

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
"Otto Körner" Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Pau

**Machbarkeitsstudie einer Gefrierschliffmethode am Beispiel
humaner und oviner Felsenbeinpräparate**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Herrmann, Anne
geb. in Braunschweig
aus Köln

Rostock, 2008
urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0044-0

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Gutachter:
2. Gutachter:
3. Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
TABELLENVERZEICHNIS.....	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	11
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	13
2.1 ANATOMIE DES HÖRORGANS.....	13
2.1.1 Äußeres Ohr.....	13
2.1.2 Mittelohr.....	14
2.1.3 Innenohr.....	14
2.1.3.1 Schallaufnahmeapparat.....	15
2.2 PHYSIOLOGIE DES GEHÖRS.....	16
2.3 COCHLEAR-IMPLANTATE.....	19
2.3.1 Aufbau und Funktion eines Cochlear-Implantates.....	19
2.3.2 Klassifikation von Cochlear-Implantaten.....	20
2.3.2.1 Stimulationsverfahren.....	21
2.3.2.2 Sprachkodierungsstrategien.....	22
2.3.2.3 Stimulationsmodi.....	22
2.4 ELEKTRODENGOMETRIEN.....	23
2.4.1 Aufbau der CI-Elektroden.....	23
2.4.2 Elektrodenlokalisierung.....	24
2.4.3 Zugangswege der Elektrodeninsertion.....	25
2.4.4 Insertionstiefe der Elektroden.....	25
2.4.5 Elektro-akustische Stimulation.....	26
2.4.6 Cochlear.....	27
2.4.6.1 Nucleus Mini 22 Array.....	27
2.4.6.2 Nucleus Straight Elektrodenarray.....	28
2.4.6.3 Nucleus 24 Double Array.....	28
2.4.6.4 Nucleus 24 Contour Array.....	28
2.4.6.5 Nucleus 24 Contour Advance Array.....	29
2.4.6.6 Nucleus 24k Array.....	29
2.4.7 MED-EL.....	29
2.4.7.1 Combi 40 Elektrodenarray.....	29
2.4.7.2 Standard Elektrodenarray.....	30
2.4.7.3 Compressed Elektrodenarray und Split Elektrodenarray.....	30
2.4.7.4 Medium Elektrodenarray.....	30
2.4.7.5 Flex EAS Elektrodenarray.....	30
2.4.8 Advanced Bionics.....	31
2.4.8.1 Hi Focus 1j Elektrodenarray.....	31
2.4.8.2 Hi Focus Helix Elektrodenarray.....	31
2.4.9 MXM.....	32
2.4.9.1 Digisonic Elektrodenarray.....	32
2.4.9.2 Digisonic DX10 Elektrodenarray.....	32
2.4.9.3 Digisonic DX 10/SP Elektrodenarray.....	32
2.4.10 Philips.....	33
2.4.10.1 Laura Prothesen Elektrodenarray.....	33
2.4.10.2 Laura Flex Elektrodenarray.....	33
2.5 KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN DER MECHANISCHEN FUNKTIONALITÄT DER ELEKTRODENINSERTION AM FELSSENBEIN.....	34
2.5.1 Methodik und Problematik operativer Zugangswege zur Scala tympani.....	34
2.5.2 Elektrodeninsertion.....	35
2.5.2.1 Methodik der Elektrodeninsertion.....	35
2.5.2.2 Hilfsmittel zur Elektrodeninsertion.....	37
2.6 METHODIK UND DOKUMENTATION DER ELEKTRODENINSERTION AM POST-MORTEM-FELSSENBEINPRÄPARAT.....	40

2.7	HISTOLOGISCHE PRÄPARATIONSMETHODEN.....	41
2.7.1	Probenvorbereitung	42
2.7.1.1	Präparateinbettung	42
2.7.1.2	Kryopräparation	43
2.7.2	Schnittpräparation	43
2.7.3	Schliffpräparation	44
3	MATERIAL UND METHODEN.....	45
3.1	FELSENBEINPRÄPARATE	46
3.2	OPERATIVER ZUGANGSWEG	48
3.3	KRYOSCHLEIFVORRICHTUNG.....	50
3.3.1	Konstruktive Auslegung der Kryoschleifvorrichtung	51
3.3.1.1	Optimierung der Kryoschleifvorrichtung.....	53
3.4	KÜHLPROZEDUR	55
3.4.1	Kryoschliffpräparation.....	55
3.4.2	Zwischenlagerung	55
3.4.3	Temperatur-Zeit-Verhalten im Schliffpräparat.....	55
3.5	KRYOSCHLIFFPRÄPARATION	57
3.5.1	Schliffpräparation	58
3.5.1.1	Ermittlung der Präparatplanarität.....	59
3.5.2	Präparatfixierung	59
3.5.2.1	Wasserauffüllung	60
3.5.2.2	Zahnfüllungskomposit	62
3.5.2.3	Modellierwachs	62
3.6	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	62
3.6.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	63
3.6.1.1	Modifizierte Hämalaun-Eosin-Färbung	63
3.6.2	Toluidinblaufärbung	64
3.6.3	Immunhistochemische Färbung von „Tissue Prints“	64
3.6.3.1	„Tissue Printing“	64
3.6.3.2	Versuchsdurchführung „Tissue Printing“	66
3.6.3.3	Versuchsdurchführung immunhistochemische Färbung	67
3.7	DOKUMENTATION.....	69
3.7.1	Makroaufnahmen	69
3.7.2	Lichtmikroskopie	70
3.7.2.1	Auflichtmikroskopie	70
3.7.2.2	Projektionsmikroskopie	71
3.7.3	Kontaktendoskopie	72
3.7.4	Rasterelektronenmikroskopie	74
3.7.5	Probenprotokoll und Datenarchivierung	75
4	ERGEBNISSE	77
4.1	KÜHLPROZEDUR	77
4.1.1	Schliffpräparation	77
4.1.2	Temperatur-Zeit-Verhalten im Schliffpräparat.....	77
4.2	KRYOSCHLIFFPRÄPARATION	78
4.2.1	Präparatfixation.....	78
4.3	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	79
4.3.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	79
4.3.2	Toluidinblaufärbung	82
4.3.3	Immunhistologische Färbung von „Tissue Prints“	84
4.4	DOKUMENTATION.....	90
4.4.1	Makroaufnahmen	90
4.4.2	Auflichtmikroskopie	90
4.4.3	Projektionsmikroskopie.....	91
4.4.4	Kontaktendoskopie	93
4.4.5	Rasterelektronenmikroskopie	93
5	DISKUSSION	96
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	101

7	LITERATURVERZEICHNIS	104
	THESEN	113
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	115
	CURRICULUM VITAE.....	116
	DANKSAGUNG	117
	ANHANG.....	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1a:	Klassifikation kommerziell verfügbarer Cochlear-Implantate, Nucleus/Cochlear
Tabelle 1b:	Klassifikation kommerziell verfügbarer Cochlear-Implantate, Nucleus/Cochlear
Tabelle 2:	Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, MED-EL
Tabelle 3:	Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, Advanced Bionics
Tabelle 4:	Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, MXM, A.B.S.
Tabelle 5 a:	Elektrodengeometrien, Cochlear
Tabelle 5 b:	Elektrodengeometrien, Cochlear
Tabelle 6 a:	Elektrodengeometrien, MED-EL
Tabelle 6 b:	Elektrodengeometrien, MED-EL
Tabelle 7:	Elektrodengeometrien, Advanced Bionics
Tabelle 8:	Elektrodengeometrien, MXM
Tabelle 9:	Elektrodengeometrien, A.B.S. (Philips)
Tabelle 10:	Übersicht der untersuchten Felsenbeinpräparate
Tabelle 11:	Immunhistochemische Färbung Felsenbeinpräparat E
Tabelle 12:	Chemikalien für immunhistochemische Färbung Felsenbeinpräparat E
Tabelle 13:	Arbeitsprotokollbeispiel zur Machbarkeitsstudie der Gefrierschliffpräparation

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: schematische Darstellung der menschlichen Cochlea [24], SV: Scala vestibuli, SM: Scala media, ST: Scala tympani, RM: Reissner'sche Membran, BM: Basilarmembran, StV: Stria vascularis, OC: Corti-Organ, SL: Spiralligament, SpL: Spiallamina, SG: Spiralganglion
- Abbildung 2: grafische Darstellung einer Phonskala mit Isophonen
- Abbildung 3: schematische Darstellung eines Cochlear-Implantates am Beispiel des Melbourne/Cochlear-Implantates [133] mit Richtmikrofon, Sprachprozessor, Antenne und interner Baugruppe
- Abbildung 4: schematische Darstellung einer Beispielelektrode, A = Markierungsring, B = Elektrodenkontakt [29]
- Abbildung 5: Melbourne/Cochlear „multiple electrode“ mit speziell konstruiertem Spatel während der Elektrodeninsertion [133]
- Abbildung 6: Darstellung eines Felsenbeines nach Abtragung der hinteren Gehörgangswand, des Trommelfells sowie Hammer und Amboss; s: Stapes, p: Promontorium, r: Rundfensternische
- Abbildung 7 a: Darstellung des Promontoriums bei Beginn der Knochenabtragung
- Abbildung 7 b: sichtbare „blue line“ (basale Schneckenwindung) während der Präparation
- Abbildung 7 c: Freilegung lateraler Bestandteile der häutigen cochleären Basalwindung
- Abbildung 8: Kryoschleifvorrichtung, schematische Darstellung, A: Kühlmittel, B: Stößel/Nachstellschraube, C: Messingbecher, D: Kryopräparat
- Abbildung 9: Kryoschleifvorrichtung, Draufsicht, A= Messingbecher, B= PTFE-Schutzbecher
- Abbildung 10: Kryoschleifvorrichtung, perspektivische Seitenansicht im montierten Zustand, B= PTFE-Schutzbecher, C= Messingwanne mit Wechselfixierungshülse
- Abbildung 11: Nachstellschraube mit Kerbe und eingefrästen Teilstrichen (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 12: schematische Darstellung der Kryoschleifvorrichtung mit Bohrloch zur Aufnahme eines Kontaktthermometers
- Abbildung 13: humanes Felsenbeinpräparat B, Schliffebene 1 – 250 µm (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 14: ovines Felsenbeinpräparat D mit 96%iger Ethanolspülung, Schliffebene 1 - 3650 µm (makroskopische Aufnahme)
- Abbildung 15: ovines Felsenbeinpräparat D ohne Ethanolspülung, Schliffebene 1 - 3650 µm (makroskopische Aufnahme)

- Abbildung 16: schematische Darstellung der Kryoschleifvorrichtung zur Anfertigung eines „Tissue Prints“, A: Printräger, B: Filterpapier, C: Kryopräparat
- Abbildung 17: Präparat A mit Abschattungen (Makroaufnahme)
- Abbildung 18: starres Kontaktendoskop mit Halterung
- Abbildung 19: Untersuchungsabfolge der humanen Felsenbeinpräparate B und C im Rasterelektronenmikroskop
- Abbildung 20: Temperatur-Zeit-Kurve mit ermitteltem Kryoschliff-Arbeitsbereich
- Abbildung 21: humanes Felsenbeinpräparat B, Schliffebene 1 – 250 µm (projektionsmikroskopische Darstellung)
- Abbildung 22: Standard-H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E (Makroaufnahme)
- Abbildung 23: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E, Spülung mit 70%igem und 96%igem Ethanol (Makroaufnahme)
- Abbildung 24: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E, Spülung nur mit 96%igem Ethanol (Makroaufnahme)
- Abbildung 25: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 2 Minuten (auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)
- Abbildung 26: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 3 Minuten (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 27: Toluidinblaufärbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 2 Minuten (auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)
- Abbildung 28: Toluidinblaufärbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 3 Minuten (auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)
- Abbildung 29: humanes Felsenbeinschliffpräparat E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 30: Gewebeabdruck A des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 31: Gewebeabdruck A des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 32: Gewebeabdruck B des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 33 a: Gewebeabdruck C des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 33 b: Gewebeabdruck C des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 34: Gewebeabdruck D des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)

- Abbildung 35 a: Gewebeabdruck E des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 35 b: Gewebeabdruck E des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 36: humanes Felsenbeinpräparat B ohne Deckglas und Ethanolspülung, Schliffebene 1 - 250 µm (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 37: humanes Felsenbeinpräparat B mit Deckglas und 96%iger Ethanolspülung, Schliffebene 1 – 250 µm (projektionsmikroskopische Aufnahme)
- Abbildung 38: ovines Felsenbeinpräparat D, Ebene 1 - 400 µm (kontaktendoskopische Aufnahme)
- Abbildung 39: humanes Felsenbeinpräparat B mit implantierter CI-Elektrode (REM-Aufnahme im ESEM-Modus)
- Abbildung 40: humanes Felsenbeinpräparat B mit implantierter CI-Elektrode (Standard-REM-Aufnahme)
- Abbildung 41: humanes Felsenbeinpräparat C nach Elektrodenentfernung (Standard-REM-Aufnahme)
- Abbildung 42: schematische Darstellung einer optimierten Schleifvorrichtung, (1) konischer Fixierungsstift, (2) Stellkappe, Messing, (3) Feineinstellung, (4) PTFE-Schutzbecher, (5) Feingewindekolben mit Spindel aus POM, (6) Knochenzylinder, (7) Schleifspalt, (8) Feststellschraube 3 x 120°, (9) Wechselfixierungshülse, (10) Innenwanne, Trockeneis, (11) Aufnahmebecher, (12) Entlüftungsöffnungen
- Abbildung 43: schematische Darstellung einer optimierten Schleifvorrichtung, Querschnitt, (1) Knochenprobe, (2) Aufnahmebecher, (3) Wechselhülse, (4) Kolben mit Feingewinde

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Advanced combination encoders
AG	Antigen
AK	Antikörper
AOS	Advance-off-stylett
AP	Aktionspotenzial
APh	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BP	Bipolar
CG	Common ground
CI	Cochlear-Implantat
CIS	Continuous interlieved sampling
CO ₂ solid	Trockeneis
CsI	Cäsium-Iodid
dest.	Destilliert
E	Extern
EAS	Elektro-akustische Stimulation
ESEM	Environmental scanning electron microscope
f	Brennweite
FFT	Fast fourier transformation
FRS	Fast Rate Stimulation
Gl.	Glandula
H.-E.-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
Hg	Quecksilber
k	Auszugslänge
Lig.	Ligamentum
M	Abbildungsmaßstab
M.	Musculus
MP	Monopolar
MRS	Multi rate stimulation
N.	Nervus
NaCl	Natrium-Chlorid
NBT	Nitro blue tetrazolium
NRT	Neural response telemetry
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PPS	Paired pulsatile stimulation
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFM	Membran des runden Fensters
RP	Rezeptorpotenzial
RT	Raumtemperatur
SPEAK	Spektrale Maxima, interlieved pulsatile strategy
TBS	Tris buffered saline
v.	Venae
XBO	Xenon-Kurzbogenlampen

1 Einleitung

Akustische Wahrnehmungen infolge elektrischer Stimulation des Hörnervs wurden erstmals 1800 von Volta beschrieben und stellen eine wichtige Voraussetzung für die heutige Versorgung mit Cochlear-Implantaten (CI) dar [28]. Duchenne of Boulogne (1855) verwendete zur elektrischen Stimulation Wechselstrom. 1868 optimierte Brenner diese Stimulationsmethode und entdeckte eine bessere Hörwahrnehmung durch elektrische Impulse, die in einer negativen Polarisierung des Ohres resultierten. Dazu erfolgte eine bipolare Stimulation durch eine Elektrode im Meatus acusticus externus und eine weiter distal lokalisierte Referenzelektrode [28]. Die erste erfolgreiche Cochlear-Implantation erfolgte 1978 an der Universität Melbourne/Australien durch Prof. Graeme Clark [24]. In Deutschland führten Banfai und Mitarbeiter 1979 (Köln-Düren) erstmals Cochlear-Implantationen an Patienten durch [13].

Cochlear-Implantate erfahren besonders seit etwa den letzten 15 Jahren eine zunehmende Verbreitung [78]. Weltweit sind bereits bis 2002 über 30 000 Patienten mit einem Cochlear-Implantat versorgt worden [64]. Indiziert sind Cochlear-Implantate bei (funktionell) ertaubten Patienten und zunehmend, in Indikationserweiterung, ebenfalls bei Resthörigkeit [78, 85]. Infolge der Elektrodeninsertion können u. a. Traumen wie Dislokationen und Frakturen der Membranen erfolgen [24], die zu einer zusätzlichen Hörminderung führen können. Daher ist bei der Elektrodeninsertion eine Minimierung der insertionsbedingten Traumen durch ein schonendes Verfahren zu gewährleisten. Hierzu gibt es verschiedene Insertionsmethoden sowie Elektrodentypen, zu denen kontinuierlich Studien und Weiterentwicklungen erfolgen. Bevor eine neu entwickelte Elektrode bei einem Patienten in-vivo implantiert werden kann, sind histologische ex-vivo-Untersuchungen an implantierten Felsenbeinen notwendig. Sie dienen bevorzugt der Evaluation von insertionsbedingten Traumen. Für solche Untersuchungen sollte ein Felsenbein möglichst nativ und ohne präparationsbedingte Artefakte sein. Meist werden jedoch Untersuchungen an eingebetteten, implantierten Felsenbeinen vorgenommen, die präparationsbedingte Artefakte aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob es möglich ist, native, unfixierte Präparate mit einer völlig neu konzipierten, schonenden Gefrierschlifftechnik zu untersuchen. Dazu soll das Verfahren möglichst so optimiert werden, dass gut beurteilbare, aussagekräftige Schliffebenen erzielt werden, die jederzeit Aussagen über die Lage des Implantates zulassen bzw. den Zustand der cochleären Weichteile beurteilen lassen.

In Erweiterung zu dieser Arbeit wurden Insertionen mit einer neuen Elektrodenform, der sog. endostealen Elektrode, durchgeführt. Ergänzend dazu sollen aus makroskopischen, rasterelektronen-, projektions-, auflichtmikroskopischen und kontaktendoskopischen Aufnahmen die geeigneten Untersuchungsmethoden ermittelt werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Anatomie des Hörorgans

Die Präparation der Innenohrschnecke und die folgende Insertion der Cochlear-Implantat (CI)-Elektrode bedürfen außerordentlicher operativer Erfahrung. Grundlage für den Operateur bilden detaillierte anatomische Kenntnisse über das Hörorgan. Eine umfangreiche und qualitativ hochwertige Sammlung histologischer Schläfenbeinschnitte wie z. B. die von *Karl Wittmaack* ermöglicht ein vorbereitendes und vertiefendes Studium der Anatomie und Pathologie des Ohres und der umgebenden Strukturen [105]. Darüber hinaus sind zur Erweiterung der Kenntnisse des angehenden Operateurs entsprechende Präparationen an ex-vivo-Felsenbeinen Voraussetzung.

Das Hörorgan besteht aus dem äußeren Ohr (Auris externa), dem Mittelohr (Auris media) und dem Innenohr (Auris interna, Labyrinth). Auris externa und media dienen als funktionelle Einheit der Schallleitung. Auris interna, Nervus vestibulocochlearis und die Hörbahn übernehmen die Funktion eines Schallempfindungsapparates.

2.1.1 Äußeres Ohr

Die Ohrmuschel (Auricula), der äußere Gehörgang (Meatus acusticus externus) und das Trommelfell (Membrana tympanica) bilden das äußere Ohr. Das formstabile Grundgerüst der Ohrmuschel wird von einem Skelett aus elastischem Knorpel (Cartilago auriculae) gebildet und geht kontinuierlich in den Knorpel des äußeren Gehörganges (Cartilago meatus acustici externi) über. Der knöcherne Teil des Meatus acusticus externus liegt im Schläfenbein (Os temporale). Das Trommelfell ist eine flach trichterförmige Membran, die den äußeren Gehörgang gegen die Paukenhöhle abgrenzt und funktionell der Schallankopplung dient.

2. 1. 2 **Mittelohr**

Das Mittelohr ist ein System pneumatisierter Räume, das an der Außenseite der Schläfenbeinpyramide lokalisiert ist [119]. Zum Mittelohr gehören die Paukenhöhle (Cavum tympani), die Gehörknöchelchen (Ossicula tympani), die Ohrtrumpete (Tuba auditiva) und die Warzenfortsatzzellen (Cellulae mastoideae).

Die Paukenhöhle ist ein Hohlraum, der in 3 Etagen (Hypotympanon, Mesotympanon, Epitympanon) eingeteilt und von 6 Wänden (lateral: Paries membranaceus; medial: Paries labyrinthicus; oben: Tegmen tympani; unten: Paries jugularis; vorne: Paries caroticus; hinten: Paries mastoideus) begrenzt wird.

Über eine Öffnung sind die Cellulae mastoideae mit dem Recessus epitympanicus der Paukenhöhle verbunden. Die Cellulae mastoideae sind pneumatisierte Räume des Warzenfortsatzes.

Die drei Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) sind im Epi- und Mesotympanon der Paukenhöhle lokalisiert und bilden eine knöcherne, syndesmotisch verbundene, Kette. Durch sie werden Schwingungen des Trommelfelles auf den perilymphatischen Raum des Labyrinthes übertragen. Dies wird u. a. durch die feste Verbindung des Hammers mit dem Trommelfell, dessen gelenkige Verbindung mit dem Amboss und die Einhängung der Basalplatte des Stapes in das ovale Fenster (direkter Kontakt zum Innenohr) gewährleistet.

Die Ohrtrumpete (Tuba auditiva, Eustachi'sche Röhre) verbindet die Paukenhöhle mit dem Epipharynx und hat funktionelle Bedeutung für die Belüftung des Mittelohres.

2. 1. 3 **Innenohr**

Das Innenohr ist in der Felsenbeinpyramide lokalisiert und beinhaltet den Schallaufnahmeapparat und das Gleichgewichtsorgan. Formvorgebend ist das innere membranöse Labyrinth, das an drei Stellen von der Form des äußeren knöchernen Labyrinths abweicht: Vestibulum mit Fenestra vestibuli, Bildung von Scala vestibuli und Scala tympani durch den Modiolus, Canaliculus cochleae. Das membranöse Labyrinth ist mit Endolymphe (kaliumreich, natriumarm) gefüllt und wird von Perilymphe (kaliumarm, natriumreich) umgeben. Das osseäre Labyrinth hat eine topografische Nähe zur Paukenhöhle und zur hinteren und mittleren Schädelgrube sowie zu den Cellulae mastoideae.

2. 1. 3. 1 Schallaufnahmeapparat

Der Schallaufnahmeapparat besteht aus der Cochlea mit den zugehörigen Untereinheiten Ductus cochlearis und Corti-Organ. Die Cochlea (Schnecke) ist ein Knochenkanal, der sich in 2,5 Windungen (gegen den Uhrzeigersinn) um den Modiolus (knöcherne Längsachse) dreht und in der Cupula cochleae (Schneckenkuppel) endet. Die Lamina spiralis ossea zeigt von dem Modiolus zentrifugal in den Schnecken gang und teilt, über eine Verbindung mit der lateralen Schnecken gangswand durch die membranöse Lamina basilaris (Basilarmembran) und das Ligamentum spirale cochleae, den Schnecken gang in 2 Etagen. Diese kommunizieren an der Schneckenspitze (Helicotrema) miteinander. Die obere Etage ist die Scala vestibuli, die den Ductus cochlearis (Scala media) enthält und sich in den Vorhof eröffnet. Über das ovale Fenster besteht eine Verbindung zur Paukenhöhle. Die untere Etage ist die Scala tympani, die am runden Fenster endet. Der membranöse Ductus cochlearis ist mit Endolymphe gefüllt und wird durch die Reissner'sche Membran (Membrana vestibularis) von der Scala vestibuli abgegrenzt. Er endet blind am Helicotrema. Den Boden bildet die Basilarmembran, auf der das eigentliche Hörorgan (Organum spirale, Corti-Organ) lokalisiert ist (Abb. 1).

