "Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea." : *The Journal of physiology*, 485:739-52.

Wallhäusser-Franke E (1997) "Salicylate evokes c-fos expression in the brain stem: implications for tinnitus." *Neuroreport* 8:725-8.

Wallhäusser-Franke E, Mahlke C, Oliva R, Braun S, Wenz G, Langner G et al. (2003) "Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus." *Experimental brain research* 153:649-54.

Wazen JJ, Foyt D, Sisti M (1997) "*Selective cochlear neurectomy for debilitating tinnitus.*"

Ann Otol Rhinol Laryngology 106:568-70.

Wecker, H and Laubert A, 2004. "Reversible hearing loss in acute salicylate intoxication." *HNO* 52:347-51.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-Triphosphat
AC	auditorischer Kortex
BERA	Brain Stem Evoked Response Audiometrie
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	ionisiertes Kalzium
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
DCN	dorsaler Nucleus cochlearis
KHz	Kilohertz
IC	Colliculus inferior
MGB	Corpus geniculatum mediale
NMDA-R	Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickoxid-Synthase
PK	Proteinkinase
PKG	Proteinkinase G
PDE	Phosphodiesterase
SCY	Salizylat
sGC	lösliche Guanylyl-Zyklase
SFR	spontane Feuerrate
SPL	Schalldruckpegel gemessen in Dezibel
u.a.	unter anderem

8. Danksagungen

Hiermit möchte ich ganz herzlich all denjenigen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Professor Marlies Knipper gilt der Dank, mir dieses Thema zur Verfügung gestellt und mich mit großer Ausdauer in der Ausarbeitung von Fragestellungen, Struktur und Formulierung dieser Arbeit angeleitet zu haben.

Dr. Lukas Rüttiger hat als direkter Betreuer sicher den größten Teil an Unterstützung beigetragen und stand mir sowohl bei der Versuchsdurchführung als auch später bei der Auswertung der Ergebnisse und der Fertigstellung der Arbeit mit Rat, Tat und diversen Notrationen aus Verpflegungsschublade zur Seite.

Nina Kraus danke ich für ausdauernde, teils nächtlichen Korrekturen und die ein oder andere Motivationshilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aus der Arbeitsgruppe Knipper bedanken, die mich bei der Durchführung der Experimente aktiv oder durch Gesellschaft bei Kaffee- und Mittagspausen unterstützten. Vor allem Anna Vieljahns, Jelka Zimmermann, die Zivis Simon und Jan, sowie Mirko Jaumann gilt es hier persönlich zu erwähnen.

Zuletzt danke ich noch meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer persönlich und finanziell unterstützt haben und so diese Arbeit und mein Studium erst ermöglichten.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am	24.08.1979
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1999	Abitur an der Viktoriaschule Aachen
------	-------------------------------------

Zivildienst

März 2000 - März 2001	Zivildienst und Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst, Aachen
-----------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Berufsausbildung

Oktober 2001 - August 2002	Anerkennungsjahr zum Rettungsassistenten bei der Berufsfeuerwehr Ahaus
Mai 2001 - Oktober 2001	Theoretische Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Rettungsdienstschule des DRK in Münster

Hochschulstudium

14.11.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)
Oktober 2005 - November 2008	Studium der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
Oktober 2002 - Oktober 2005	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