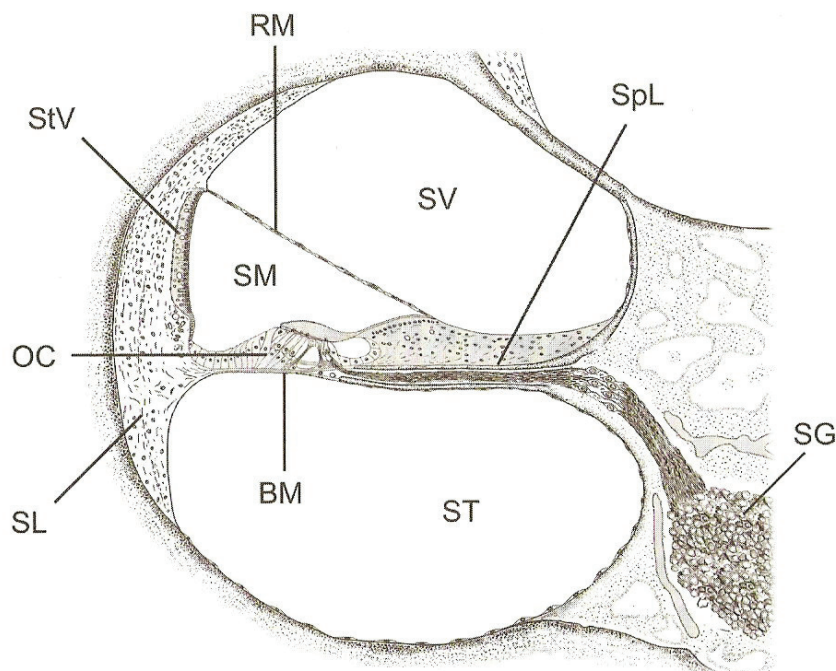


Abb. 1: schematische Darstellung der menschlichen Cochlea [24], SV: Scala vestibuli, SM: Scala media, ST: Scala tympani, RM: Reissner'sche Membran, BM: Basilarmembran, StV: Stria vascularis, OC: Corti-Organ, SL: Spiralligament, SpL: Spiallamina, SG: Spiralganglion

Das Corti-Organ besteht aus Sinnes- (innere und äußere Haarzellen) und Stützzellen (Phalangen- und Pfeilerzellen) und wird von der Membrana tectoria bedeckt. Auf der Distanz von der Schneckenbasis zur Spitze unterliegen diese Zellen u. a. Längen- und Anzahländerungen [108]. Die insgesamt zahlenmäßig deutlich weniger vertretenen inneren Haarzellen (ca. 3 500) liegen medial und grenzen an den Sulcus spiralis internus [87]. An der Oberfläche tragen sie 50 - 60 Sinneshärchen. Die in einer Reihe angeordneten inneren Haarzellen werden von inneren Phalangenzellen gestützt. Die äußeren Haarzellen (ca. 12 000) liegen weiter lateral in 3 - 5 Reihen angeordnet [87]. Sie werden durch äußere Phalangenzellen gestützt. Die längsten der an der Oberfläche sitzenden Sinneshärchen (60 - 120) sind mit der Membrana tectoria verklebt. Zwischen den Haarzellen und den Phalangenzellen befinden sich die Pfeilerzellen. Die inneren und äußeren Haarzellen sind über Synapsen mit Nervenfasern verbunden. Afferente Fasern sind nur mit den inneren Haarzellen verbunden, während die efferenten Nervenfasern hauptsächlich mit den äußeren Haarzellen Synapsen bilden. Insgesamt sind etwa 95 % der Nervenfasern mit den inneren Haarzellen verbunden. Die Nervenfasern bilden gemeinsam den N. cochlearis, dem sich die Nervenfasern des Vestibularapparates (N. vestibularis) im osseären inneren Gehörgang anlagern und so den rein sensorischen N. vestibulocochlearis (N. VIII) bilden. Das Ligamentum spirale cochleae ist eine Verankerung der Basilarmembran mit der osseären Außenwand und bildet die membranöse laterale Wand des Schneckenganges. An der Innenseite ist das Ligamentum spirale cochleae von mehrschichtigem isoprismatischem oder plattem Epithel bedeckt, in und unter dem die Stria vascularis (Blutgefäßgeflecht) lokalisiert ist. Hier erfolgt die Bildung der Endolymphe.

2.2 Physiologie des Gehörs

Von dem Zeitpunkt der Schallentstehung bis zum Hörerlebnis werden zahlreiche Schritte eines komplexen physiologischen Prozesses durchlaufen. Die Fähigkeit des Hörens hat Auswirkungen auf verschiedene physische und soziale Bereiche und beeinflusst das psychische Wohlbefinden.

Das äußere Ohr mit Ohrmuschel und Meatus acusticus externus dient der Schallaufnahme und erleichtert das Richtungshören. Treffen Schallwellen (Longitudinalwellen) auf das Ohr, funktioniert dieses als Trichter und bündelt die Wellen. Die Schallwellen werden durch die Strukturen des äußeren Ohres und das Trommelfell modifiziert, so dass am Trommelfell ein verändertes Schallwellenmuster als Stimulus wirkt. Der mit dem Trommelfell fest verbundene Hammer wird durch den Schall in Bewegung versetzt, die auf den Amboss und den Steigbügel übertragen wird. Der Schall wird durch

2 Theoretische Grundlagen

die Bewegung der Fußplatte des Steigbügels auf das ovale Fenster weitergeleitet. Die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen und die Flächenrelation vom Trommelfell zum ovalen Fenster (17 : 1) wirken durch eine 22-fache Verstärkung der eintreffenden Schallamplitude einem Schallenergieverlust durch unterschiedliche Schallwellenwiderstände der Luft (Außen-, Mittelohr) und der Perilymphe (Innenohr) entgegen (Impedanzanpassung). Nach *Hüttenbrink* [60] ist die Hebelverstärkung durch die Gehörknöchelchen unwesentlich. Eine Schallverstärkung wird hauptsächlich durch den Hydraulikfaktor (Flächenverhältnisse von Trommelfell und Steigbügelfußplatte) [135] sowie in geringem Ausmaß durch die gekrümmten Flächen der Membrana tympani [126] erreicht. Die Mittelohrmuskeln (M. stapedius und M. tensor tympani) ermöglichen durch reflektorische Kontraktion einen Schallschutz bei sehr lauten Geräuschen. Die Druckeinwirkung am ovalen Fenster bewirkt eine Volumenverschiebung der Perilymphe in der Scala vestibuli in Richtung der Scala tympani. Als Folge wird der Endolymphschlauch deformiert. Diese Bewegung wird von der Basis bis zur Spitze der Schnecke fortgeleitet (passive Wanderwellentheorie). Die elastischen Rückstellkräfte der im Endolymphschlauch lokalisierten Basilarmembran nehmen apikalwärts ab. Die Steifigkeit der Membran nimmt hingegen zu. Es resultiert eine Abnahme der Wellenlänge und eine Zunahme der Geschwindigkeit in Richtung Schneckenspitze. Jede Wellenfrequenz hat ein für sie typisches Amplitudenmaximum an einem spezifischen Ort auf der Basilarmembran (Ortstheorie, Tonotopie). Je geringer die Frequenz ist, desto weiter apikalwärts ist das Amplitudenmaximum. Die Deformierung des Endolymphschlauches bewirkt eine Auslenkung der Basilarmembran mit gleichzeitiger Bewegung der Tectorialmembran. Am Ort des Amplitudenmaximums werden durch diese Bewegungen räumlich getrennte äußere Haarzellen durch Ausscherung der Zilien erregt. Infolgedessen werden Kaliumkanäle (Transduktionskanäle) in der Membran der Stereovilli geöffnet (Aufwärtsbewegung der Basilarmembran) bzw. geschlossen (Abwärtsbewegung der Basilarmembran). Bei geöffneten Ionenkanälen strömen Kaliumionen entlang dem Potenzialgefälle (-70 mV intrazellulär; +80 mV extrazellulär) in die äußeren Haarzellen. Das durch die entstandene Depolarisation gebildete Rezeptorpotenzial ist proportional zur Zilienauslenkung. Das Schließen der Transduktionskanäle bewirkt durch einen Kaliumionenausstrom in den Endolymphraum eine Repolarisation. Die periodischen Erregungen der äußeren Haarzellen resultieren in oszillierenden Längenänderungen. Die äußeren Haarzellen realisieren infolge eine Verstärkung der Wanderwelle (aktive Wanderwelle) und bewirken damit eine Auslenkung der Stereovilli der inneren Haarzellen. Die Erregung der inneren Haarzellen entspricht dem Transduktionsmechanismus der äußeren Haarzellen. Abweichend resultiert eine Depolarisation nicht in einer Längenänderung der Haarzellen. Infolge der Erregung werden Transmitter (Glutamat) basal ausgeschüttet und binden an postsynaptische Rezeptoren. Die Durchlässigkeit der subsynaptische Membran für Natriumionen (und in geringem Maße für Kaliumionen) nimmt zu und bewirkt eine Depolarisation der postsynaptischen Membran. Bei

2 Theoretische Grundlagen

Erreichen des Schwellenwertes (lediglich durch Summation mehrerer exzitatorischer postsynaptischer Potenziale realisierbar) wird ein Nervenaktionspotenzial (AP) an den afferenten Nervenfasern ausgelöst. Die Weiterleitung der AP über die Hörbahn („akustisches/auditives System“) erfolgt nach dem tonotopen Prinzip. Eine zerebrale Frequenzanalyse aller Schallreize basiert auf dem tonotopen Prinzip der AP und dem Periodizitätsprinzip (periodische Transmitterfreisetzung). Cochlear-Implantate analysieren elektrische Reize nach dem Periodizitätsprinzip [73].

Hörwahrnehmungen des Menschen erfolgen in einem Frequenzbereich von 20 – 16 000 Hz [121]. Der wahrnehmbare bzw. erträgliche Schalldruckpegel reicht von 20 μPa (Hörschwelle) bis 130 dB (Schmerzschwelle). Innerhalb dieser Wahrnehmungsbereiche liegt der Hauptsprachbereich (300 - 3 000 Hz bei 40 – 80 dB). Die Intensitätsunterschiedsschwelle beträgt ca. 3 – 5 dB bzw. ca. 1 dB (ab einem Schalldruckpegel von 40 dB über der Hörschwelle) und beschreibt die Wahrnehmung unterschiedlicher Lautstärke zweier Töne bei minimalem Unterschied im Schalldruckpegel. In Kombination mit Laufzeitdifferenzen bilden Intensitätsunterschiede die Basis für das Richtungshören. Unterschiede der Tonhöhe werden im optimalen Frequenzbereich (ca. 1 000 Hz) bei 3 Hz Frequenzunterschied (Frequenzunterschiedsschwelle: 0,3 %) wahrgenommen. Der Phonskala können verschiedene Isophone entnommen werden. Isophone stellen Töne verschiedener Frequenzen dar, die subjektiv als gleich laut empfunden werden (Abb. 2). Die wahrgenommene Lautstärke ist abhängig vom Schalldruckpegel und der Frequenz. Bei Zu- oder Abnahme der Frequenz ist ein Anstieg des Schalldruckpegels notwendig, um die gleiche Lautstärke wahrzunehmen.

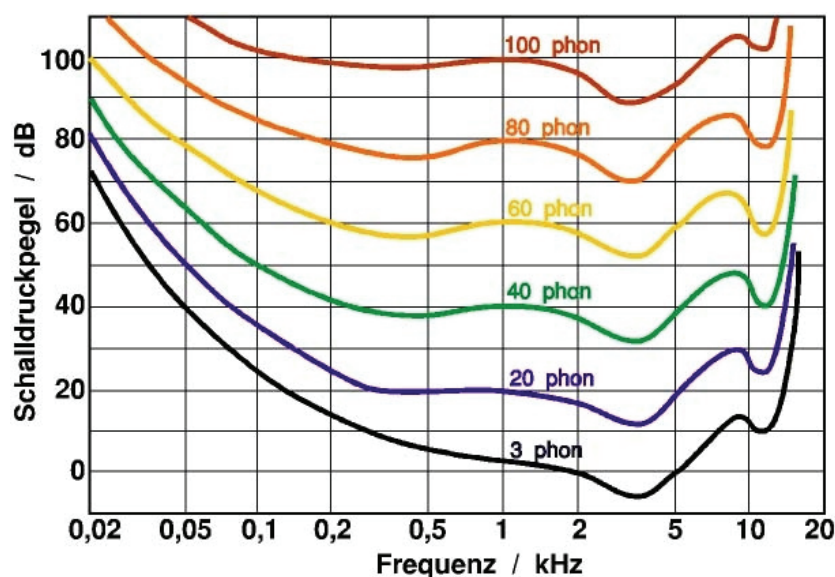


Abb. 2: grafische Darstellung einer Phonskala mit Isophonen

Hörwahrnehmungsstörungen können das Innenohr (Schallempfindungsstörungen) oder das Mittelohr (Schallleitungsstörungen) betreffen. Um Folgeschäden (Störungen der Sprachentwicklung) bei Kindern zu verhindern, ist eine frühzeitige Diagnose und Therapie notwendig. Hörprüfungen sind grundlegende diagnostische Voraussetzungen zur Erkennung von audiologischen Störungen. Therapeutisch haben sich bei irreversiblen Innenohrschäden, die mit alleinigem Hörgerät nicht ausreichend versorgt werden können, Cochlear-Implantate durchgesetzt. Die Therapie der Schallleitungsstörungen richtet sich nach der Erkrankung und erfolgt operativ oder mit einem Hörgerät.

2.3 Cochlear-Implantate

Cochlear-Implantate sind implantierbare Hörgeräte, die durch direkte elektrische Stimulation des N. cochlearis einen Höreindruck erzeugen. Cochlear-Implantate gelten als Standardtherapie bei irreversibler Taubheit oder hochgradiger Innenohrschwerhörigkeit im Kindes- und Erwachsenenalter (bei unzureichender Hörgeräteversorgung). In Indikationserweiterung werden CI zunehmend auch bei vorhandenem Restgehör eingesetzt [1, 2, 47, 55, 61, 62, 70, 81]. Eine CI-Versorgung kann unilateral (einseitig) oder bilateral (beidseitig) indiziert sein. Auch eine elektro-akustische Stimulation (EAS) durch das Tragen eines CI und eines Hörgerätes auf derselben Seite ist möglich [1, 2, 47, 55, 61, 62, 70].

Weltweit gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Cochlear-Implantaten (CI), die ständig weiterentwickelt werden. Unter dem Begriff CI wird meist nicht nur der implantierte Bauteil verstanden, sondern die Kombination von externen und intrakorporalen CI-Bauteilen [76, 84].

2.3.1 Aufbau und Funktion eines Cochlear-Implantates

Das Cochlear-Implantat besteht aus einer externen und einer implantierten Baugruppe. Die externe Baugruppe setzt sich aus einem Richtmikrofon, einem Sprachprozessor und einer Antenne zusammen. Die interne/implantierte Baugruppe wird von einem Empfänger/Stimulator und einem Elektrodenträger gebildet (Abb. 3).

Bei einem Geräusch treffen die Schallwellen auf das Richtmikrofon, das den aufgenommenen Schall in elektrische Impulse umsetzt. Diese werden über ein Kabel dem Sprachprozessor zugeführt und dort in Frequenzbänder gefiltert bzw. selektiert. Die Ausgangsleistung wird an den Erregungsschwellenwert und an das individuell angenehme „Hörlevel“ des Patienten angepasst und kodiert. Dieser Code wird über eine Antenne transkutan/perkutan an einen implantierten Empfänger/Stimulator (Schädelkalotte) übertragen, dort dekodiert und in einem bestimmten Muster als elektrische Impulse an ein Elektrodenbündel weitergeleitet, das über den Elektrodenträger in die Schnecke eingeführt ist. Die dort abgegebenen elektrischen Impulse führen zur Nervenreizung und damit zu einem Höreindruck beim Träger [15, 24].

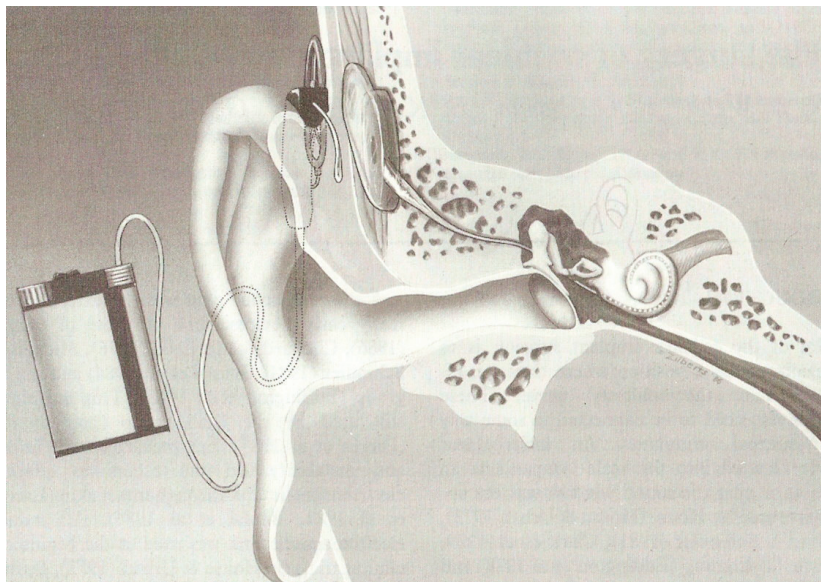


Abb. 3: schematische Darstellung eines Cochlear-Implantates am Beispiel des Melbourne/Cochlear-Implantates [133] mit Richtmikrofon, Sprachprozessor, Antenne und interner Baugruppe

2.3.2 Klassifikation von Cochlear-Implantaten

Die verschiedenen CI-Typen lassen sich u. a. nach folgenden Kriterien klassifizieren [128]:

- Stimulationsart (einkanlig, mehrkanlig)
- Stimulationsmodus (MP, BP oder CG)
- Stimulationsrate (Hz)
- Signalübertragung (transkutan oder perkutan)
- Magnet (fixiert oder auswechselbar; vorhanden oder nicht vorhanden)

- Sprachkodierungsstrategie (analoge Strategien, Feature Extraction, SPEAK, CIS, Phase-Locked-CIS, PPS, ACE, FFT, FRS, MRS)

CI können nach konstruktiver Auslegung und Leistungsangebot unterschieden werden. Eine Übersicht verfügbarer Daten ausgewählter CI-Modelle unterschiedlicher Hersteller erfolgt in Tab. 1a bis 4 im Anhang.

2.3.2.1 *Stimulationsverfahren*

Die Stimulation der Elektroden kann generell einkanalig oder mehrkanalig erfolgen. Hinsichtlich der Reizform können analoge (Stimulation unverändert zu der Frequenz des Eingangssignals) und pulsatile (sequentielle oder phasensynchron) Stimulationen unterschieden werden.

Die analoge Stimulation erfolgt bei CI mit geringerer Elektrodenzahl (bis zu 8 Elektroden [42, 59, 92]) und fand besonders in den 70er Jahren bei Einkanalssystemen Anwendung. Analoge Sprachkodierungsstrategien basieren auf einem kontinuierlichen Stromfluss mit einer sich zeitlich verändernden Amplitude [100], d. h. die Stimulation der Elektroden erfolgt mit der unveränderten Frequenz des Eingangssignals (Zeitkodierung). Der Vorteil dieser Stimulationsart ist eine relativ einfache Verarbeitung der Signale. Bei Anwendung mehrkanaliger CI erfolgt eine Schallsummation [122], die nachteilig für die Anpassung ist. Weiterentwicklungen der analogen Strategien stellen z. B. die Compressed Analogue (CA) und Continuous Interleaved Sampling (CIS) dar, die durch Bildung von Frequenzbändern und mehrkanalige Stimulation eine zusätzliche Ortskodierung ermöglichen.

Die digitale (pulsatile) Stimulation erfolgt bei CI-Systemen mit einer größeren Anzahl an Elektroden (10 oder mehr Elektroden [13, 22, 25]) und ist gegenwärtig das Stimulationsverfahren der Wahl. Der Stimulus wird durch ein Rechtecksignal mit einem nachfolgenden stimulationsfreien Intervall gegeben und ist durch die Pulsdauer, die Pulsstärke und das Zeitintervall zwischen zwei aufeinander folgenden Stimuli definiert. Eine unabhängige Stimulation jeder einzelnen Elektrode ist möglich [100] und ermöglicht eine Verminderung von Interferenzen. Bei der pulsatilen Stimulation erfolgt damit zusätzlich zur Zeitkodierung eine Ortskodierung.

Der Stand der Technik wird heute durch Multikanalsysteme repräsentiert [49, 85], die eine pulsatile Nervenreizung ermöglichen. Damit wird im Vergleich zu früheren einfachen Stimulationsarten (analog, Einkanalssystem) ein effektiveres Verfahren für die heutigen CI verwendet [27, 41], das eine verbesserte Hörqualität gewährleistet [85].

2. 3. 2. 2 *Sprachkodierungsstrategien*

Mittels elektrischer Reizung des Hörnervs wird eine Spracherkennung angestrebt, die der physiologischen möglichst entspricht. Dafür analysieren Sprachprozessoren der verschiedenen CI das Eingangssignal u. a. nach Parametern wie Frequenz, Intensität, spektrale Maxima und Formanten [85]. Nach der jeweiligen Sprachkodierungsstrategie werden u. a. folgende Stimulationsparameter bestimmt und an den Hörnerven weitergeleitet: 1. Stromstärke (Amplitude), 2. Pulsrate (Zeitsequentialität) 3. Stimulationsort (Ortskodierung). Dabei werden das Lautheitsempfinden und die Tonhöhe durch die Pulsrate bestimmt. Die physiologische Ortskodierung wird durch mehrkanalige Stimulation unterschiedlicher Lokalisationen in der Scala tympani imitiert.

Sprachkodierungsstrategien sind u. a. Feature Extraction, Spektrale Maxima (SPEAK), Continuous Interleaved Sampling (CIS), Fast Fourier Transformation (FFT), Advanced Combination Encoders (ACE), Paired Pulsatile Stimulation (PPS), Fast Rate Stimulation (FRS), Multi Rate Stimulation (MRS) sowie analoge Sprachkodierungsstrategien [85] und unterscheiden sich hinsichtlich der o. g. Stimulationsparameter.

Sprachkodierungsstrategien unterliegen ständigen Weiterentwicklungen, um ein bestmögliches Sprachverstehen zu realisieren.

2. 3. 2. 3 *Stimulationsmodi*

Die häufigsten Stimulationsmodi für die Stimulation des Hörnervs durch die CI-Elektroden sind monopolar (MP), bipolar (BP) und common ground (CG).

Bei der MP Stimulation erfolgt der Stromfluss zwischen einer implantierten Elektrode und einer Referenzelektrode, die vom Stimulationsort entfernt positioniert ist. Eine selektierte Stimulation ist nicht möglich.

Bei der BP Stimulation fließt der Strom zwischen zwei benachbarten Elektroden (lokales Stromfeld). Das lokal begrenzte Stromfeld ermöglicht eine optimale Kanaltrennung und wird bevorzugt bei ortskodierungsorientierten CI mit einer größeren Elektrodenanzahl verwendet.

Bei Verwendung des CG-Modus erfolgt die Stimulation durch eine aktive Elektrode. Alle anderen Elektroden dienen als Referenz. Vorteile des CG-Modus sind niedrige Stromstärken mit daraus resultierendem geringen Energieverbrauch, eine einfache Detektion defekter Elektroden und ein gutes Abschätzen von Schwellen.

Einige CI-Modelle ermöglichen die Auswahl verschiedener Stimulationsmodi nach Bedarf.

2. 4 Elektrodengeometrien

Grundsätzlich gibt es zahlreiche verschiedene konstruierte und entwickelte Elektrodenarrays. Unterscheidungen der konstruktiven Auslegung erfolgen anhand von Kriterien wie z. B. Anzahl und Anordnung der Elektrodenkontakte, Maße und Lokalisation.

2. 4. 1 Aufbau der CI-Elektroden

Der Aufbau der Elektroden ist prinzipiell gleich. Das komplette Elektrodenarray besteht aus einem zuführenden Drahtbündel, das jeweils einen Draht mit der zugehörigen Elektrode verbindet. Das Elektrodenarray wird von einem Elektrodenträger gestützt bzw. als Isolation umhüllt (Abb. 4). Unterscheidungen der konstruktiven Auslegung erfolgen anhand von Kriterien wie z. B. Anzahl und Anordnung der Elektrodenkontakte, Maße und Lokalisation. Konstruktive Details sind in Tab. 5 a - 9 im Anhang dargestellt.

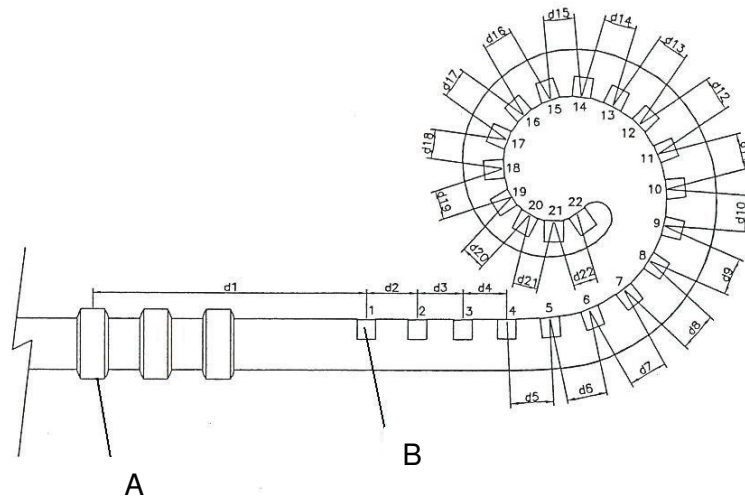


Abb. 4: schematische Darstellung einer Beispilelektrode, A = Markierungsring, B = Elektrodenkontakt [29]

2.4.2 Elektrodenlokalisation

Die Insertion der Elektrode kann intra- und extracochleär erfolgen. Bei den aktuellen Implantaten wird grundsätzlich eine intracochleäre Insertion durchgeführt. Lediglich für die monopolare Stimulation ist die Referenzelektrode extracochleär (meist im Muskelgewebe) lokalisiert.

Die intracochleäre Insertion erfolgt meist in die Scala tympani. Dort werden die Elektroden aktuell intraluminal entweder frei in die Mitte (antimodiolar, midmodiolar) oder perimodiolar platziert [36]. Insertionen in die Scala vestibuli stellen eine Alternative bei obstruierter Scala tympani dar [71].

Eine perimodiolare Position innerhalb der Scala tympani realisiert eine möglichst kurze räumliche Distanz zu den Nervenfasern. Im Vergleich zu midmodiolar lokalisierten Elektroden wird so eine Verminderung der Reizschwelle, der Kanalinteraktionen sowie eine verbesserte Sprachdiskriminationsfähigkeit erreicht [49]. Das intracochleäre Trauma ist bei einer perimodiolaren Elektrodeninsertion jedoch größer als bei herkömmlichen midmodiolaren Elektroden [9, 49, 50, 112, 127]. Folgende mögliche intracochleäre Komplikationen sind den intraluminalen Elektrodeninsertionen u. a. gemeinsam: 1. Trauma der Basilarmembran mit Haarzellschädigung, 2. Fraktur der Lamina spiralis, 3. Elektrodendislokation, 4. Infektion [2, 24, 133].

Angestrebt wird jedoch eine möglichst atraumatische Elektrodeninsertion unter Erhalt intracochleärer Strukturen, speziell der Spiralganglionzellen und der Fasern des Hörnervs [24]. Für ein zufriedenstellendes Sprachverständnis sind nach *Otte* et al. mindestens 10^4 funktionsfähige Spiralganglionzellen (etwa ein Drittel) notwendig, wovon eine Lokalisation von mindestens 3 000 Ganglionzellen in den apikalen 10 mm Voraussetzung ist [98]. *Ballantayne* et al. schätzen die notwendige Mindestzahl der Ganglionzellen auf 5 bis 10 % der ursprünglichen Population [12], während *Yilkosky* und *Savolainen* 5 000 bis 8 000 Nervenzellen als ausreichend angeben [137]. Durch Schonung der intracochleären Strukturen soll eine Verschlechterung des bestehenden Hörschadens sowie eventuell reaktive intracochleäre Strukturveränderungen vermieden und ein möglichst gutes Sprachverständnis ermöglicht werden.

2. 4. 3 Zugangswege der Elektrodeninsertion

In Betrachtung der Operationsdurchführung ist der transmastoidale Zugangsweg mit nachfolgender posteriorer Tympanotomie z. Z. Goldstandard. Es existieren zusätzlich variable Zugangswege (z. B. über die mittlere Schädelgrube), die aktuell wenig Bedeutung haben [38, 56, 74]. Die Elektrodeninsertion nach intracochleär kann wahlweise mittels Cochleostomie oder via der Rundfenstermembran (RFM) erfolgen.

Eine detaillierte Beschreibung der in-vivo- bzw. ex-vivo-Elektrodeninsertion erfolgt in Kapitel 2. 5 und 2. 6.

2. 4. 4 Insertionstiefe der Elektroden

Bezüglich der Insertionstiefe intracochleärer Elektroden existieren verschiedene Konzepte. *Lehnhardt* empfiehlt eine möglichst tiefe Insertion der Elektrode, da am ehesten in der mittleren und oberen Schneckenwindung noch funktionsfähige Haarzellen vermutet werden [80]. Und *Clark* beschreibt, dass eine Insertion bis 25 mm keine Gefährdung für die apikalen Hörnervenfaser darstellt [24]. Bei der elektro-akustischen Stimulation, einer Sonderform der CI-Versorgung, wird bei einigen Arbeitsgruppen eine tiefe Insertion vermieden, um die apikal lokalisierten, meist funktionsfähigen Haarzellen zu schonen. Andere Arbeitsgruppen empfehlen auch hier tiefe Insertionen (s. 2. 4. 5).

2. 4. 5 Elektro-akustische Stimulation

Eine Schwerhörigkeit betrifft häufig bevorzugt die hohen Frequenzen. Mit zunehmender Hochtonschwerhörigkeit nimmt das Sprachverständnis eines hörgeräteversorgten Patienten jedoch ab [61, 70]. Durch die Kombination mit einem Cochlear-Implantat auf derselben Seite soll eine bessere Hörfunktion erreicht werden (ipsilaterale elektro-akustische Stimulation – EAS). Dabei dient das CI besonders der Erkennung von hohen Frequenzen und das Hörgerät der Erkennung von tiefen Frequenzen. Die EAS wird zunehmend bei vorhandenem Restgehör eingesetzt [1, 2, 47, 55, 61, 62, 70].

Für die EAS ist ein Erhalt des Restgehörs entscheidend. Dies setzt ein schonendes chirurgisches Verfahren und speziell konstruierte Elektroden voraus [55].

Kiefer et al. [70] beschreiben folgende wesentliche Aspekte der chirurgischen Methode: 1. Limitierung der Einführtiefe, 2. schonende Eröffnung der Cochlea in „soft surgery“ Technik, 3. Lokale Corticosteroide, 4. sorgfältige Abdichtung der scalären Zugangsstelle. Generell ist ein Zugang zur Scala tympani bei der EAS wie bei anderen Elektrodeninsertion mittels Cochleostomie oder via Rundfenstermembran (RFM) möglich. *Briggs et al.* verglich in einer Studie Elektrodeninsertionen für EAS via RFM und inferiorer Cochleostomie [20]. Beide Zugangswege konnten atraumatisch durchgeführt werden. Aufgrund eines höheren Risikos der potentiellen Schädigung intracochleärer Strukturen mittels Cochleostomie empfehlen *Briggs et al.* den bevorzugten Zugang via Rundfenstermembran. *Gstoettner et al.* führten eine inferiore Cochleostomie durch, um eine Schädigung der Basilarmembran zu vermeiden [53, 55], die infolge anteriorer Cochleostomie ein vergleichsweise höheres Risiko darstellt [20]. Das Endost wurde erst nach Abschluss der Bohrarbeiten und der EAS-Fenster-Probe (Intaktheit der cochleären Hydrodynamik wird durch Endostbewegung nach Steigbügelbewegung überprüft) durch die eingeführte Elektrode eröffnet. *Gstoettner* beschreibt eine problemlose Insertion aller Elektroden auf die gewünschte Tiefe (18-22 mm), die auch radiologisch verifiziert wurde [55]. Zur Verbesserung der Abdichtung der Cochleostomie wurde ein zirkuläres Faszientransplantat auf die Elektrode aufgebracht. *Adunka et al.* führten eine inferiore, promontorielle Cochleostomie durch und eröffneten das Endost mit Hilfe einer Nadel. Die Elektrodeninsertion erfolgte möglichst schonend bis zum Punkt des ersten Widerstandes [2].

Die Anforderungen an die konstruktive Auslegung der EAS-Elektrode unterscheiden sich bei den verschiedenen Arbeitsgruppen. Die Arbeitsgruppen um z. B. *Kiefer* und *Gantz* fordern u. a. folgende konstruktive Elektrodendetails: 1. Kurzer Elektrodenträger für geringe Insertionstiefe, 2. weiches,

flexibles Material, 3. nicht vorgeformter Elektrodenträger. Für eine elektro-akustische Stimulation ist für diese Arbeitsgruppen ein kurzer Elektrodenträger ausreichend, da die noch funktionsfähigen Haarzellen, die akustisch gereizt werden, meist im apikalen Bereich (Tieftonbereich) der Schnecke lokalisiert sind. Die elektrische Stimulation erfolgt dann im Hochtonbereich (Cochleabasis) und schont durch eine kurze Insertionsstrecke die noch funktionsfähigen Haarzellen vor mechanischen Schädigungen [1, 2, 47, 55, 61, 62, 70]. *Briggs et al.* [20] gehen bei kurzen Elektroden von einem Missverhältnis zwischen Stimulationsort und Wahrnehmung aus und verwenden in einer vergleichenden Insertionsstudie einen 16 mm langen Elektrodenprototyp. Der Elektrodenträger ist dünn und flexibel, mit einer glatten Oberfläche und wurde für Insertionstiefen von 250° konstruiert.

Lehnhardt entwickelte die Idee einer vollkommen neuen Insertionsmöglichkeit, um bei Resthörvermögen eine Haarzellschädigung zu vermeiden: eine endosteale Insertion [82]. Bei einer endostealen Insertion wird eine Elektrode zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth eingeführt, ohne die Membran zu penetrieren. Durch eine intracochleäre, aber nicht intraluminäre Insertion, sollen mögliche Insertionstraumata der Haarzellen sowie Infektionen vermieden werden und damit das Restgehör erhalten bleiben. Ansprüche an die konstruktive Auslegung der Elektrode sind u. a. ein möglichst flacher Elektrodenträger [68, 103] mit hinreichender Pushability und Trackability. Ein Elektrodenmodell zur endostealen Insertion wurde bereits entwickelt, ist jedoch noch nicht im klinischen Einsatz. In Insertionsversuchen mit Silikondummies an Felsenbeinpräparaten konnte eine membranöse Integrität nachgewiesen werden [103, 104]. In der vorliegenden Machbarkeitsstudie wurden weiterführende ex-vivo-Insertionsversuche mit vollständigen endostealen Elektroden durchgeführt.

2. 4. 6 Cochlear

Nachfolgend werden einige aktuelle Elektrodenträger verschiedener Hersteller beschrieben. Die Elektrodenkonfigurationen des Herstellers *Cochlear* sind in Tabelle 6 a, b im Anhang aufgeführt.

2. 4. 6. 1 *Nucleus Mini 22 Array*

Das „Nucleus Mini 22 Array“ wurde für eine Insertionstiefe von 17 mm entwickelt (bis zu den Haarzellen der mittleren und oberen Schneckenwindung). Stimulationen erfolgen im Frequenzbereich von 1 000 – 5 000 Hz [80]. Der Elektrodenträger setzt sich aus 22 Platinzylindern zusammen, in deren

Innerem die teflonbeschichteten Drähte befestigt sind, und ist von einem Silikonelastomer ummantelt. Im Anschluss an die Elektrodenkontakte sind 10 Blindzylinder an dem Elektrodenträger befestigt. Die in Richtung Empfangsstimulator zunehmende Steifigkeit wird durch Blindringe realisiert. Durch die abnehmende Anzahl der Drähte und die Reduktion des Durchmessers soll sich die Flexibilität in Richtung Arrayspitze erhöhen [80].

2. 4. 6. 2 *Nucleus Straight Elektrodenarray*

Mit dem „Nucleus Straight Elektrodenarray/CI 24 RE (ST)“ („Nucleus 24M Array“) liegt das Nachfolgermodell von dem „Nucleus Mini 22 Array“ vor. Das „CI 24M“ ermöglicht durch zwei zusätzliche Referenzelektroden (1 Kugelelektrode und 4 kurzgeschlossene Plattenelektroden, CI-Rückseite) eine monopolare Stimulation. Das Array setzt sich u. a. aus Ringelektroden („full-banded“) und 10 zusätzlichen Versteifungsringen zusammen, welche eine sicherere Insertion ermöglichen sollen [85, 111]. Lt. Herstellerangaben wird eine Insertion der „Nucleus Straight Elektrode“ empfohlen, wenn aufgrund anatomischer Voraussetzungen eine Insertion der vorgeformten „Contour Advance (CA) Elektrode“ in die Cochlea nicht möglich ist.

2. 4. 6. 3 *Nucleus 24 Double Array*

Das „Nucleus 24 Double Array“ wurde speziell für die Implantation in verknöcherte Hörschnecken oder in Hörschnecken mit Knochenwachstum entwickelt, wird in der Klinik aktuell jedoch selten eingesetzt. Es besteht aus 2 verkürzten Elektrodenarrays mit jeweils 11 Elektrodenkontakten, die in zwei getrennte Bohrlöcher implantiert werden. Die zunehmende Reduktion des Durchmessers zum distalen Ende des Elektrodenträgers hin soll eine einfache Insertion gewährleisten [33].

2. 4. 6. 4 *Nucleus 24 Contour Array*

Das „Nucleus 24 Contour Array“ setzt sich aus halbumlaufenden („half-banded“) Elektroden zusammen. Das Array wurde zur schonenden Insertion und perimodiolaren Positionierung konstruiert und gefertigt [33].

2. 4. 6. 5 *Nucleus 24 Contour Advance Array*

Die „Contour Advance Elektrode/CI 24 RE (CA)“ ist eine Weiterentwicklung des „Nucleus 24 Contour Arrays“ und gewährleistet bei Insertion mittels Advance Off-Stylett (AOS)-Technik eine Schonung cochleärer Strukturen [19, 39], eine perimodiolare Lokalisation unter verminderter Belastung der lateralen Wand der Cochlea [116] bei Insertion sowie ein niedrigeres „Threshold“ (T)- und „Comfort“ (C)-Level [99]. Ein wesentliches Baumerkmal der Elektrode stellt der „Softip“ mit einem Durchmesser von 0,2 mm (apikal) bzw. 0,5 mm (basal) dar.

2. 4. 6. 6 *Nucleus 24k Array*

Das „Nucleus 24k Array“ ist eine Weiterentwicklung des „Nucleus 24M Arrays“ und wurde für jüngere Kinder konzipiert. Aufgrund der Flexibilität des Elektrodenarrays soll eine Anpassung an die individuelle Anatomie der kindlichen Cochlea gewährleistet werden [33]. 10 zusätzliche Versteifungsringe sollen eine sicherere Insertion ermöglichen. Das „Nucleus 24k Array“ ist durch Ringelektroden („full-banded“) gekennzeichnet [33, 111].

2. 4. 7 *MED-EL*

Die Elektrodenkonfigurationen des Herstellers *MED-EL* sind in Tabelle 7 a, b im Anhang aufgeführt.

2. 4. 7. 1 *Combi 40 Elektrodenarray*

Das „Combi 40 Elektrodenarray“ beinhaltet 16 Elektroden, die paarig zu 8 Kanälen auf einem 21 mm langen Abschnitt angeordnet sind. Die 12 aktiven Kontakte sind in Ringen gegliedert. Das Elektrodenarray ist speziell für tiefe Insertionen vorgesehen [51]. Der in die Nut eingebrachte Nitinoldraht stabilisiert die Arrayspitze während der Insertion. Durch elastische Rückstellkräfte erfolgt die perimodiolare Position der Elektrode innerhalb der Scala tympani und wird infolge der stabilen permanenten Verbindung des Nitinoldrahtes an das Elektrodenarray über die gesamte Tragzeit des Implantats fixiert [49].

2. 4. 7. 2 *Standard Elektrodenarray*

Das „Standard Elektrodenarray“ kann an das „Combi 40+“- oder „PULSAR_{CI}¹⁰⁰“-Implantat [89] angeschlossen werden (ebenso: „Compressed Elektrodenarray“, „Split Elektrodenarray“, „Medium Elektrodenarray“) und ist speziell für eine tiefe Insertion von bis zu 31 mm vorgesehen [90]. Der aus einem Silikonelastomer bestehende Elektrodenträger weist eine glatte Oberfläche auf und ist flexibel. Durch einen vergrößerten Abstand der Elektrodenkontakte soll eine Minimierung von neuronalen Interaktionen erreicht werden.

2. 4. 7. 3 *Compressed Elektrodenarray und Split Elektrodenarray*

Die *Fa. MED-EL* hat im Produktionsprogramm weitere spezielle Elektrodenarrays wie das kürzere „Compressed Elektrodenarray (S)“ und das „Split Elektrodenarray (GB)“ mit zwei Elektrodenträgern, die für teilweise ossifizierte oder malformierte Schnecken bzw. für komplett ossifizierte konzipiert wurden [53, 85, 88, 90, 128].

2. 4. 7. 4 *Medium Elektrodenarray*

Das „Medium Elektrodenarray (M)“ ist in der Länge reduziert und wurde für Insertionen entwickelt, bei denen eine tiefe Einführung der Elektrode nicht erwünscht oder nicht möglich ist [90]. Eine Insertionstiefe von etwa 20 mm (360°) wird angestrebt (apikalster Elektrodenkontakt: 22,1 mm). Durch die Flexibilität wird eine Implantationstiefe von durchschnittlich 288° in-vivo erreicht [2].

2. 4. 7. 5 *Flex EAS Elektrodenarray*

Die „Flex EAS Elektrode“ der Firma *MED-EL* wurde mit einer verminderten Insertionstiefe (360°) speziell für die elektro-akustische Stimulation (EAS) gefertigt. Die Flexibilität des Elektrodenarrays wird durch eine singuläre Anordnung der 5 apikal gelegenen Kontakte gewährleistet. Der Abstand der Elektrodenkontakte ist für die EAS auf 1,9 mm reduziert. Der apikale Durchmesser der Elektrode ist konstruktionsbedingt (singuläre apikale Kontakte) oval.

2. 4. 8 **Advanced Bionics**

Die Elektrodenkonfigurationen des Herstellers *Advanced Bionics* sind in Tabelle 8 im Anhang aufgeführt.

2. 4. 8. 1 ***Hi Focus 1j Elektrodenarray***

Die „Hi Focus 1j Elektrode“ entspricht im Aufbau der u. g. „Hi Focus Helix Elektrode“. Unterscheidungsmerkmal ist u. a. die leicht gebogene Form und die maximal mögliche Insertionstiefe von 25 mm. Beide Elektroden wurden für eine schonende Insertion konstruiert und gefertigt. Durch die mediale Anordnung der Elektrodenkontakte wird bei beiden Elektrodentypen eine segmentale Stimulation („Nerve Focusing Orientation“) ermöglicht [4, 5].

2. 4. 8. 2 ***Hi Focus Helix Elektrodenarray***

Die „Hi Focus Helix Elektrode“ ist eine intracochleäre Elektrode, die eine spiralige Form aufweist. Komponenten der Elektrode sind das Helix Elektrodenarray, die zuführenden Elektrodenkanäle und das sog. „fantail“. Die Drähte bestehen aus einer Platin-Iridium-Legierung und enden in 16 planaren Elektrodenkontakten, die an der medialen Seite angeordnet und in einem Silikonträger fixiert sind. Die absolute Länge des Elektrodenarray beträgt 24,5 mm und ermöglicht eine intracochleäre Insertionstiefe von 18 – 21 mm. Im distalen Bereich ist der Elektrodenkanal verjüngt. In Richtung der Elektrodenspitze nimmt der Durchmesser des Elektrodenkanals über eine Länge von 16 mm ab [4].

Laut Herstellerangaben wird aktuell die „Slim Helix Elektrode“ entwickelt, die weitgehend der „Hi Focus Helix Elektrode“ entspricht, jedoch flacher konstruiert wird.

2.4.9 MXM

Die Elektrodenkonfigurationen des Herstellers *MXM* sind in Tabelle 9 im Anhang aufgeführt.

2.4.9.1 *Digisonic Elektrodenarray*

Das „Digisonic Elektrodenarray“ wurde für eine Insertion in die Scala tympani konzipiert und hat eine gerade Form, ist flexibel und verfügt über 15 Kanäle. Jede der bandförmig angeordneten Elektroden (Breite 0,5 mm; Elektrodenabstand 0,7 mm) ist mit einem Silikonelastomer ummantelt und mit einem Platin-Iridium-Draht verbunden. Durch die Separierung der Elektroden wird eine Minimierung von elektrischen Interaktionen erreicht [23, 24].

Ausgehend von dem „Digisonic Elektrodenarray“ wurde ein Elektrodenarray für komplett obstruierte Schnecken entwickelt. Das Array enthält 10 separate, mit PTFE isolierte, Elektroden (\varnothing 0,125 mm), die voneinander getrennt in 10 verschiedene Positionen gebracht werden können [23].

2.4.9.2 *Digisonic DX10 Elektrodenarray*

Das „Digisonic DX10 Elektrodenarray“ ist eine Weiterentwicklung des „Digisonic Elektrodenarrays“. Es stellt das z. Z. klinisch eingesetzte Elektrodenarray mit dem größten Volumen dar [128]. Der Elektrodenträger besteht aus einem Silikonelastomer und umhüllt 15 Elektrodenkontakte. Während eines Stimulationsdurchgangs können 6 bis 15 der aktiven Kanäle angewählt werden, wobei jeder Kanal an ein oder zwei Elektroden angeschlossen ist. Der monopolare Stimulationsmodus wird durch die Kombination von CG-Modus und einer Referenzelektrode bewirkt.

2.4.9.3 *Digisonic DX 10/SP Elektrodenarray*

Das „Digisonic DX 10/SP Elektrodenarray“ besteht aus 20 aktiven Ringelektroden, die über eine Länge von 25 mm angeordnet sind, sowie zwei Referenzelektroden mit einer Länge von 15 mm und 30 mm [94]. Der Durchmesser des Elektrodenarrays beträgt 0,5 mm (Spitze) - 0,9 mm (Basis) und 1,1 mm im extracochleären Abschnitt [94, 95].

2. 4. 10 Philips

Die Elektrodenkonfigurationen des Herstellers *A. B. S. (Philips)* sind in Tabelle 10 im Anhang aufgeführt.

2. 4. 10. 1 *Laura Prothesen Elektrodenarray*

Das „Laura Prothesen Elektrodenarray“ verfügt über eine Gesamtlänge von 110 mm vom Empfänger/Stimulator bis zur Elektrodenspitze. Die 16 Platin-Iridium-Drähte sind zu 8 bipolaren Kontakten angeordnet. Die Kontakte sind in kleinen Aussparungen (Schalen) der Silikonummantelung lokalisiert und haben einen Abstand von 2,3 mm (in der Längsachse) bzw. 1,4 mm (in der Breite). Durch den Elektrodenträger aus einem Silikonelastomer wird eine glatte Oberfläche gewährleistet, die das Risiko von Gewebeschäden unter der Insertion minimieren soll. Aus den verschiedenen Konstruktionen wurde die gerade Form mit einer geringen Krümmung an der Elektrodenspitze als vorteilhaft befunden [106].

2. 4. 10. 2 *Laura Flex Elektrodenarray*

Das intracochleäre „Laura Flex Elektrodenarray“ setzt sich aus 8 aktiven bipolaren Kanälen zusammen, die sich über eine Länge von 16,6 mm verteilen. Die Wahl des Stimulationsmodus (BP, MP) setzt eine präoperative Entscheidung voraus, da kein Wechsel über die Software möglich ist [128].

2.5 **Klinische Untersuchungen der mechanischen Funktionalität der Elektrodeninsertion am Felsenbein**

2.5.1 **Methodik und Problematik operativer Zugangswege zur Scala tympani**

Der Zugang zum Innenohr kann prinzipiell nach Mastoidektomie und posteriorer Tympanotomie wahlweise durch die Membran des runden Fensters (RFM) oder durch promontoriale Cochleostomie erfolgen.

Der Zugang zur Scala tympani wurde zu Beginn der CI-Versorgung bevorzugt via der Rundfenstermembran durchgeführt [24]. Anteroinferior der RFM ist oft eine knöcherne Crista lokalisiert, die zur Freilegung der Fenstermembran abgetragen wird. Vor der Eröffnung der Membran wird die Crista fenestra entfernt, um eine optimale Sicht zu gewährleisten. Aufgrund der anatomischen Enge ist beim Zugang über das runde Fenster eine Manipulation der Elektroden notwendig. Daher ist dieser Zugang aktuell nicht die Methode der Wahl.

Aktuell erfolgt der Zugang zur Scala tympani bevorzugt mittels Cochleostomie. Durch einen „geraden“ Zugang in die Cochlea ist eine direkte Einsicht in die Scala tympani möglich [24]. Der Zugang mittels Cochleostomie wird durch eine Fenestration anteroinferior des runden Fensters erreicht. Die Fenestration kann sowohl weiter anterior als auch inferior durchgeführt werden. Die Abtragung des Knochens erfolgt bis die weißliche Innenauskleidung des Endosts sichtbar ist. Die RFM dient dabei der anatomischen Orientierung [24]. Die Eröffnung des Endosts wird in Abhängigkeit der Gewebefestigkeit mit einer Nadel oder einem scharfen Häkchen durchgeführt. Zur Minimierung eines insertionsbedingten zusätzlichen Hörverlustes, z. B. durch mechanisch bedingte strukturelle Schäden, reaktive Ossifikationen infolge Knochenstaubs [24] oder Infektion, empfiehlt *Lehnhardt* das Endost möglichst spät zu eröffnen und schnellstmöglich zu verschließen („soft surgery“-Technik) [81].

Die Insertion der Elektrode erfolgt laut *Clark* bei einer Cochleostomie einfacher und mit geringerem Trauma als bei einem Zugang über das runde Fenster [24]. Dabei ist bei einer anterioren Cochleostomie nach *Briggs* et al. im Vergleich zu einem weiter inferior lokalisierten Zugang das Risiko eines operationsbedingten Traumas der Basilarmembran größer [20]. Auch *Gstoettner* et al. führten zur Vermeidung von Basilarmembranschäden eine inferiore Cochleostomie durch [53, 55]. Die Infektionsrate nach Cochleostomie ist im Vergleich zum Zugang über das runde Fenster laut *Clark*

vermindert, da bei der Cochleostomie eine bessere Abdichtung des runden Fensters möglich ist [24]. Nach *Lehnhardt* verursacht eine Elektrodeninsertion durch das runde Fenster den Verlust jeglichen Restgehörs, der u. a. durch eine insertionsbedingte Behinderung der cochleären Hydrodynamik sowie eine Funktionsstörung des Aqaeductus cochleae bedingt ist [81]. Nach neueren Erkenntnissen gewinnt die Elektrodeninsertion via rundes Fenster jedoch erneut an Bedeutung [3, 20, 124]. *Briggs* et al. verglichen in einer Studie die Methode der Elektrodeninsertion via RFM und inferiorer Cochleostomie [20]. Beide Zugangswege konnten atraumatisch durchgeführt werden. Laut *Adunka* et al. ist das Trauma bei einem Zugang über die Rundfenstermembran im Vergleich zur Cochleostomie geringer [3]. Auch *Briggs* et al. empfehlen einen bevorzugten Zugang via Rundfenstermembran, da das Risikos der potentiellen Schädigung intracochleärer Strukturen mittels Cochleostomie größer ist [20].

2. 5. 2 Elektrodeninsertion

Eine Platzierung der Elektrode soll eine effektive Reizung des Hörnervs unter bestmöglichem Erhalt des Restgehörs ermöglichen. Dazu ist eine schonende Insertion der CI-Elektroden Voraussetzung. Neben verschiedenen Insertionsmethoden soll dies auch durch spezielle Elektrodenkonfigurationen und Insertionshilfsmittel erreicht werden. Zusätzlich ist laut *Lehnhardt* die intracochleäre Elektrode möglichst zeitnah nach der Platzierung an der knöchernen Gehörgangshinterwand zu fixieren. Damit sollen Bewegungen der Elektrode verhindert werden, die eine Schädigung des Restgehörs bedingen können [81].

Ursache unvollständiger Insertionen sind u. a. die physikalischen Eigenschaften der Elektrode, mangelnde Erfahrung des Chirurgen und im Wesentlichen Obstruktionen des Innenohres. Diese werden oft durch eine Labyrinthitis ossificans basierend auf einer Pneumokokkenmeningitis hervorgerufen [37].

2. 5. 2. 1 Methodik der Elektrodeninsertion

Die Methoden der Elektrodeninsertion unterscheiden sich bei den verschiedenen Arbeitsgruppen. Gemeinsam ist ihnen das Ziel eines schonenden Verfahrens.

Adunka et al., *Clark* u. a. empfehlen, den Punkt des ersten Widerstandes bei der Elektrodeninsertion nicht zu überschreiten [2, 24], um Folgeschäden zu vermeiden.

2 Theoretische Grundlagen

Webb gliedert die Elektrodeninsertionsmethode in eine Standardmethode und weitere Insertionsverfahren [133]. Bei der Standardmethode wird die Elektrode unter sanftem Druck in die Scala tympani eingeführt. Erschwert eine Resistenz die Insertion, wird die Elektrode minimal reponiert, gedreht und bis zur erwünschten Tiefe vorgeschoben. Im Anschluss erfolgt die Fixierung des Implantats im Weichteilbett. Ein weiteres Verfahren beruht auf einer Elektrodeninsertion im Anschluss an die Implantatfixierung. Eine Rotation der Elektrode bei Resistenzen ist bei dieser Methode nicht möglich.

Auch *Cohen* beschreibt eine schonende Insertion der Elektrode unter wiederholt sanftem Druck bei einem Vorschub von jeweils 1 – 2 mm. Bei Resistenzen (z. B. Obstruktion der Scala tympani) wird Elektrode ebenfalls minimal reponiert, um 180 – 360° in Richtung Modiolus gedreht und erneut vorgeschoben. Nach *Cohen* ist eine partielle Insertion einer Elektrodenschädigung vorzuziehen [35].

Klenzner et al. beobachteten in eigenen Studien ein Abknicken der Elektrodenspitze nach einem Zurückziehen der Elektroden. Daher führte die Arbeitsgruppe Elektrodeninsertionen nach zwei verschiedenen Methoden durch: 1. reguläre Insertion, 2. „Advance-off-Stylett“ (AOS)-Technik [72]. Bei der regulären Insertion wurde der Elektrodenträger bis zum 2. Markerring vorgeschoben. Vergleichend erfolgt bei der Insertion mittels „freehand“ Advance-off-stylett (AOS)-Technik zunächst eine partielle Elektrodeninsertion bis 8,5 mm, dann wurde die Insertion bis zum Markerring fortgesetzt. Mit dieser Technik sollte ein Abknicken der Elektrodenspitze („Tip-foldover“) und eine daraus eventuell resultierende Elektrodenschädigung verhindert werden [72].

Eine atypische Anatomie oder pathologische Ursachen erfordern eine Modifikation der operativen Methode [133].

2. 5. 2. 2 *Hilfsmittel zur Elektrodeninsertion*

Für die Elektrodeninsertion sind zahlreiche Hilfsmittel entwickelt worden, die teilweise kommerziell verfügbar sind.

Gleitmittel

Lehnhardt und *Clark* beschreiben Elektrodeninsertionen unter Verwendung von Healon [24, 80, 81], einem Hyaluronsäurederivat, welches als viskoelastisches Gel erhältlich und sehr gut biokompatibel ist [10, 80]. Durch das Auftragen von je einem Tropfen der Hyaluronsäure auf die Elektrode und in die Scala tympani bzw. auf das Endost, ist ein leichteres Gleiten der Elektrode und eine tiefere Insertion wahrscheinlich bzw. möglich [24, 80].

Roland et al. verwendeten verschiedene mögliche Gleitmittel (z. B. Hyaluronsäure, Methylcellulose, Glycerin), um eine tiefe Insertion der Elektroden zu ermöglichen. Die Arbeitsgruppe beobachtete jedoch eine starke Abnahme der elektrocochleografischen Antwort durch die o. g. Gleitmittel. Ein signifikanter Verlust der Spiralganglionzellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [115].

Einführhilfen

Einführhilfen dienen der besseren Handhabbarkeit und erleichterten Insertion der Elektrode. Mögliche Einführhilfen sind 1. Kralle, 2. Spatel, 3. Stilett, 4. Insertionsgerät mit Kunststoffhülse.

Clark et al. verwendeten erstmals eine Einführhilfe (Greifer) zur Elektrodeninsertion [26]. Mit der Kralle („claw“), die in der dominanten Hand des Operateurs gehalten wurde, wurde die Elektrode in die eröffnete Scala tympani eingeführt. Auch andere Arbeitsgruppen beschreiben die Verwendung einer Kralle zur Elektrodeninsertion, die den aktuellen Standard darstellt [36, 133].

Franz et al. führten Elektrodeninsertionen unter Verwendung eines speziell konstruierten Spatels durch [46]. Dieser wurde zwischen der Silikonhülse, die die Elektrode (Melbourne/Cochlear „multiple electrode“) ummantelt, und der Elektrode vorgeschoben (Abb. 5).

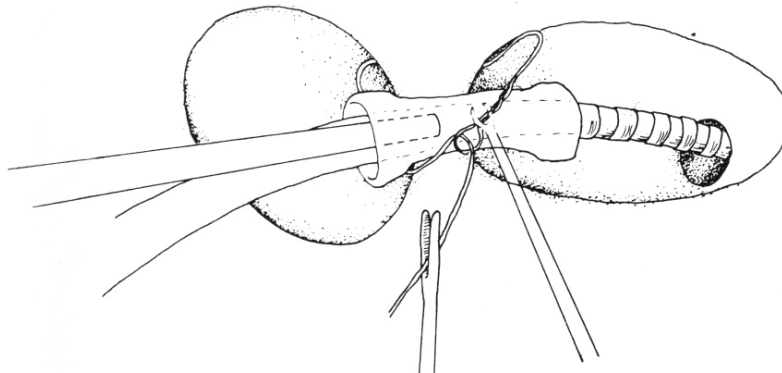


Abb. 5: Melbourne/Cochlear „multiple electrode“ mit speziell konstruiertem Spatel während der Elektrodeninsertion [133]

Der Spatel ist auf der elektrodenzugewandten Seite abgeflacht und auf der elektrodenabgewandten Seite gewölbt. Bei der ersten Resistenz wurde der Spatel bei fixierter Silikonhülse exponiert und die Elektrode nachfolgend platziert.

Balkany et al. beschreiben eine Insertion mittels Insertionsgerät [11]. Dabei wurde das Elektrodenarray in eine Kunststoffhülse eingebracht und diese schonend am Ende des Insertionsgerätes so platziert, dass die Führungsnut der Hülse und die Elektrodenleiste („shoulder“) in Richtung der anterioren ovalen Fensternische ausgerichtet waren. Die Führungsnut wurde je nach Operationsseite (rechtes/linkes Ohr) erneut rotiert. Die Elektrode wurde dann unter Betätigung eines Handmechanismus kontinuierlich und schonend vorgeschoben, bis sie sich von der Hülse löste. Anschließend wurde das Insertionsgerät entfernt.

Eine weitere mögliche Einführhilfe ist ein Stilet. *Cohen* et al. beschreiben eine Elektrodeninsertion mittels eines Stilettes aus Platindraht, das in den Silikonträger eingebettet ist und die Elektrode (hier zur perimodiolaren Insertion) während der Insertion in einer geraden Position stabilisiert [36]. Ist das Elektrodenarray in der endgültigen Lokalisation platziert, wird das Stilet reponiert und vollständig entfernt. Dadurch wird die konstruktionsbedingte Krümmung des Elektrodenträgers verstärkt und das Array nimmt eine modiolusnahe Position ein.

Maßnahmen zur perimodiolaren Positionierung

Zur perimodiolaren (modiolusnahe Lokalisation) Positionierung wurden sowohl Positionierungshilfen als auch spezielle konstruktive Auslegungen der Elektrode entwickelt.

Cohen et al. beschreiben eine Elektrodeninsertion zur perimodiolaren Lage mittels eines Stilettes aus Platindraht, das in den Silikonträger eingebettet ist und die vorgeformte Elektrode (hier zur perimodiolaren Insertion) während der Insertion in einer geraden Position stabilisiert [36]. Ist das Elektrodenarray in der endgültigen Lokalisation platziert, wird das Stilett exponiert, und die Elektrode erreicht durch elastische Rückfederung eine perimodiolare Position.

Lenarz et al. verwendeten eine speziell konstruierte Elektrode mit Positionierer [83]. Die Elektrode war in horizontaler Richtung flexibel, in vertikaler Richtung formsteif. Der Positionierer war aus einem flexiblen Silikonelastomer mit einer konkavseitigen Mulde gefertigt. Nach partieller Elektrodeninsertion wurde dieser in die Scala tympani eingeführt und platzierte das Elektrodenarray etwas tiefer und perimodiolar. Im Anschluss wurde der Positionierer dann exponiert.

Jolly et al. verwendeten in einer Studie zur perimodiolaren Positionierung einen Prototyp eines Elektrodenarrays mit eingelassenem Nitinoldraht [65]. Der Draht hatte sehr flexible, aber keine deformierenden Eigenschaften, während die Elektrode flexibel und plastisch verformbar war. Der Nitinoldraht war in eine eingelassene Rinne im Elektrodenträger lokalisiert. Das apikale Ende des Nitinoldrahtes war über eine apikal lokalisierte Silikonkerbe im Array an der Elektrode fixiert. Basal verlief der Draht in einem Silikontunnel, der in der Rinne eingebettet war. Nach der Elektrodeninsertion wurde der Nitinoldraht vorerst in Position gehalten und die Elektrode sanft zurückgezogen. Dadurch wurde der Draht mit Ausnahme des apikalen Endes, aus der Rinne gelöst. Die Elektrode wurde weiter retrahiert, das Array „deformiert“ und damit eine perimodiolare Lage realisiert.

Auch *Gstoettner* et al. führten verschiedene perimodiolare Elektroden in die Scala tympani ein [49]. Ein Elektrodenmodell war vorgeformt und wurde durch ein in den Elektrodenträger eingebettetes Stilett in gerader Form gehalten. Das Stilett wurde während der Insertion schonend zurückgezogen und die flexible Elektrode konstruktionsbedingt in eine perimodiolare Position gebracht. Eine weitere Elektrode wird während der Elektrodeninsertion distal durch einen in eine Mulde eingelassenen Nitinoldraht geführt. Das Array wird dann minimal retrahiert und dadurch modiolusnah platziert. Ein drittes vorgeformtes Modell wurde nach *Gstoettner* et al. mit einem Insertionswerkzeug in gerader

Form fixiert und in die Scala tympani eingeführt. Nachdem das Werkzeug entfernt wurde, nahm das Elektrodenarray die ursprüngliche Form an und wurde so perimodiolar platziert.

2. 6 Methodik und Dokumentation der Elektrodeninsertion am post-mortem-Felsenbeinpräparat

Vor jeder in-vivo-Insertion einer neu entwickelten Elektrode ist grundsätzlich der Machbarkeitsnachweis in ex-vivo-Versuchen Voraussetzung. Die Wahl der Methode ist individuell vom jeweiligen Untersucher abhängig und wird in der Literatur selten detailliert beschrieben. Nachfolgend werden Insertionsmethoden verschiedener Arbeitsgruppen beschrieben.

Gstoettner et al. verwendeten zur Elektrodeninsertion in post-mortem-Felsenbeinpräparate die Standard-Operationsmethode wie bei in-vivo-Operationen [49]. Nach posteriorer Tympanotomie und Cochleostomie wurde die Elektrode bis zum Punkt des größten Widerstandes in die Cochlea eingeführt. Die Insertionstiefe der Elektrode wurde mit Hilfe einer Standard-Röntgenaufnahme für das Os temporale ermittelt. Anschließend wurden die Felsenbeinpräparate in Polymethylmethacrylat eingebettet, geschnitten, geschliffen, histologisch gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Richter et al. [111] beschrieben in ihrer Studie die Insertion der „Nucleus CI 22M“, „CI 24M“, „CI 24k“ und der „Nucleus Contour Elektrode“. Nach anterosuperiorer Cochleostomie wurden einige der „Nucleus Contour Elektroden“ und die geraden „Standard Nucleus Elektroden“ mit der von *Lehnhardt* beschriebenen „soft surgery“ Technik [81] vorgeschoben. Als Gleitmittel diente Healon. Die Insertion der Mehrzahl der „Nucleus Contour Elektroden“ wurde in modifizierter Form durchgeführt: Der Zugang über die Cochleostomie war anatomisch näher am runden Fenster lokalisiert und hatte einen größeren Durchmesser. Zusätzlich wurde ein Zurückziehen (1 – 2 mm) des Stilett für einige Elektrodeninsertionen beschrieben (sog. off-stylett-Technik). Die Lokalisation der intracochleären Elektrode wurde mittels drei verschiedener radiologischer Methoden bestimmt: 1. konventionelle Röntgenaufnahmen, 2. Durchleuchtung, 3. Kegelstrahl-Computertomografie zur dreidimensionalen Darstellung der intracochleären Elektrode. Die Felsenbeinpräparate wurden nachfolgend in ein Harz auf Methacrylatbasis eingebettet, geschnitten, gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Roland et al. [114] führten die Präparation unter Fixierung des Präparates in einer Halterung durch. Vororientierend wurden die Lokalisation der Cochleostomie und die mögliche Elektrodeninsertion röntgenologisch ermittelt und per Video dokumentiert. Die Elektrodeninsertion erfolgte via Cochleostomie (1 mm anterior des runden Fensters, 3,5 mm inferior der Stapesfußplattenkante bzw. tiefere Cochleostomie und entlang der Achse des Lumens der basalen Scala tympani-Windung bei einfacher Insertion). Das Endost blieb bis zur eigentlichen Elektrodeninsertion intakt und wurde nach der Eröffnung mit einer Glycerinlösung (Schmierfilm) gespült. Die Insertion und Lagekontrolle erfolgte unter kontinuierlicher Durchleuchtung. Die anschließend in Epoxydharz eingebetteten Präparate wurden geschnitten und mittels Makroaufnahmen histologisch untersucht.

Adunka et al. [3] inserierten die Elektroden nach posteriorer Tympanotomie via die Membran des runden Fensters in humane post-mortem-Felsenbeinpräparate. Um eine bessere Übersicht im Bereich der Rundfensternische zu ermöglichen, wurde eine tympanomeatale Klappe konstruiert (Entfernung des anteroinferioren Überhangs und der Crista fenestra). Anschließend erfolgte eine weit laterale Inzision der Rundfenstermembran. Die Elektrodeninsertion erfolgte mittels einer Insertionshilfe entlang der lateralen Wand der basalen Cochleawindung bis zum Punkt des ersten Widerstandes (Minimierung des cochleären Traumas). Mit Hilfe von Nähten wurden die Elektroden am restlichen Knochen fixiert und die Präparate anschließend in Polymethylmethacrylat eingebettet. Die Insertionstiefe wurde röntgenologisch kontrolliert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Untersuchung gefertigter Schnittebenen.

2.7 Histologische Präparationsmethoden

Für histologische Untersuchungen von Präparaten ist zur Darstellung verschiedener Präparatebenen ein Materialabtrag notwendig. In aktuellen Studien werden sowohl Schnitt- [3, 111, 114] als auch Schliffpräparationen [49, 52, 104] häufig beschrieben. Für Schliff- oder Schnittpräparationen ist eine Mindestfestigkeit der Probe notwendig. Aufgrund unterschiedlicher Gewebefestigkeiten setzt dies eine Probenvorbereitung in Abhängigkeit der Untersuchungsmethode und der Fragestellung voraus.

2. 7. 1 **Probenvorbereitung**

Die Mindestfestigkeit eines Präparates wird meist durch eine Einbettung in ein Medium gewährleistet. Verfestigungen der Probe sind aber auch durch Kryopräparationen möglich.

2. 7. 1. 1 ***Präparateinbettung***

In zahlreichen Studien wird aktuell als Standard-Präparationsmethode das Einbetten von Felsenbeinpräparaten in z. B. Epoxydharz oder Polymethylmethacrylat durchgeführt [3, 49, 52, 104, 111, 114].

Grundsätzlich wird bei Präparateinbettungen das Warmeinbetten unter Druck und das Kalteinbetten unterschieden [18]. Als Medien beim Warmeinbetten unter Druck dienen warmaushärtende Kunstharze (z. B. Epoxid, Bakelit) oder thermoplastische Harze (z. B. auf Acrylbasis). Beim Kalteinbetten werden u. a. Epoxidharze, Methacrylate oder ungesättigte Polyester verwendet.

Zu berücksichtigen bei der Wahl des Mediums ist u. a. die gleiche Viskosität der Mediumkomponenten und deren Molekulargewicht, der Konzentrationsgradient, die benötigte Temperatur und Reaktionen des Gewebes mit dem Medium [93].

Je nach Einbettungsmedium sind verschiedene Probenvorbereitungen notwendig: Das fixierte Präparat wird mit Alkohol unterschiedlicher Konzentration oder Leitungswasser ausgewaschen. Bei Einbettmedien, die nicht hydrophil sind, wie Paraffin und Celloidin, wird es stufenweise über mehrere Stunden in Ethanol entwässert, in Intermedien, z. B. Methylbenzoat oder Chloroform, zur Entfernung des Ethanols gewaschen und bei 56 °C – 58 °C (Paraffineinbettung) bzw. 37 °C (Gelatineeinbettung) mit dem Medium z. T. über mehrere Stunden u. U. im Vakuum eingebettet. Das Entwässern der Proben kann zu Zerreißen und Schrumpfungen (10 % - 15 %), Härtung und Lipidextraktionen führen [117].

Das Einbetten in Medien ist eine zeitaufwendige Methode zur Verfestigung von Proben und erfordert zahlreiche Berücksichtigungen in Bezug auf die Wahl des Mediums. Die dadurch eventuell bedingten Gewebeveränderungen ermöglichen lediglich eine Beurteilung von strukturell veränderten Präparaten und gewährleisten keine direkte Übertragbarkeit auf native Strukturen.

2. 7. 1. 2 *Kryopräparation*

Die Kryopräparation dient der Fixierung der Präparatbestandteile. Als Proben für Kryopräparationen können native, fixierte sowie eingebettete (weiches Paraffin, Polyäthylenglykol) Präparate verwendet werden. Als Kühlmedien können grundsätzlich flüssiges CO₂, CO₂ solid, Kühlaggregate und flüssiger Stickstoff (-196 °C) dienen. Dabei ist eine möglichst schnelle Temperatursenkung notwendig, um eine Eiskristallbildungen zu vermeiden. Eiskristalle führen zu einer Kompression des Gewebes, besonders des Zytoplasmas, mit nachfolgender Strukturschädigung (bei Anhebung der Temperatur kann eine Rekonstruktion der Strukturen erfolgen). Durch die Verwendung von kleinen Proben und einer großen Temperaturdifferenz kann dies gewährleistet werden. Bei der Kryopräparation entfallen die Entwässerung und das Einbetten in ein Medium [117]. Damit werden höhere Temperaturen bzw. Inaktivierung von Enzymen und Lipidextraktionen vermieden, Schrumpfungen des Gewebes minimiert sowie eine schnelle Verarbeitung erreicht. Dies sind wesentliche Voraussetzungen zum Erhalt möglichst nativer ungeschädigter Präparate. Die Kryopräparation ermöglicht einen guten Strukturhalt. Die Lokalisation der niedermolekularen Substanzen bleibt konstant und es erfolgt keine Denaturierung.

2. 7. 2 **Schnittpräparation**

Die Schnittpräparation wird für Polymere (Dünnschnitt), weiche Proben (Kryotomie) und native Präparate angewendet und ermöglicht Untersuchungen einzelner Schichten.

Zum Schneiden wird heute meist ein Mikrotom verwendet. Um gleichmäßige Schnitte gewährleisten zu können, ist eine Befestigung des Präparates notwendig. Die empfohlene Schnittdicke für Dünnschnitte beträgt 1 µm - 20 µm. Die tatsächliche Schnittdicke ist meist jedoch größer. Je dünner die Schnitte, desto größer sind die Abweichungen bei Dünnschnittpräparaten.

Beim Schneiden mit dem Messer entsteht durch mechanische und thermische Einwirkung eine mittelraue, unebene und tief plastisch verformte Oberfläche [130]. Die Tiefenausdehnung der Strukturveränderungen ist meist unbekannt.

2. 7. 3 Schliffpräparation

Das Schleifen dient dem mechanischen Materialabtrag und soll eine plane Oberfläche mit geringgradiger Verformung erreichen.

Typischerweise wird ein Schleifvorgang mit SiC-Papier in aufsteigender Körnung durchgeführt, bei dem grundsätzlich mit der größten Körnung begonnen wird. Fortschreitend wird mit etwa halb so großer Körnung wie im vorherigen Schritt gearbeitet, d. h. 120, 220, 500, 1 000. Eine Schädigung durch eine zu grobe Körnung des Schleifpapiers ist möglich. Daher ist eine Schliffpräparation bei harten und spröden Materialien mit SiC-Papier der Körnung 800, bei weichen Materialien der Körnung 1 200 zu bevorzugen. Als Schleifmittel dienen bevorzugt Siliziumkarbid, Korund und Diamant mit Korngrößen von bis zu 5,1 mm.

Zum Schleifen hat sich eine Geschwindigkeit der Grundscheibe von 200 - 240 Umdrehungen/min als günstig herausgestellt. Bei zu hohen Drehgeschwindigkeiten wird die Probe thermisch stark beansprucht. Nachfolgend können Strukturveränderungen, Wärmedehnung und chemische Reaktionen entstehen. Als Laufrichtung des Probenhalters wird der Gegenlauf beim Schleifen empfohlen.

Je nach Durchmesser der Probe haben sich beim Schleifen Anpresskräfte von 15 N bis 31 N bewährt [18, 113]. Eine zu hohe Anpresskraft führt ebenfalls zu Strukturschäden und Reliefbildungen.

Im Vergleich zur Schnittpräparation kann mit der Schliffpräparation eine mittel- bis feinraue, ebene Oberfläche erreicht werden. Zur Vermeidung von Ausbrüchen, Strukturschäden und Reliefbildungen sollte die Präparationszeit weitgehend minimiert werden. Die Schliffpräparation ist aufgrund des exakten Materialabtrages und der lediglich minimalen Verformung bei optimaler Durchführung der Schnittpräparation zu bevorzugen.

3 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Machbarkeitsnachweis einer neuartigen, möglichst schonenden Gefrierschliffmethode zur Untersuchung von nativen, besonders empfindlichen Präparaten am Beispiel von Kryofelsenbeinpräparaten.

Bisher erfolgen histologische Untersuchungen zur Strukturintegrität meist an eingebetteten Präparaten. Die dafür notwendige Probenvorbereitung führt zu präparationsbedingten Strukturschäden. Um Weichteilschäden, die z. B. durch Elektrodeninsertionen verursacht wurden, beurteilen zu können, ist daher eine schonende Probenpräparation von möglichst nativen Präparaten notwendig. Dabei ist eine Schliffpräparation der Schnittpräparation zu bevorzugen. Die Schnittpräparation führt zu Verformungen und exakte Schnittdicken sind nicht realisierbar, während eine Schliffpräparation bei minimierter Schliffdauer ein schonenderes Verfahren darstellt, das eine genauere Schliffdicke ermöglicht. Die von uns entwickelte Gefrierschliffpräparation erfüllt diese Ansprüche.

Es wurden folgende Ziele und Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht:

- Ist es möglich, native, nicht fixierte Präparate mit einer neu entwickelten Gefrierschlifftechnik zu untersuchen und eine Minimierung von präparationsbedingten Strukturschäden zu gewährleisten?
- Kann mittels einer speziell konstruierten Kryoschleifvorrichtung eine Fixierung, kontinuierliche Kühlung und ein exakt definierter Vorschub des Präparates ermöglicht werden?
- Können gut beurteilbare, aussagekräftige Schliffebenen erzielt werden?
- Sind Kryopräparate formstabil und anfärbbar?
- Ist eine verfeinerte morphologische Differenzierung von Strukturschäden möglich?
- Welche bildgebenden Untersuchungsmethoden sind für Kryoschliffpräparate geeignet?

3.1 Felsenbeinpräparate

Voraussetzung für die Auswahl der Felsenbeinpräparate war, dass sie humanen Ursprungs waren oder eine vergleichbare anatomische Struktur hatten. Es wurden fünf Präparate untersucht (vier humane und ein ovines Felsenbeinpräparat, Tab. 10). Das ovine Felsenbeinpräparat wurde unter dem Gesichtspunkt der den humanen Felsenbeinen ähnlichen anatomischen Strukturen und Dimensionen in die Untersuchungen einbezogen [101].

Tab. 10: Übersicht der untersuchten Felsenbeinpräparate

Präparat	A	B	C	D	E
Spezies	human	human	human	tierisch (Ovis)	human
Quelle	Institut für Anatomie Universität Rostock	Institut für Anatomie Universität Rostock	Institut für Anatomie Universität Rostock	Schlachthof	Institut für Anatomie Universität Rostock
Fixierung (%)	Form- aldehyd, 10 %	Formaldehyd, 4 %	Formaldehyd, 4 %	-	Formaldehyd, 4 %
Zwischen- lagerung (°C)	RT (21 °C)	RT (21 °C)	RT (21 °C)	RT (21 °C)	RT (21 °C)
Ver- wendung	Vor- versuche zur Metho- den- entwick- lung	Vorversuche zur Metho- denentwick- lung, 5 Schichten á 250 µm Abschliff	Vorversuche zur Metho- denentwick- lung	Machbar- keitsstudie	Vorversuche zur Methoden- entwicklung, Machbarkeits- studie, „Tissue Printing“
Schliff- präpara- tion	+	+	-	+	+

- nicht durchgeführt

+ durchgeführt

3 Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 10: Übersicht der untersuchten Felsenbeinpräparate

Präparat	A	B	C	D	E
Auflicht- mikro- skopie	+	-	-	-	-
Pro- jektions- mikro- skopie	+	+	-	-	+
Endo- skopie	-	-	-	+	-
Raster- elek- tronen- mikro- skopie	-	+	+	-	-
Makroauf- nahmen	+	+	-	+	+
Elek- troden- insertion	-	+	+	-	+
Präparat- volumen [cm ³]	1	0, 5	0, 5	1	0, 5
- nicht durchgeführt + durchgeführt					

Die Felsenbeinpräparate wurden ungekühlt zum Aufarbeitungslabor transportiert. Dort erfolgte bei ausgewählten Präparaten eine Elektrodeninsertion. Da für die Durchführung der Versuche eine schnelle Absenkung der Temperatur auf unter 0 °C notwendig war, wurde dies im Labor durch Kühlung mit Trockeneis (CO₂ solid) erreicht.

3.2 Operativer Zugangsweg

In unserer Studie erfolgte bei 3 Felsenbeinpräparaten ex-vivo eine endosteale CI-Elektrodeninsertion. Diese vororientierende Insertionsmethode zur endostealen Elektrodeninsertion wurde lediglich zur Machbarkeitsstudie genutzt und wird bei sicherer Elektrodeninsertion durch den intraoperativen Zugangsweg der Standard-Methode ersetzt. Die Implantationsmethode wird nachfolgend beschrieben. Um eine gute Zugänglichkeit des Promontoriums und der Rundfensternische zu erreichen, wurden die hintere Gehörgangswand, das Trommelfell und Teile der Gehörknöchelchenkette (Hammer und Amboss) mechanisch schonend abgetragen [103] (Abb. 6).

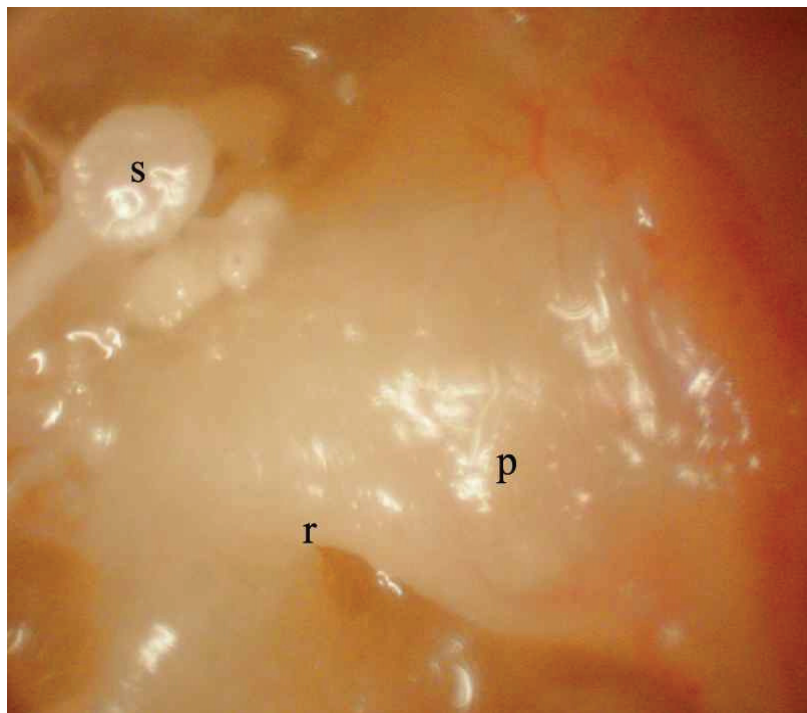


Abb. 6: Darstellung eines Felsenbeines nach Abtragung der hinteren Gehörgangswand, des Trommelfells sowie Hammer und Amboss; s: Stapes, p: Promontorium, r: Rundfensternische

Durch flächiges Abtragen des Promontoriums, mittels eines Fräskopfes mit kegelförmigen Profil, wurde der Zugang zur Gehörschnecke präpariert. Vor und unterhalb der Rundfensternische wurde dann ein 2 mm x 2 mm großer Bereich des Promontoriums nach anterior-superior abgetragen [103] (Abb.7 a).

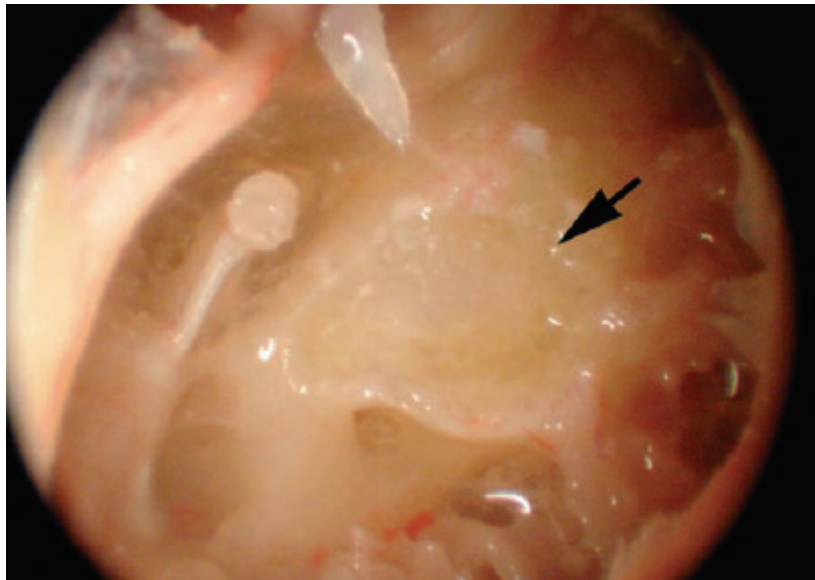


Abb. 7 a: Darstellung des Promontoriums bei Beginn der Knochenabtragung

Bedeckte nur noch eine sehr dünne Knochenschicht (nach Abtragung von 1 – 2 mm) die basale Schneckenwindung, wurde diese als sog. „blue line“ [103] erkennbar (Abb. 7 b).

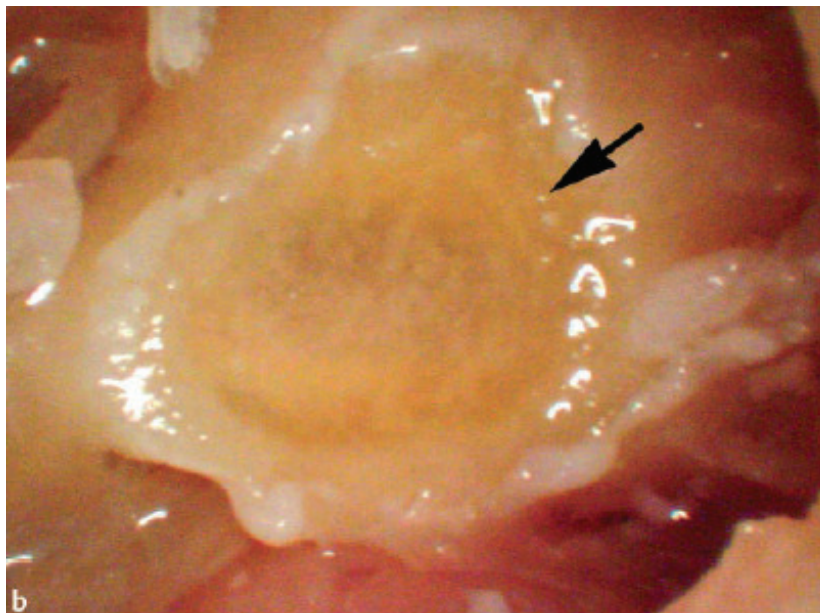


Abb. 7 b: sichtbare „blue line“ (basale Schneckenwindung) während der Präparation

Die Abtragung der dünnen Knochenschicht erfolgte mit Mikrohäkchen (Fußplattenheber) und führte zur Freilegung der Weichteile (Lig. spirale) des Innenohres (Abb.7 c). Der abgetragene Knochenbereich betrug etwa 1,5 mm x 1,5 mm [103].

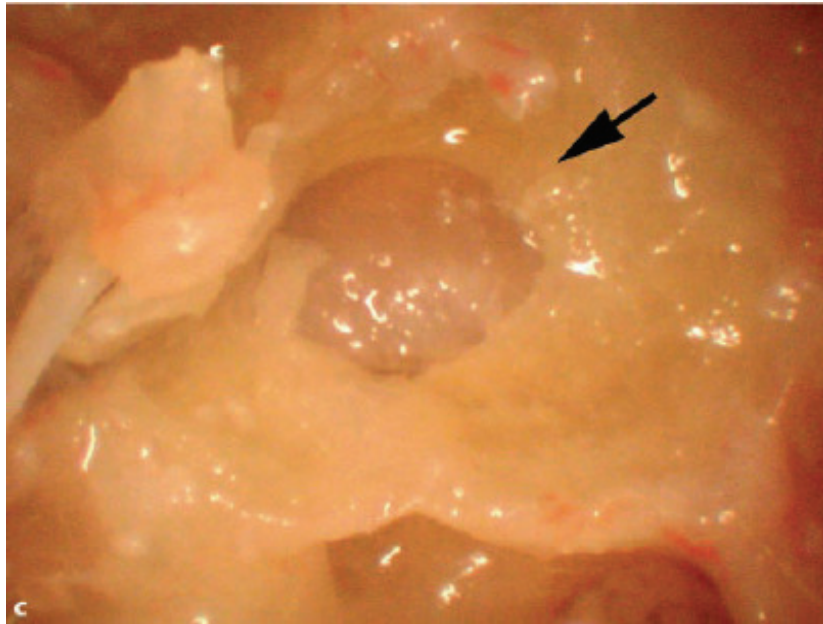


Abb. 7 c: Freilegung lateraler Bestandteile der häutigen cochleären Basalwindung

Zur Insertion der endostealen Elektroden (Firma *Cochlear*) wurde diese unter einem nach innen gerichteten minimalen Druck unter die apikale Knochenkante vorgeschoben und in basoapikaler Richtung weiter bis zum Erreichen der Zielposition inseriert. Dabei glitt die Elektrode tangential auf dem Lig. spirale des Innenohres [103].

3.3 Kryoschleifvorrichtung

Die zu konzipierende und als Prototyp zu fertigende Kryoschleifvorrichtung sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Fixierung des eingepassten Präparates
- kontinuierliche Kühlung des Präparates
- hohe mechanische Stabilität
- gute Wärmeleitfähigkeit
- exakt definierter Vorschub in μm -Abständen

Durch die Auswahl eines geeigneten Grundwerkstoffes war eine möglichst hohe mechanische Stabilität und gute Wärmeleitfähigkeit zu gewährleisten: Nach Silber stellt Kupfer das Metall mit der besten Leitfähigkeit dar. Auch als Legierung mit Zink, sog. Messing, wird eine gute, jedoch geringere, Leitfähigkeit erreicht. Die Abriebfestigkeit eines Werkstoffes wird insbesondere durch die Oberflächenhärte bestimmt. Diese entspricht bei Silber in etwa der von Kupfer und Zink. Als Legierung (z. B. Messing) nimmt die Härte von Kupfer zu [14]. Eine besonders hohe Härte bei gleichzeitig guter Wärmeleitfähigkeit hat Bronze. Unter Kosten-Nutzen-Abwägung wurden die an die zu fertigende Schleifvorrichtung gestellten Ansprüche der hohen mechanischen Stabilität und guten Leitfähigkeit durch den Grundwerkstoff Messing erfüllt. Die Kühlung des Kryopräparates erfolgte mit $\text{CO}_2_{\text{solid}}$.

3.3.1 Konstruktive Auslegung der Kryoschleifvorrichtung

Es wurde eine Kryoschleifvorrichtung konstruiert und gefertigt (Abb. 8), die als Grundkörper aus einem nach oben geöffneten Messingbecher bestand [16, 57, 58, 102]. Der Messingbecher ermöglichte eine Auffüllung mit einem Kühlmittel (Abb. 9). In den Boden des Bechers war eine Innenwanne eingepasst, die ebenfalls nach oben geöffnet war. Die Innenwanne war mit einer Wechselfixierungshülse (\varnothing 12 mm) ausgekleidet, in die das entsprechende Knochenpräparat eingepasst wurde (Abb. 10). Mittels eines Stößels konnte das Präparat bis zum Erreichen des abzuschleifenden Überstandes aus der Wechselfixierungshülse nachgeführt werden. Ein über den Messingbecher gesetzter Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schutzbecher mit Entlüftungsöffnungen diente der Isolierung der Kühlmasse nach innen und außen, um ein manuelles Arbeiten im Temperaturbereich unter 0 °C zu ermöglichen. Eine PTFE-Schale diente als Ablagefläche.

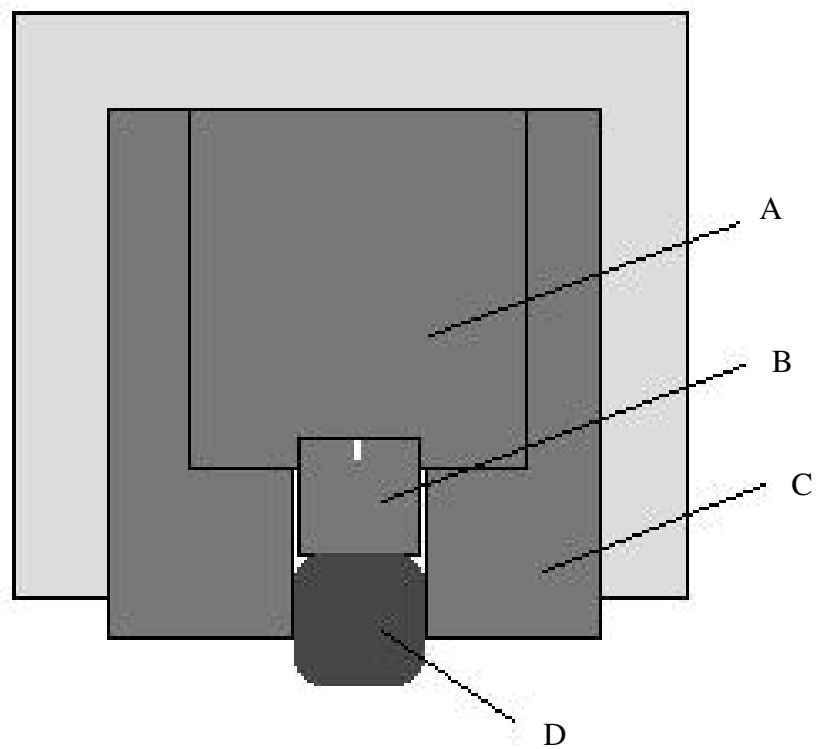


Abb. 8: Kryoschleifvorrichtung, schematische Darstellung , A: Kühlmittel, B: Stößel/Nachstellschraube, C: Messingbecher, D: Kryopräparat

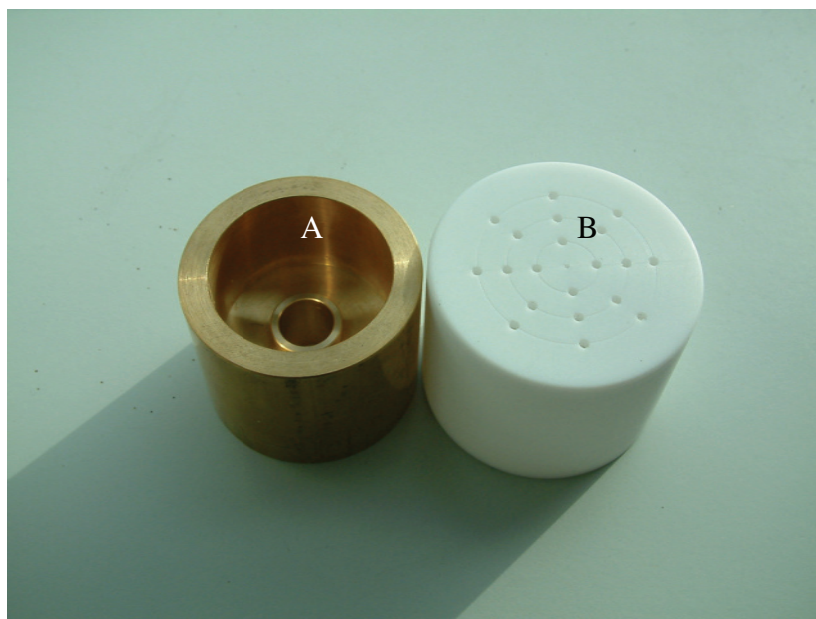


Abb. 9: Kryoschleifvorrichtung, Draufsicht, A = Messingbecher, B = PTFE-Schutzbecher

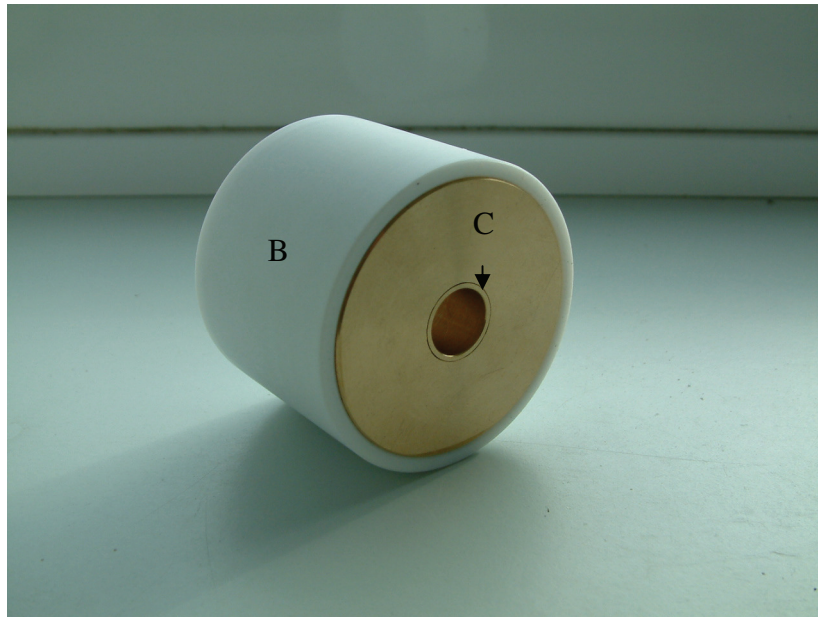


Abb. 10: Kryoschleifvorrichtung, perspektivische Seitenansicht im montierten Zustand,
B = PTFE-Schutzbecher, C = Messingwanne mit Wechselfixierungshülse

Vor der Einbringung der Felsenbeinpräparate in die Kryoschleifvorrichtung wurden alle Kryopräparate mit einer Diamantdrahtsäge (Histo Saw DDM-P216, Medim, Gießen) zylindrisch (\varnothing 12 mm) getrimmt, um ein Einpassen in die Wechselfixierungshülse zu ermöglichen. Das Volumen der Felsenbeinpräparate B, C und E wurde zuvor mittels einer Feinsäge unter kontinuierlicher Kühlung mit Trockeneis (Linde AG, Ludwigshafen) halbiert. Die in die Kryoschleifvorrichtung eingesetzten Präparate verblieben jeweils bis zum Abschluss des gesamten Versuchsdurchlaufs in der Kryoschleifvorrichtung.

3. 3. 1. 1 *Optimierung der Kryoschleifvorrichtung*

Während des Schleifens des humanen Felsenbeinpräparates A erwies sich das Nachführen der Knochenprobe mittels des Stößels als unpräzise in der Reproduzierbarkeit: Aufgrund der nach oben geöffneten Innenwanne war für das Felsenbeinpräparat kein Widerlager vorhanden, was bei aufgebrachtem Anpressdruck beim Schleifen zu einer Reponierung des Präparates führte. Daher erfolgte im weiteren Verlauf der Arbeiten eine ständige Verbesserung der Kryoschleifvorrichtung. Die Wanne wurde mit einem Innengewinde versehen, in das eine Nachstellschraube aus Messing eingepasst wurde. Damit konnte für das eingesetzte Felsenbeinpräparat ein Widerlager gewährleistet werden, welches bei Krafteinwirkung auf das Präparat eine Reponierung der Probe verhinderte. In die obere Deckschicht der Nachstellschraube wurden Teilstriche in einer Winkelteilung von 18°

eingefräst. Damit war aufgrund der gewählten Gewindesteigung ein Vorschub des Präparates in exakten Schritten von 50 µm möglich. Der Vorschub erfolgte mit Hilfe eines Schlitzschraubendrehers, für den mittig der Deckplatte eine Kerbe eingefräst worden war (Abb. 11).



Abb. 11: Nachstellschraube mit Kerbe und eingefrästen Teilstrichen (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Infolge der kontinuierlichen Flüssigkeitseinwirkung auf die Kryoschleifvorrichtung beim Schleifvorgang, bildete sich während des Zwischenfrierens Eis zwischen dem Gewinde und der Nachstellschraube sowie zwischen dem Messingbecher und dem PTFE- Schutzbecher.

Um das Entfernen des Schutzbeckers nach dem Zwischenfrieren zu optimieren, wurden während der Versuchsdurchführung mit Präparat B zwei senkrechte Aussparungen in den PTFE-Schutzbecher geschnitten. Durch das Einfräsen einer basisnahen, ringförmigen Rinne, die einem Hebel als Widerlager diente, und dem Aufbringen von Silikonfett auf die Außenseite des Messingbeckers, wurde das Ablösen des PTFE-Schutzbeckers erleichtert. In den Boden der Kryoschleifvorrichtung wurde mittels eines Metallstiftes eine Markierung für die Ausrichtung des Präparates bei den Makroaufnahmen gesetzt.

3.4 Kühlprozedur

Für die Gefrierschliffpräparation war eine konstante Kühlung des Kryopräparates sowohl während des Schleifens als auch während der Zwischenlagerung notwendig. Das Kühlmittel sollte möglichst einfach zu verarbeiten sein und einen schnellen Arbeitsablauf gewährleisten.

3.4.1 Kryoschliffpräparation

In den Vorversuchen zur Methodenentwicklung erfolgte die Kühlung des jeweiligen eingepassten Felsenbeinpräparates während der Kryoschliffpräparation mit einem Kühlmittelgemisch aus CO₂ solid und einer Auffüllung von ca. 5 ml 96%igem Ethanol in den Messingbecher, um eine bessere Kühlwirkung zu erreichen. Während der Arbeit mit den verschiedenen Präparaten kam es zu einem relativ schnellen Auftauen des Kühlmittelgemisches in der Kryoschleifvorrichtung sowie des eingepassten Felsenbeinpräparates. Daraus resultierte die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Nachbefüllung mit dem Kühlmittelgemisch, so dass in Abwägung von Aufwand und erzielter Präparationsqualität auf diese Methode bei den weiteren Untersuchungen verzichtet wurde. Die weitere Kühlung erfolgte lediglich mit CO₂ solid.

3.4.2 Zwischenlagerung

Die Zwischenlagerung der humanen Felsenbeinpräparate während der Vorversuche zur Methodenentwicklung erfolgte in einem Gefrierschrank (Fa. Liebherr) bei -21 °C. Das ovine Präparat D wurde in der Machbarkeitsstudie in einem Gefrierschrank (Fa. Kryotec, Hamburg) bei -80 °C gelagert. Die Mindestdauer der Zwischenkühlung betrug 15 Minuten.

3.4.3 Temperatur-Zeit-Verhalten im Schliffpräparat

Die Präparation von Kryofelsenbeinpräparaten setzt eine kontinuierliche Temperatur von unter 0 °C voraus. Um diese während der Schliffpräparation zu gewährleisten, wurde das Temperatur-Zeit-Verhalten des Kryopräparates ermittelt.

3 Material und Methoden

Zur Erfassung der maximalen Schleifzeit, innerhalb der die Temperatur an der Präparatoberfläche $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschreitet, wurde das Temperatur-Zeit-Verhalten in Abhängigkeit vom Anpressdruck ermittelt. Der Druck resultierte aus dem Eigengewicht der Halterung und war somit konstant ($0,041\text{ N/mm}^2$). Für die Temperaturmessungen wurde ein Kontaktthermometer (GTH 1 200 A, Greisinger Electronic, Regenstauf) verwendet. Es wurde eine 17 mm tiefe Bohrung mit einem \varnothing von 3 mm vorgenommen, die zum Boden der Halterung und damit zur Oberfläche des Präparates einen Abstand von 1,2 mm hatte (12). Das Bohrloch diente zur Aufnahme des Thermoelementes sowohl in starrer als auch in flexibler Ausführung, in kraftschlüssiger Verbindung.

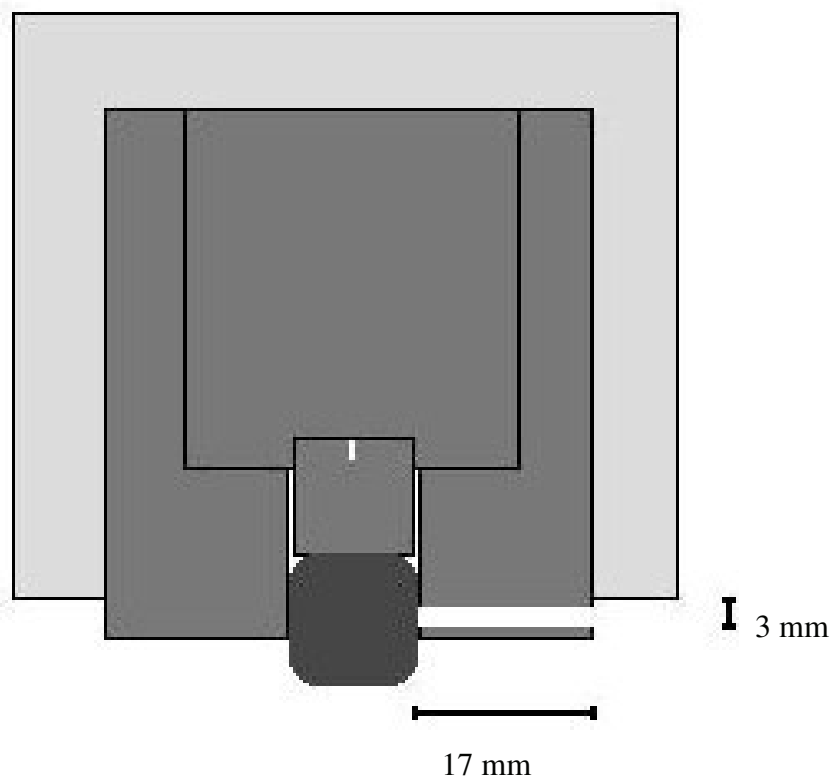


Abb. 12: schematische Darstellung der Kryoschleifvorrichtung mit Bohrloch zur Aufnahme eines Kontaktthermometers

Zur Ermittlung des Temperatur-Zeit-Verhaltens wurden die Versuche mit dem ovinen Felsenbeinpräparat durchgeführt. Vor dem Schleifprozess wurde der Messingbecher mit $\text{CO}_2\text{ solid}$ gefüllt und damit die Temperatur des Präparates auf $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesenkt. Zur Messung der jeweiligen Schleifdauer wurde eine digitale Stoppuhr verwendet. Die Ausgangstemperatur und die erreichte Endtemperatur nach dem Schleifprozess wurden mit dem Kontaktthermometer ermittelt. Vor der Zwischenfrierung, die mindestens 15 Minuten bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ betrug und auf die Schliffpräparation folgte,

erfolgte zur zusätzlichen Fixierung des Felsenbeinpräparates eine Wasserauffüllung mit Hilfe eines Wattestäbchens (s. 3. 4. 2)

Die Messungen erfolgten in zwei Versuchsreihen. In der ersten Versuchsreihe wurden Werte von 15 Temperaturmessungen ermittelt. Messpunkte wurden bei 0, 15, 30, 35, 40, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210 und 240 Sekunden genommen. Der Abstand der Schliffebenen betrug 50 μm . In der ersten Versuchsreihe erfolgte trotz vorsichtigen Auffüllens des Wassers eine starke Vereisung des Bohrloches nach den Zwischenfrierungen. Eine vollständige mechanische Entfernung des Eispfropfens gelang nicht. Daraus resultierte eine größere Distanz der Elektrode zum eingepassten Präparat.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die 15 Temperaturmessungen analog zur ersten Versuchsreihe wiederholt. Da ein Kunststoffstopfen das Bohrloch des Messingbechers während der Wasserauffüllung und der anschließenden Zwischenfrierung verschloss und nachfolgend geringfügige Eisbildungen mechanisch entfernt werden konnten, war der direkte Kontakt des Thermoelementes zum Präparat gewährleistet. Damit waren die Voraussetzungen für die Temperaturmessung unter verbesserten Bedingungen gegeben.

3. 5 Kryoschliffpräparation

Die Kryoschliffpräparation stellt ein schonendes Verfahren zum Materialabtrag dar, mit dem ein exakt definierter Präparatüberstand entfernt werden kann. Damit ein exakter Materialabtrag und eine Minimierung mechanischer Schäden gewährleistet werden kann, ist eine gewisse Festigkeit und Fixierung der Probe sowie eine Optimierung der Schleifzeit notwendig.

Unter Gewährleistung dieser Anforderungen haben wir in unserer Arbeit die Kryoschliffpräparation mit folgender Fragestellung durchgeführt:

- Können gut beurteilbare, aussagekräftige Schliffebenen erzielt werden?

3.5.1 Schliffpräparation

Die Schliffpräparation erfolgte ohne zusätzliche Druckwirkung auf die Kryoschleifvorrichtung mit einer 1 000er Schleifpapierkörnung bei kontinuierlicher Wasserzufuhr. Als Anpresskraft wirkte lediglich das Eigengewicht der Kryoschleifvorrichtung auf das Präparat ein. Der Schleifvorgang wurde jeweils bis zum Erreichen des vollständigen Abtrages des Präparatüberstandes unter visueller Kontrolle (Planarität des Präparates mit der Auflagefläche der Kryoschleifvorrichtung) durchgeführt. Die erste plane Schliffebene, die nach erstmaligem vollständigem Anschliff erreicht wurde, wurde als Ebene 1 bezeichnet.

Die abgetragenen Schichtdicken variierten je nach Präparatvolumen bzw. Methodenverwendung. Bei Felsenbeinpräparaten mit einem Präparatvolumen von ca. 1 cm^3 (Ausnahme: Präparat A) ermöglichte das Schleifen in Schliffebenenabständen von $150\text{ }\mu\text{m}$ zu Beginn ein schnelleres Auffinden cochleärer Strukturen. Im Bereich der Cochlea wurde der Materialabtrag bei allen Felsenbeinpräparaten auf $50\text{ }\mu\text{m}$ verringert (Ausnahme: Präparat A, B), um nachfolgend möglichst exakte Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Cochlea zu erhalten.

Der Materialabtrag beim Felsenbeinpräparat A war aufgrund der fehlenden Optimierung der Kryoschleifvorrichtung nicht in exakt definierten Schliffebenenabständen möglich (s. *Optimierung der Kryoschleifvorrichtung*).

Während der Vorversuche zur Methodenentwicklung waren Schliffebenenabstände von $250\text{ }\mu\text{m}$ bei dem humanen Präparat B ausreichend.

Aufgrund der zuvor nicht optimierten Schleifzeit kam es trotz kontinuierlicher Kühlung mit $\text{CO}_2\text{ solid}$ zu oberflächlichen Temperaturerhöhungen über $0\text{ }^\circ\text{C}$ des Kryoschliffpräparates (Abb. 13).

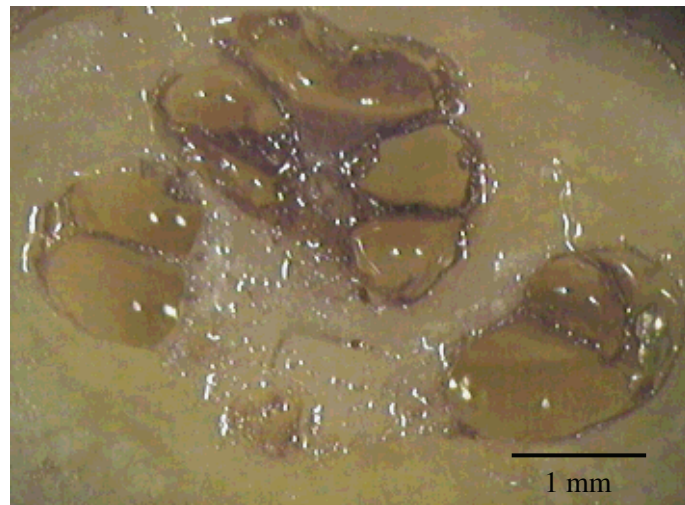


Abb. 13: humanes Felsenbeinpräparat B, Schliffebene 1 – 250 μm (projektionsmikroskopische Aufnahme)

3. 5. 1. 1 *Ermittlung der Präparatplanarität*

Um die Schleifzeiten der Schliffpräparation zu optimieren und damit präparationsbedingte Strukturschäden und Ausbrüche zu vermeiden, wurde in einem Vorversuch der Zeitpunkt der erreichten Planarität des Präparates ermittelt.

Unter Verwendung eines Digitalmessschiebers (CD-15 CR, Mitutoyo, Neuss) wurde in zwei Versuchsdurchgängen gemessen, ab welcher Schleifdauer das Felsenbeinpräparat D plan geschliffen war. Im ersten Versuchsdurchgang erfolgten Messungen nach einer Schleifzeit von 210, 150, 120, 105 und 75 Sekunden. Diese Messungen wurden im zweiten Versuch ergänzt (90, 75, 60, 45 und 30 Sekunden) und zur Validierung stichprobenartig wiederholt. Die ermittelten Messungen erwiesen eine Planarität nach einer mittleren Schleifdauer von 75 Sekunden.

3. 5. 2 *Präparatfixierung*

Die Felsenbeinpräparate wurden mittels einer Feinsäge getrimmt, in die Wechselfixierungshülse der Kryoschleifvorrichtung eingepasst und somit fixiert. Während der Kryoschliffpräparation wurde diese Fixierung der Präparate aufgrund der Inkongruenz des Präparates zur Hülse z. T. nicht bis zum vollständigen Abschluss der Schliffpräparation gewährleistet. Daher wurden nachfolgende ergänzende

Methoden zur Fixierung der Felsenbeinpräparate in die Wechselfixierungshülse der Kryoschleifvorrichtung erprobt.

3. 5. 2. 1 Wasserauffüllung

Zur Fixierung der humanen Felsenbeinpräparate A, B und E sowie des ovinen Präparates D in der zylindrischen Probenaufnahme erfolgte eine Wasserauffüllung der Wechselfixierungshülse sowie dem jeweiligen eingepassten Felsenbeinpräparat zur Präparatstützung mit nachfolgender Zwischenfrierung von mindestens 15 Minuten.

Beim humanen Felsenbeinpräparat B war infolge der relativ hohen Oberflächenspannung des Wassers ein Eindringen in die Hohlräume und somit eine komplette Wasserauffüllung des Präparates nicht immer gewährleistet. Deshalb wurden die folgenden Wasserauffüllungen unter Verwendung eines Wattestäbchens durchgeführt. Dies erforderte während des Auffüllens einen direkten Kontakt des Wattestäbchens mit der Wasseroberfläche, was infolge der Kapillarkräfte an der Grenzfläche zu einem verbesserten Eindringen des Wassers führte. Diese Methode erwies sich als praktikabel und führte zu einer sehr guten Wasserauffüllung des Präparates.

Für einen Vergleich von einer durch die Wasserauffüllung mit nachfolgender Zwischenfrierung möglichen induzierten Volumenexpansion innerhalb des Präparates wurde beim Felsenbeinpräparat D, im Unterschied zu den anderen Felsenbeinpräparaten, zunächst keine Wasserauffüllung durchgeführt. Im oberen Bereich des Präparates D löste sich während der Schliffpräparation ein Knochenfragment. Um das gelockerte Knochenfragment zu stützen, erfolgte erneut eine Auffüllung mit Wasser. Da starke Eiskristallbildungen auf der Oberfläche des Präparates D zu einer Beeinträchtigung der Bildqualität während der Dokumentation führten, wurden zur Verbesserung der Bildqualität Vergleichsaufnahmen mit 96%iger Ethanolspülung und ohne Ethanolspülung angefertigt (Abb. 14 und 15).

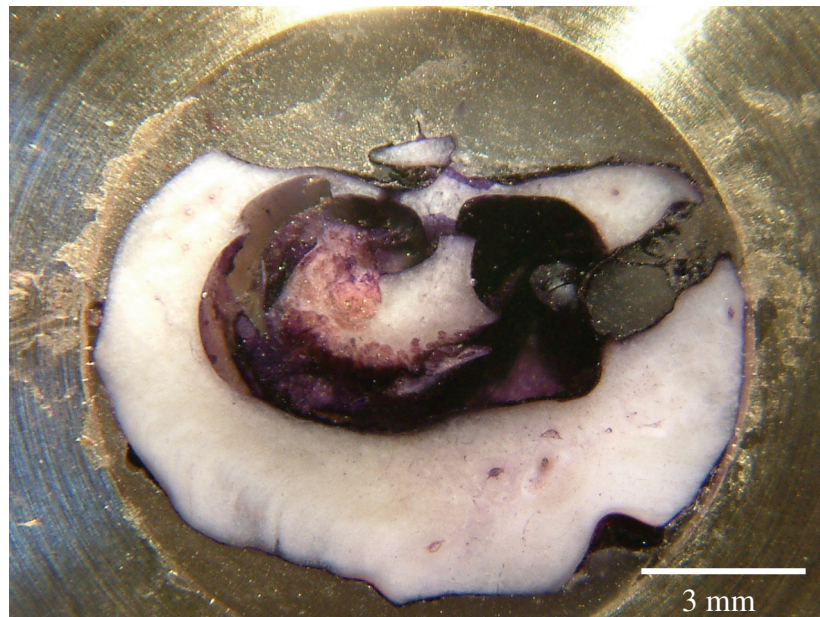


Abb. 14: ovines Felsenbeinpräparat D mit 96%iger Ethanolspülung, Schliffebene 1 – 3650 μm (makroskopische Aufnahme)

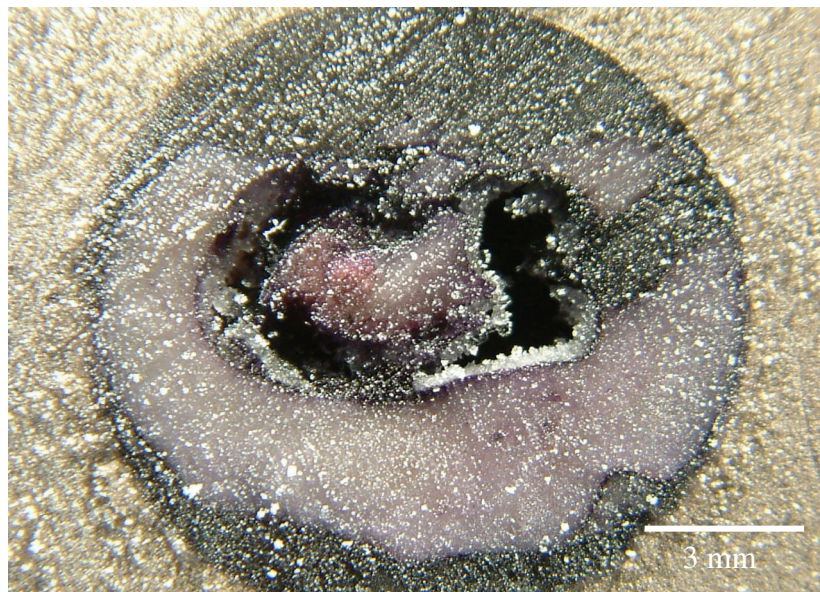


Abb. 15: ovines Felsenbeinpräparat D ohne Ethanolspülung, Schliffebene 1 – 3650 μm (makroskopische Aufnahme)

Makroskopische Aufnahmen des humanen Felsenbeinpräparates D nach Ethanolspülung ermöglichten eine gute Darstellung des Präparates. Eiskristallbildungen wurden nicht beobachtet. Die Präparatdarstellung nach der Schliffpräparation ohne erfolgte Ethanolspülung wies eine starke Bildung

von Eiskristallen auf. Damit war die Bildqualität nicht ausreichend und eine detaillierte Beurteilung der Membranintegrität war nicht möglich.

3. 5. 2. 2 *Zahnfüllungskomposit*

Um eine zusätzliche Stabilisierung zu gewährleisten, wurde das Felsenbeinpräparat D anschließend in ein lichthärtendes Zahnfüllungskomposit (Grandio Flow, Voco GmbH, Cuxhaven) eingebettet, das lediglich in die Wechselfixierungshülse eingebracht wurde. Ein Kontakt des Zahnfüllungskomposits zu intracochleären Strukturen bestand nicht. Zur Aushärtung wurde ein Polymerisationsgerät mit 500 mW/cm² verwendet.

3. 5. 2. 3 *Modellierwachs*

Nachfolgend wurde die Stützung des Felsenbeinpräparates D durch eine Einbettung in Modellierwachs (Langhammer u. Gasda GmbH, Wörrnitz) gewährleistet. Dafür wurde das Präparat auf CO₂ solid zwischengelagert, während die Kryoschleifvorrichtung auf Zimmertemperatur erwärmt und von jeglichem Kondenswasser befreit wurde. Das Modellierwachs wurde unter Schonung der intracochleären Strukturen in die Innenwanne der Kryoschleifvorrichtung eingebracht. Zur planen Fixierung des Präparates im Wachs wurde dieses mit Hilfe eines Metallblocks großflächig belastet und anschließend bei -80 °C zwischengelagert.

3. 6 *Histologische Färbungen*

Ziel der Anfärbung des Felsenbeinpräparates war es, die Membranen von den knöchernen Strukturen unterscheidbar zu machen und die Membranintegrität zu beurteilen.

Die direkten Färbungen der kontinuierlich gekühlten Kryofelsenbeinpräparate wurden mit zwei verschiedenen Farbstofflösungen durchgeführt. Als Färbungen wurden eine Färbung mit Toluidinblaulösung sowie eine Hämalun-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) gewählt. Für beide Farblösungen wurde die Zeit bis zur optimalen Anfärbung des Präparates gemessen bzw. die Inkubationszeit ermittelt. Die Ergebnisse wurden verglichen.

Zusätzlich erfolgte eine immunhistochemische Färbung ausgewählter „Tissue Prints“ des humanen Felsenbeinpräparates E.

3. 6. 1 Häkalaun-Eosin-Färbung

Die H.-E.-Färbung ist eine in der Routine oft verwendete Kernfärbung mit Häkalaun und einem anschließenden Nachfärben mit Eosin. Erreicht wird dadurch eine Blaufärbung, u. a. der Zellkerne. Alle übrigen Strukturen werden mittels Eosin rot gefärbt (z. B. Zytoplasma). Ein häufig verwendetes Häkalaun ist Mayers saures Häkalaun, mit dem ein Überfärben praktisch nicht möglich ist [117].

Die Standard-H.-E.-Färbung erfolgt wie nachfolgend beschrieben:

- 3 Minuten Häkalaun (Mayers Häkalaunlösung 1 : 5, Merck, Bestellnummer: 1.09249)
- 1 x mit Aqua dest. spülen
- 10 Minuten in Leitungswasser bläuen
- 10 Sekunden Eosin (0,5 %, Carl Roth GmbH, C. I. 45380)
- ca. 10 Sekunden mit Aqua dest. spülen
- 10 Sekunden 70 % Ethanol
- 10 Sekunden 96 % Ethanol
- 4 Minuten absolutes Ethanol
- 2 Minuten Xylol
- 3 Minuten Xylol

3. 6. 1. 1 *Modifizierte Häkalaun-Eosin-Färbung*

Um nachzuweisen, dass eine H.-E.-Färbung bei gefrorenen Nativpräparaten in modifizierter Form (mit nur einer Spülung mit 96%igem Ethanol) und ohne Qualitätsverlust für die Darstellung der cochleären Membranen machbar ist, wurden nachfolgende drei Färbungen der Felsenbeinpräparate A und E im Vergleich durchgeführt: Standard-H.-E.-Färbung; modifizierte H.-E.-Färbung, d. h. standardmäßige H.-E.-Färbung bis einschließlich Spülung mit 96%igem Ethanol; modifizierte H.-E.-Färbung, d.h. standardmäßige H.-E.-Färbung bis einschließlich der Spülung mit 96%igem Ethanol, ohne vorherige Spülung mit 70%igem Ethanol. Für die letztgenannte H.-E.-Färbung wurde die optimale Inkubationszeit des Häkalauns ermittelt. Die Färbungen erfolgten bei Inkubationszeiten von 2 und

3 Minuten. Die Kriterien des anschließenden Vergleichs waren eine gute Differenzierung der Membranen und eine Kontrastierung zum Knochen.

3. 6. 2 Toluidinblaufärbung

Toluidinblau zählt zu den metachromatischen Farbstoffen und wird routinemäßig für die Färbungen von Epoxidsemidünnschnitten verwendet. Basophile und osmiophile Strukturen werden blau gefärbt. Neutralfette werden in osmiertem Material grünlich gefärbt und metachromatische Strukturen erscheinen rotviolett [117].

Für die Färbung wurde 1%ige Toluidinblaulösung (Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze, C. I. 52040) verwendet. Die Toluidinblaufärbungen wurde bei Inkubationszeiten von jeweils 2 und 3 Minuten durchgeführt. Das vorbereitete Präparat A wurde in eine mit Farblösung befüllte Petrischale bei Raumtemperatur (21 °C) überführt. Nach der jeweiligen Inkubation wurde das Präparat aus der Schale entnommen, mit Aqua dest. gespült und nachfolgend mikroskopisch untersucht.

3. 6. 3 Immunhistochemische Färbung von „Tissue Prints“

Die Fertigung von „Tissue Prints“ mit anschließender immunhistochemischer Färbung wurde unter der Fragestellung möglicher zusätzlicher histologischer Verfahren zur verfeinerten morphologischen Darstellung cochleärer Strukturen durchgeführt. Dabei sollte das Kryopräparat möglichst nativ belassen werden und, in Berücksichtigung von möglichen insertionsbedingten Schäden, eine elektrodennahe Struktur angefärbt werden. Die Anfärbung von Connexin-26 (Lokalisation: u. a. Ligamentum spirale) im „Tissue Print“-Verfahren realisiert diese Ansprüche.

3. 6. 3 . 1 „Tissue Printing“

Ein „Tissue Print“ ist ein Gewebeabdruck von Materialien auf einem Printmedium.

Geeignete Gewebe können sowohl pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs sein. Aufgrund der sehr festen Konsistenz und einer relativen Formstabilität (bei Druckeinwirkung) werden bislang bevorzugt Gewebe pflanzlichen Ursprungs verwendet. Jedoch auch tierische Gewebe, welche meist eine

weichere Konsistenz aufweisen als pflanzliche, wurden mit dieser Methode bereits detailliert dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein Gewebeabdruck von tierischen Kryopräparaten ebenfalls machbar ist.

Das „Tissue Printing“ dient dem Nachweis und der Lokalisation von gewebespezifischen Proteinen wie z. B. Zellwandproteinen und Enzymen, Nukleinsäuren und Kohlenhydratabschnitten. Zur Untersuchung der Gewebeabdrücke können diese immunhistochemisch (ELISA, Western-Blot) gefärbt und nachfolgend beurteilt werden [109]. Immunhistochemische Färbungen dienen dem Nachweis und der Identifikation antigener Komponenten in Gewebeschnitten und Zellen anhand spezifischer und markierter Antikörper [117].

Vorteile des „Tissue Printings“ sind ein natives Belassen der Gewebe, eine hohe gewebespezifische Variabilität der Printtechnik sowie eine unbegrenzte Anzahl von möglichen Prints.

Zur Durchführung des Gewebeabdruckes werden Filterpapier und das Printmedium auf eine feste Unterlage gegeben. Als Printräger dienen Nitrozellulosemembranen oder Agarosegel. Das zugeschnittene Gewebe wird mit einer Pinzette auf das Filterpapier aufgebracht. Anschließend wird der Print gefertigt (Abb. 16). Der Gewebeabdruck kann sowohl physikalisch als auch chemisch erfolgen. Ein physikalischer Abdruck ist ein 3-D-Relief des Präparates im Printmedium, das durch Druckeinwirkung auf das Präparat und das Medium entsteht. Chemische Abdrücke basieren auf dem Transfer von Zellwandproteinen in das Printmedium. Dazu wird das Präparat für einen definierten Zeitraum ohne Druckeinwirkung auf das Medium aufgebracht und im Anschluss an die Diffusion vom Medium entfernt.

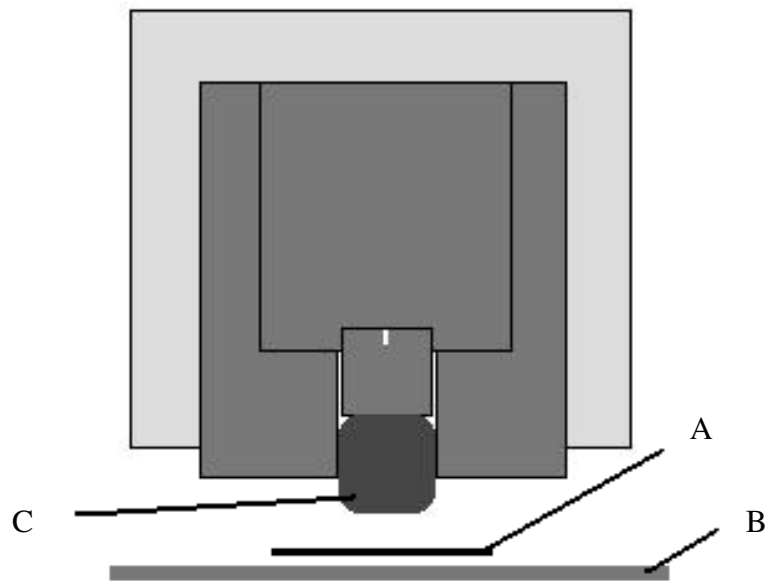


Abb. 16: schematische Darstellung der Kryoschleifvorrichtung zur Anfertigung eines „Tissue Prints“,
A: Printräger, B: Filterpapier, C: Kryopräparat

3. 6. 3. 2 Versuchsdurchführung „Tissue Printing“

Zur Durchführung der „Tissue Prints“ wurden nachfolgende Materialien verwendet:

- § Nitrozellulosemembran, verstärkt, 0,2 µm Porengröße (Opitran-verstärkt, Whatman Schleicher-Schüll)
- § Filterpapier (Filtrak, Spezialpapierfabrik, Niederschlag)
- § Trockentücher

Für die Durchführung des Gewebeabdruckes wurde eine verstärkte Nitrozellulosemembran auf ein Filterpapier aufgebracht. Damit sollte eine beschleunigte Diffusion der Zellwandproteine und der Flüssigkeit in den Printräger erzielt werden. Als Unterlage für das Filterpapier dienten Trockentücher. Anschließend erfolgte der physikalische „Tissue Print bei zuvor definierter Anpresszeit und ermitteltem Anpressdruck. Die Nitrozellulosemembran mit dem Gewebeabdruck wurde nachfolgend immunhistochemisch gefärbt.

In einem Vorversuch wurden der minimale Anpressdruck und die maximale Anpresszeit für eine optimale Diffusion ermittelt. An den minimalen Anpressdruck wurde der Anspruch eines makroskopischen Reliefs mit Fixierung der Zellwandproteine in der Nitrozellulose sowie eine

oberflächliche Temperatursenkung (mit Trockentüchern) gestellt. Bei einem Anpressdruck von etwa 1,73 N/mm² wurden die Anforderungen erfüllt. Die maximale Anpresszeit sollte ein möglichst schonendes Trennen des Printträgers von dem Felsenbeinpräparat ermöglichen. Bereits bei Anpresszeiten von 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Sekunden traten Schäden der Nitrozellulosemembran auf. Mit einer maximalen Anpresszeit von 5 Sekunden konnten die Membranschäden vermindert werden. Das Ablösen der Membran von dem Nativpräparat wurde durch die Verwendung von Kaltluft (29,9 °C) für einige Sekunden nicht verbessert.

Das „Tissue Printing“ mit anschließender immunhistochemischer Färbung erfolgte in zwei Versuchsreihen. In der ersten Versuchsreihe wurde vor jedem „Tissue Print“ das Felsenbeinpräparat E für 20 Sekunden mit einem SiC-Papier (1 000er Körnung) geschliffen und nachfolgend bis zu einem makroskopischen Überstand des Präparates über das Niveau der Schleifvorrichtung vorgeschoben. Die Kühlung erfolgte kontinuierlich mittels CO₂ solid. Von dem humanen Felsenbeinpräparates E wurden 15 Gewebeabdrücke bei Anpresszeiten von 5 Sekunden und einem Anpressdruck von etwa 1,73 N/mm² angefertigt. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung des Gewebeabdruckes A. In der zweiten Versuchsreihe wurde das humane Felsenbeinpräparates E für 30 Sekunden mit SiC-Papier (1 000er Körnung) bei einem Präparatvorschub von 300 µm geschliffen. Die Kühlung des Präparates erfolgte wie in der ersten Versuchsreihe. Bei gleicher Printdauer und entsprechendem Printdruck wurden 8 „Tissue Prints“ des Präparates E angefertigt und nachfolgend ebenfalls immunhistochemisch gefärbt.

3. 6. 3. 3 *Versuchsdurchführung immunhistochemische Färbung*

Die immunhistochemische Färbung von Connexin-26 erfolgte bei ausgewählten „Tissue Prints“ des Felsenbeinpräparates E.

Das Arbeitsschema der immunhistochemischen Färbung und die verwendeten Chemikalien werden in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

3 Material und Methoden

Tab. 11: Immunhistochemische Färbung Felsenbeinpräparat E

Immunhistochemische Färbung-„Tissue Print“	
Blockierungslösung	1 h bei RT (21 °C) inkubieren
Blockierungslösung	abgießen
Antikörper (AK) 1-Lösung	12 h bei 4 °C inkubieren, Rotator MS 1 Minishaker (IKA Works, Wilmington, Nc)
AK 1-Lösung	dekantieren, bei 4 °C lagern (Wiederbenutzung)
Waschlösung	5 x 10 Minuten bei RT waschen
Blockierungslösung	5 Minuten bei RT inkubieren
Blockierungslösung	abgießen
AK 2-Lösung	1 h bei RT inkubieren, Rotator
AK 2-Lösung	dekantieren, bei 4 °C (Liebherr) lagern (Wiederbenutzung)
Waschlösung	5 x 10 Minuten bei RT waschen
Alkalische Phosphatase (APh)-Puffer	5 Minuten bei RT äquilibrieren
APh-Puffer	abgießen
Nitro blue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)-Lösung	2 h bei RT unter Lichtausschluss inkubieren, leichte Rotation

Tab. 12: Chemikalien für immunhistochemische Färbung Felsenbeinpräparat E

Immunhistochemische Färbung-Chemikalien	
Blockierungslösung	TBS (Sigma-Aldrich, MDL-Nummer: MFCD00132476) + 0,05 % Tween 20 + 5 % Magermilchpulver (Humana Milchunion e. G., Herford)
Tris buffered saline (TBS)	50 mM Tris + 150 mM NaCl (0,9 %), Ph 7,4
Alkalische Phosphatase-Puffer (APh-Puffer)	50 mM Tris + 150 mM NaCl, pH 9,4
AK 1-Lösung	Rabbit anti connexin-26 (Zymed, 71-0500) + Blockierungslösung (1 : 250)
Waschlösung	TBS + 0,05 % Tween 20
AK 2-Lösung	Anti rabbit IgG AK-Konjugat (Sigma-Aldrich, A 3687) + Blockierungslösung (1 : 100)
NBT/BCIP-Lösung	5ml APh-Puffer + 33 µl NBT (Promega, S3771) + 16,5 µl BCIP (Promega, S3771)

In der ersten Versuchsreihe wurde der Print A in NBT/BCIP-Lösung für 2 Stunden und für zusätzliche 12 Stunden inkubiert. In der zweiten Versuchsreihe erfolgte die immunhistochemische Färbung von vier ausgewählten Gewebeabdrücken. Die Inkubation in der NBT/BCIP-Lösung wurde über 12 Stunden durchgeführt.

3.7 Dokumentation

Zur Dokumentation der Versuchsdurchführungen und der Ergebnisse wurden probeweise folgende Methoden eingesetzt: makro- und mikroskopischer Aufnahmen (1. Makroaufnahmen, 2. Lichtmikroskopie, 3. Kontaktendoskopie, 4. Rasterelektronenmikroskopie) sowie Probenprotokoll und Datenarchivierung. Damit erfolgten u. a. morphologische und histologische Darstellungen der membranösen Präparatstrukturen.

3.7.1 Makroaufnahmen

Die Makroaufnahmen dienten in der vorliegenden Machbarkeitsstudie der Dokumentation der Methodenentwicklung der Kryoschliffpräparation sowie der Übersichtsdarstellung der Felsenbeinpräparate im Anschluss an die Färbungen.

Bei Makroaufnahmen wird das jeweilige Objekt in einem Maßstab von 1 : 1 oder größer dargestellt [125]. Je geringer der Abstand von Motiv und Objektiv ist, desto größer ist die Vergrößerung. Bei der Verwendung von Digitalkameras (Spiegelreflexkamera) erscheint die Brennweite (Standardbrennweite: Brennweite, die der Diagonalen des Aufnahmeformates am nächsten liegt) optisch länger (1 : 1,5) und ermöglicht in der Makrofotografie eine bessere Objekt-Ausleuchtung [86].

Die Makroaufnahmen erfolgten in unserer Arbeit mit einer Digitalkamera Fine Pix S602 Zoom (9 MPix, Fujifilm, Düsseldorf). Die Kamera wurde auf einem Beta 50 Stativ (Hama, Monheim) höhenverstellbar fixiert. Bei der Positionierung und der Auswahl des gewünschten Bildausschnittes war stets eine gleiche Ausrichtung des Felsenbeinpräparates erforderlich. Für eine hinreichende Objektausleuchtung wurde eine zusätzliche Lichtquelle benötigt. Als Lichtquelle diente das faseroptische Beleuchtungssystem Intralux 5000 (Volpi, Schlieren, Schweiz) mit einer Beleuchtungsstärke von ca. 4.8 Mio. Candela und drei flexiblen Lichtleitern, die ein optimales

Ausleuchten des jeweiligen Felsenbeinpräparates ermöglichten. Die Fokussierung erfolgte manuell unter Nutzung der zusätzlichen Zoomfunktion der Kamera im Makromodus. Zur Vermeidung von Bewegungsunschärfen wurden die Makroaufnahmen mittels eines Selbstauslösers aufgenommen. Durch die geringe Distanz zwischen Objektiv und Präparat erfolgten partielle Abschattungen, die möglichst zu vermeiden waren (Abb. 17).

Makroaufnahmen wurden von den Felsenbeinpräparaten A, B, D und E angefertigt. Beim humanen Felsenbeinpräparat A und E dienten sie zur Dokumentation der verschiedenen Färbungen bei unterschiedlicher Einwirkzeit und Modifizierungen. Bei Präparat B und D dienten die Aufnahmen der Übersichts- und Verlaufsdarstellung.

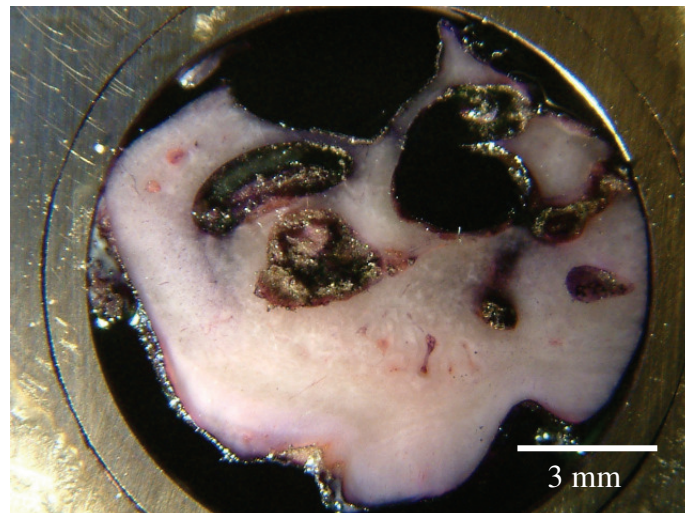


Abb. 17: Präparat A mit Abschattungen (Makroaufnahme)

3. 7. 2 **Lichtmikroskopie**

3. 7. 2. 1 *Auflichtmikroskopie*

Mit Hilfe des Auflichtmikroskops erfolgten Untersuchungen zur cochleären Membranintegrität sowie der Beurteilung der histologischen Anfärbbarkeit von Kryofelsenbeinpräparaten.

Die Auflichtmikroskopie dient der Untersuchung von Proben, die für den sichtbaren Teil des elektromagnetischen Strahlungsspektrums undurchdringlich sind (u. a. Knochen und Bindegewebe). Anwendungsbereiche der Auflichtmikroskopie sind eine Übersicht über das untersuchte Präparat, die

Kontrolle der erreichten Oberflächenqualität sowie mikroskopische Untersuchungen. Beleuchtungsverfahren des Auflichtmikroskops sind u. a. das allseitige Auflicht-Hellfeld und die Dunkelfeldbeleuchtung. Eine Untersuchung im Auflicht-Hellfeld ist möglich, wenn gut reflektierende Proben mit ausreichender Oberflächentopographie (Metalle, Kunststoffe, Keramiken) vorliegen. Objektstrukturen, die das Licht in das Objektiv abbeugen und im Auflicht-Hellfeld häufig vom regulär reflektierten Licht überstrahlt werden (Phasengrenzen, Risse und Lunker) können im Auflicht-Dunkelfeld erkannt werden [113, 130].

Die Präparatuntersuchung mit dem Auflichtmikroskop Axioskop (Zeiss, Oberkochen) erfolgte lediglich im Vorversuch mit dem humanen Felsenbeinpräparat A. Mit Hilfe des Auflichtmikroskops wurden Studien zur H.-E.- und Toluidinblaufärbung durchgeführt.

Zur Untersuchung mit dem Auflichtmikroskop wurde das Präparat in der Kryoschleifvorrichtung auf dem Objekttisch positioniert und ein Objektiv mit 5-facher Vergrößerung verwendet. Mit der im Strahlengang eingekoppelten Videokamera CF 15/4 RGB (+ Frame Grabber FG 34 (Hasotec, Rostock), Kappa, Gleichen) betrug infolge der Auszugsverlängerung die Gesamtvergrößerung 62.5-fach.

Die verschiedenen Färbungen des Präparates wurden sowohl im Hell- als auch im Dunkelfeld beobachtet.

3. 7. 2. 2 *Projektionsmikroskopie*

Untersuchungen mit dem Projektionsmikroskop erfolgten zur Anfertigung von Übersichtsaufnahmen.

Projektionsmikroskope sind im Allgemeinen von Lichtmikroskopen abgeleitete Konstruktionen mit starken Hg-, XBO- oder CsI-Lampen, welche die erforderliche Objektausleuchtung gewährleisten [113]. Das Objektbild wird mit dem jeweiligen Projektivabbildungsmaßstab auf die Okulare bzw. Filmebene einer Kamera projiziert. Der Abbildungsmaßstab (M) des Projektionsbildes wird berechnet aus dem Abbildungsmaßstab des Objektivs, der Auszugslänge (k) und der Brennweite (f):

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}} * \frac{k}{f}$$

Mit Objektivbrennweiten (f) von 50 mm bis 200 mm sind große Projektionsentfernungen möglich [113].

In der vorliegenden Machbarkeitsstudie erfolgten Untersuchungen mit dem Projektionsmikroskop Cobra (Vision Engineering, Neuenhagen) mit adaptierter CCD-Kamera (CF 15/4 RGB + Frame Grabbar FG 34 (Hasotec, Rostock), Kappa, Gleichen) bei den humanen Felsenbeinpräparaten A, B und E.

Mit dem verwendeten Projektionsmikroskop waren 6- bis 70-fache Vergrößerungen erzielbar. Für eine hinreichende Ausleuchtung der Strukturen war eine zusätzliche Lichtquelle erforderlich. Hierfür wurde das faseroptische Beleuchtungssystem Intralux 5 000 (Volpi, Schlieren, Schweiz), vgl. 3. 6. 1, verwendet.

Zur Optimierung der Bildqualität erfolgten beim humanen Felsenbeinpräparat B Aufnahmen des Präparates sowohl ohne Deckglas und ohne Ethanolspülung als auch mit Deckglas und 96%iger Ethanolspülung.

3. 7. 3 Kontaktendoskopie

Die Kontaktendoskopie diente vororientierenden Untersuchungen der Kryofelsenbeinpräparate. Eine optische Vergrößerung der Strukturen und damit eine detailliertere morphologische Beurteilung wurden unter nachfolgender Fragestellung angestrebt:

- Sind kontaktendoskopische Untersuchungen in ausreichender Bildqualität auch bei Kryopräparaten machbar?

Die Kontaktendoskopie ist eine atraumatische, nichtinvasive und wenig zeitaufwendige neue Methode der in-vivo-Gewebedarstellung, die beliebig wiederholt werden kann und eine Beurteilung von oberflächlichen Epithelschichten ermöglicht. Die Stablinse wird dabei direkt auf die Objektoberfläche aufgesetzt. Durch eine Veränderung der Brennweite erfolgt die Scharfeinstellung. Möglich sind 60-fache bis 150-fache Vergrößerungen. Der Durchmesser des Kontaktendoskops und die Intensität der Lichtquelle haben u. a. Einfluss auf die Qualität der wahlweise durchgeführten Kamera- oder Videodokumentation [6, 7, 8, 66].

3 Material und Methoden

Vororientierende Untersuchungen erfolgten hier mit einem starren Kontaktendoskop (Fa. Storz, Tuttlingen) mit einem Blickwinkel von 0° . An das Endoskop war über einen Adapter eine Digitalkamera (DSC-F707, Sony, Köln) angebracht. Zur Verbesserung der Handhabbarkeit wurde eine Haltekonstruktion für das Kontaktendoskop konstruiert und gefertigt (Abb. 18). Damit wurde sowohl eine Fixierung des Endoskops mit der Kamera als auch ein genaues planparalleles Einstellen in horizontaler Ebene ermöglicht.

Kontaktendoskopische Untersuchungen erfolgten lediglich beim ovinen Felsenbeinpräparat D. Die Aufnahmen wurden bei der gerätespezifischen Vergrößerung (60-fach und 150-fach) durchgeführt.



Abb. 18: starres Kontaktendoskop mit Halterung

3. 7. 4 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden unter folgender Fragestellung durchgeführt:

- Ist eine Untersuchung von nativen Kryofelsenbeinpräparaten im Rasterelektronenmikroskop möglich und reproduzierbar?
- Wird eine detaillierte Darstellung cochleärer Strukturen, die morphologische Untersuchungen ermöglicht, realisiert?

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) dient u. a. der topografischen Darstellung von glatten und rauen Oberflächen und ermöglicht deren Analyse. Es werden zwei Modi in der Rasterelektronenmikroskopie unterschieden: 1. konventionelle Rasterelektronenmikroskopie, 2. ESEM-Modus (Environmental Scanning Electron Microscope, Prozessrasterelektronenmikroskop). Für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie sind wasserfreie und elektrisch leitfähige Proben erforderlich. Bei nicht leitenden Präparaten ist daher nach der Trocknung im Exsikkator eine Sputterung, speziell mit Gold, notwendig. Im ESEM-Modus können, ergänzend zum Standard-REM, auch unpräparierte nicht leitende, wässrige, ölige und stark gasende Präparate bei bis zu 2666,44 Pa Kammerdruck untersucht werden [77, 120].

Die Untersuchung der humanen Felsenbeinpräparate mit dem Rasterelektronenmikroskop vom Typ XL 30 ESEM (Philips, Eindhoven) erfolgte lediglich bei den Präparaten B und C jeweils im ESEM-Modus als auch vergleichend im Standard-REM-Modus (höhere Auflösung, kontrastreichere Darstellbarkeit im Standard-REM-Modus). Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen dienten bei Präparat B der Lagebeschreibung und Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit der inserierten Elektrode. Bei Präparat C erfolgte eine morphologische Untersuchung der Membranen nach einer Elektrodenentfernung. Die Abfolge der Untersuchung mit vorheriger Probenvorbereitung ist in Abb. 19 detailliert dargestellt.

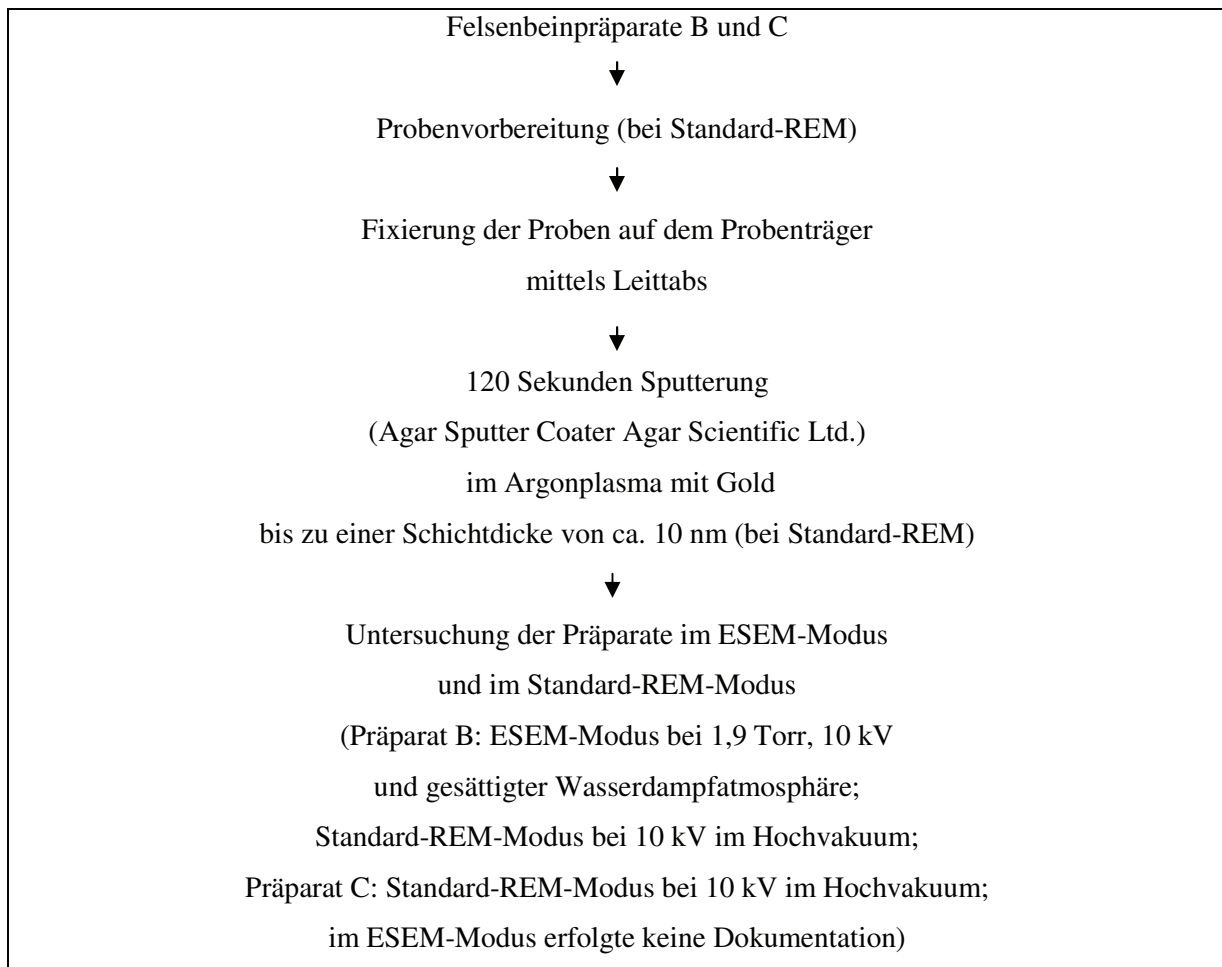


Abb. 19: Untersuchungsabfolge der humanen Felsenbeinpräparate B und C im Rasterelektronenmikroskop

3. 7. 5 Probenprotokoll und Datenarchivierung

Das von uns entwickelte Arbeitsprotokoll diene der Dokumentation der durchgeführten Versuche, der Datenarchivierung und beinhaltet sowohl Angaben zur Probenvorbereitung und Versuchsdurchführung als auch zur mikroskopischen/photographischen Dokumentation. Ein Beispiel ist in Tab. 13 dargestellt.

3 Material und Methoden

Tab. 13: Arbeitsprotokollbeispiel zur Machbarkeitsstudie der Gefrierschliffpräparation

Protokoll zur Machbarkeitsstudie der Gefrierschliffpräparation	
Datum	01.04.2005
Uhrzeit	10:50 Uhr
Präparatbezeichnung	Cochlea, Felsenbeinpräparat D
Spezies	Ovis
Präparation	Prof. Pau
Datum der Elektrodenimplantation	-
Implantiert von	-
Lage der Elektrode	-
Tiefgefroren aufgesägt am	k. A.
Fixierung	Formaldehyd, 4 %
Vorbehandlung nach	
Präparationsvorschrift/Auffüllung mit CO₂ solid	ja/ja
Schleifvorgang/Körnung des	
Schleifpapiers/Schliffebene (µm)	1 000er Körnung/ 1 - 2.200 µm/50 µm
Schliffebenenabstand (µm)	
Durchgeführte Färbung/Materialien/ Inkubationszeiten	H.-E.-Färbung: 3 min./Hämalaun/Spülung mit Aqua dest./10 min. blauen in Leitungswasser (26 °C)/10 sek. Eosin/Spülung mit Aqua dest./10 sek. Ethanol (96 %)
Mikroskopische Dokumentation (Projektionsmikroskop, Endoskop, Rasterelektronenmikroskop, Axioskop)	-
Anzahl der Aufnahmen (Nomenklatur und Verbleib)/Maßstab	-
Photographische Dokumentation	Makroaufnahmen
Anzahl der Bilder (Nomenklatur und Verbleib)/Maßstab	4 Bilder, CD-ROM, Makro_1 bis Makro_4 in 2 200_µm
Lagerung/Dauer der Zwischenfrierung/ Wasserauffüllung	-80 °C/15 min./keine Wasserauffüllung
Bearbeiter/Datum	Anne Herrmann/01.04.2005

4 Ergebnisse

4.1 Kühlprozedur

4.1.1 Schliffpräparation

Die Kühlung der Kryofelsenbeinpräparate mit einer CO₂ solid-Auffüllung ermöglichte als einfache Methode eine rasche Temperatursenkung und gewährleistete ein kontinuierliches Arbeiten. Ein wiederholtes Auffüllen des Messingbechers mit dem Kühlmittel war notwendig.

4.1.2 Temperatur-Zeit-Verhalten im Schliffpräparat

Die Resultate beider Temperaturmessreihen sind in Abb. 20 dargestellt.

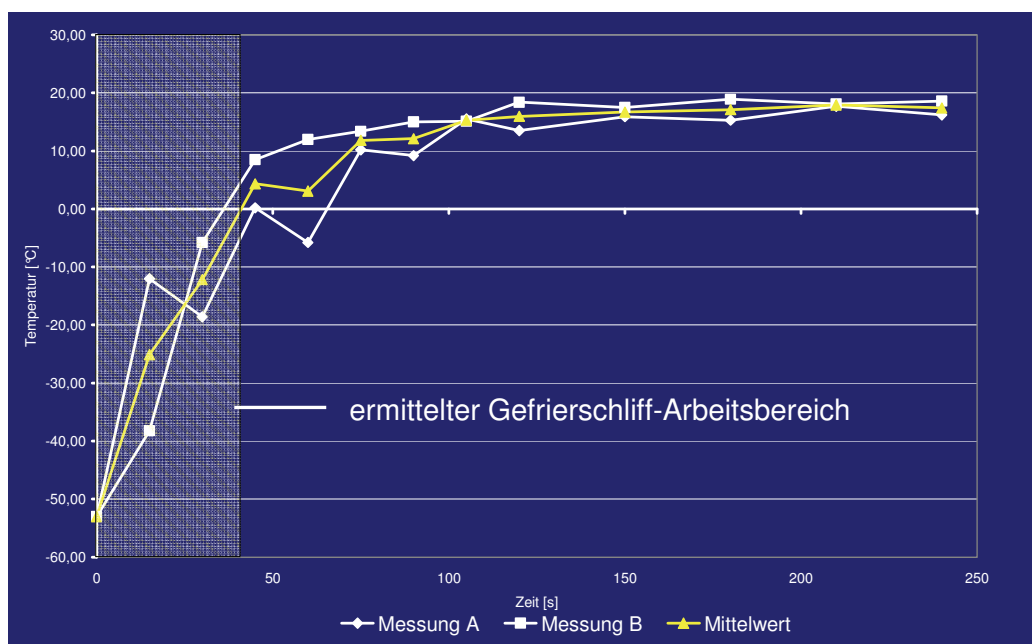


Abb. 20: Temperatur-Zeit-Kurve mit ermitteltem Kryoschliff-Arbeitsbereich

Die Kryoschliffpräparation gewährleistet ein Arbeiten unter 0 °C in einem mittleren Arbeitsfenster von 41 s.

4.2 Kryoschliffpräparation

In Abbildung 21 ist das Felsenbeinpräparat B nach erfolgter Kryoschliffpräparation dargestellt.

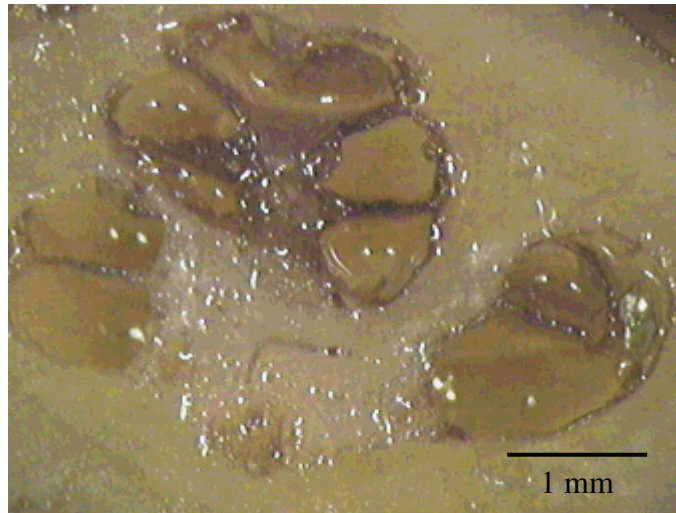


Abb. 21: humanes Felsenbeinpräparat B, Schliffebene 1 – 250 μm (projektionsmikroskopische Darstellung)

Mit der Kryoschliffpräparation konnten gut beurteilbare und aussagekräftige Schliffebenen erzielt werden.

4.2.1 Präparatfixation

Eine Einbettung der Präparate A, B und E mittels Wasserauffüllung und anschließender Zwischenfrierung ermöglichte eine gute Fixierung äußerer (Knochen) und innerer (Membranen) Strukturen bei Temperaturen unter 0 °C.

Präparat D wurde mit dieser Einbettungsmethode lediglich ungenügend gestützt. Die Einbettung des Präparates D in ein lichthärtendes Zahnfüllungskomposit ermöglichte aufgrund der unzureichenden Aushärtung keine Fixierung. Durch eine nachfolgende Einbettung in Modellierwachs wurde eine sehr gute Fixierung der äußeren Knochenstrukturen gewährleistet. Innere Strukturen (Membranen) wurden bei dieser Einbettungsmethode nicht vom Einbettmedium fixiert.

4.3 Histologische Färbungen

4.3.1 Hämalun-Eosin-Färbung

Makroaufnahmen des mit Hämalun-Eosin-Lösung gefärbten Kryofelsenbeinpräparates E nach erfolgter Standard-H.-E.-Färbung und modifizierter Färbemethode sind in Abb. 22 - 24 dargestellt.

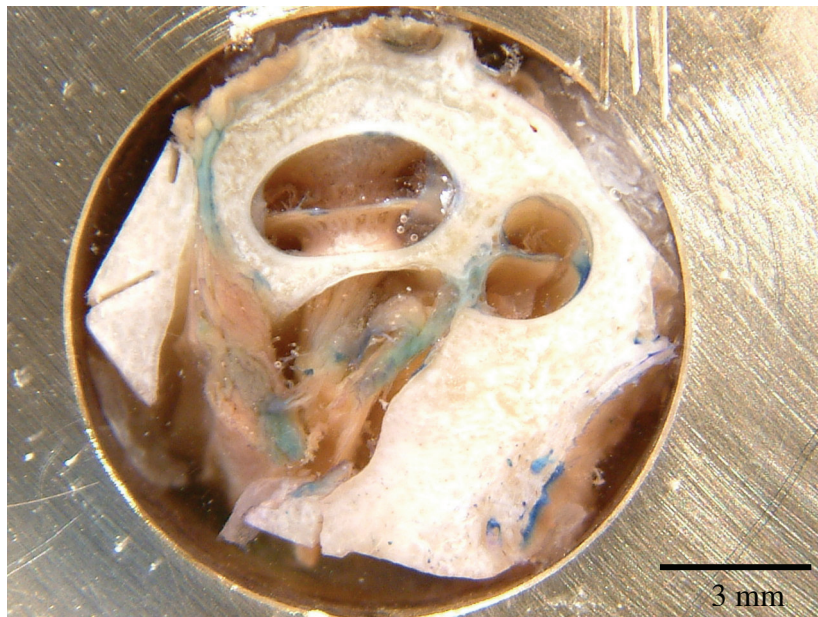


Abb. 22: Standard-H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E (Makroaufnahme)

Bei der Standard-H.-E.-Färbung wurde lediglich eine geringe Anfärbung der Membranen erzielt, so dass eine Beurteilung der gefärbten Strukturen, deren Integrität und die Abgrenzung zwischen Membranen und Knochen nicht sicher möglich war.



Abb. 23: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E, Spülung mit 70%igem und 96%igem Ethanol (Makroaufnahme)

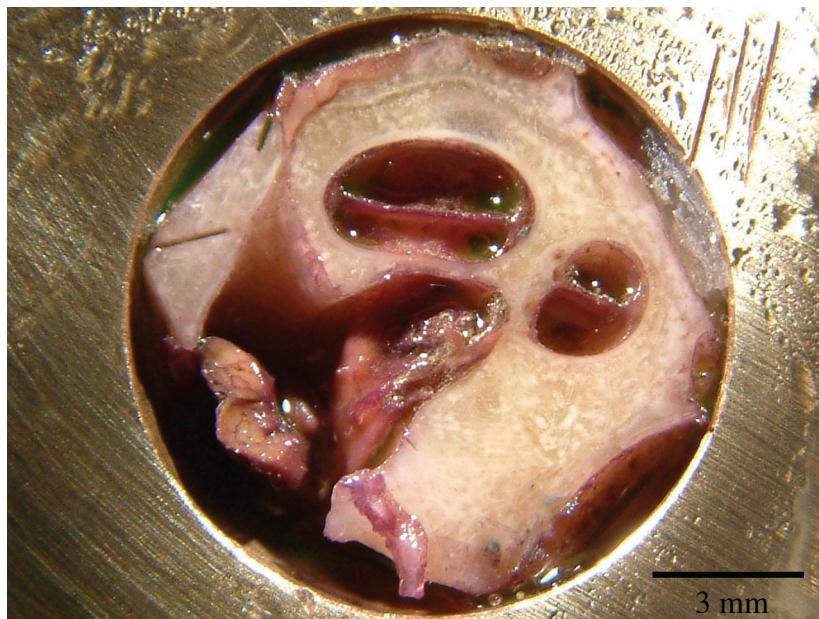


Abb. 24: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat E, Spülung nur mit 96%igem Ethanol (Makroaufnahme)

4 Ergebnisse

Die beiden Färbungen in modifizierter Form erreichten im Vergleich zu der Standard-H.-E.-Färbung eine stärkere Anfärbung der Membranen. Daher wurde eine deutlichere Abgrenzung der knöchernen und membranösen Strukturen sowie eine bessere Beurteilung der cochleären Membranintegrität ermöglicht. Von den beiden modifizierten H.-E.-Färbungen ist die Färbung mit nur einer Spülung (96%iges Ethanol) vorzuziehen, da eine stärkere Anfärbung der Membranen sowie eine bessere Bildqualität erzielt wurde.

Für diese modifizierte H.-E.-Färbung wurde die optimale Inkubationszeit des Hämalauns ermittelt. Die Färbungen des Felsenbeinpräparates A erfolgten bei Inkubationszeiten des Hämalauns von 2 und 3 Minuten (Abb. 25, 26).

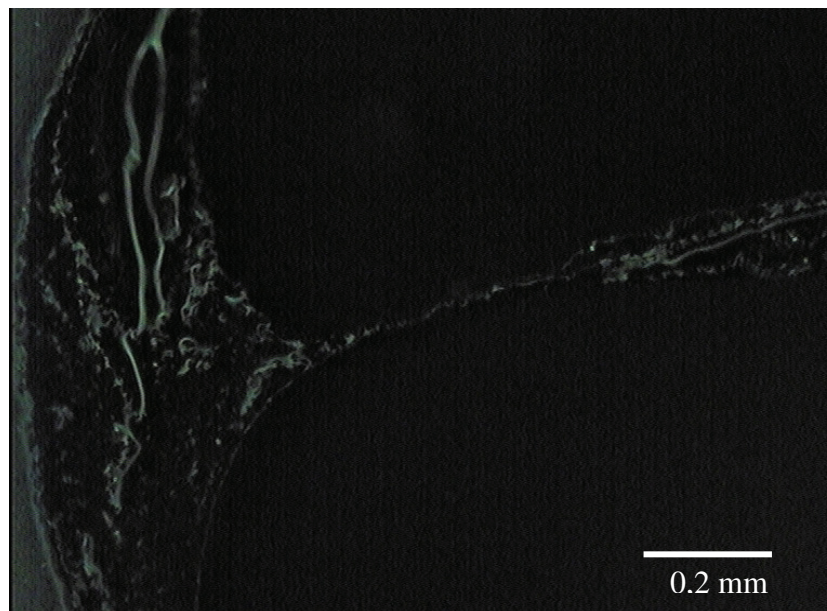


Abb. 25: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 2 Minuten (auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)

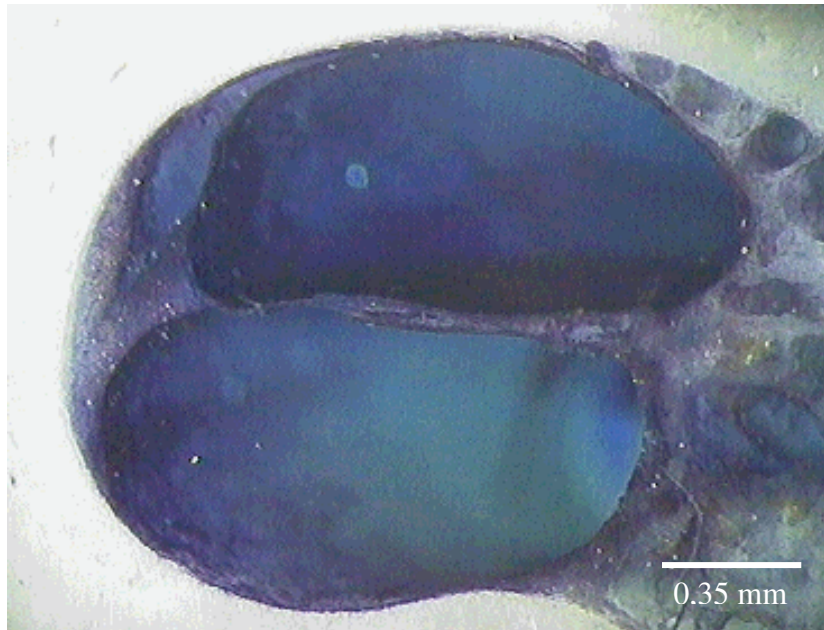


Abb. 26: modifizierte H.-E.-Färbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 3 Minuten (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Die zuvor gestellten Anforderungen an die optimale Anfärbbarkeit der Membranen (gute Kontrastierung von Membran und Knochen, mögliche Beurteilung der Membranintegrität) wurden durch die modifizierte H.-E.-Färbung mit nur einer 96%igen Ethanol-Spülung bei einer Einwirkdauer von 3 Minuten gewährleistet.

Im Gegensatz zu eingebetteten Felsenbeinpräparaten waren die Ergebnisse mit der Standard-H.-E.-Färbung nicht befriedigend. Erst die Modifizierung der H.-E.-Färbung gewährleistete bei den verwendeten gefrorenen und nativen Felsenbeinpräparaten eine gute Anfärbung der Membranen.

4.3.2 Toluidinblaufärbung

Auflichtmikroskopische Darstellungen des mit Toluidinblau gefärbten Felsenbeinpräparates A nach Inkubationszeiten von 2 Minuten bzw. 3 Minuten sind in Abb. 27 und 28 dargestellt.

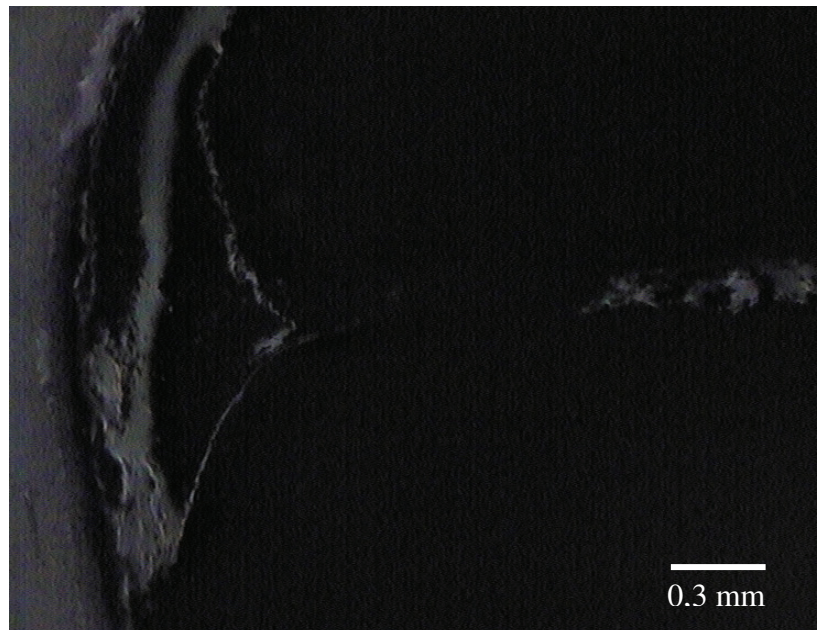


Abb. 27: Toluidinblaufärbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 2 Minuten
(auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)

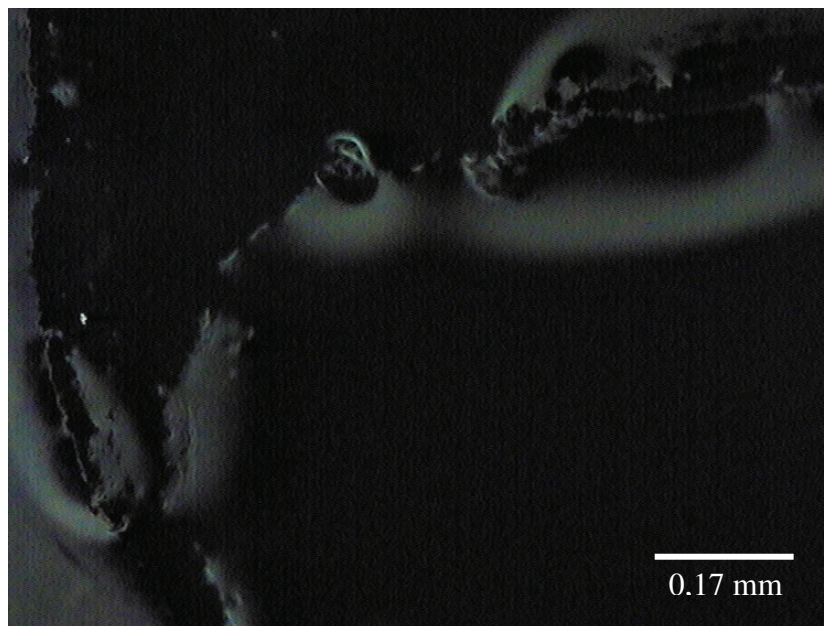


Abb. 28: Toluidinblaufärbung, Felsenbeinpräparat A, Inkubationszeit: 3 Minuten
(auflichtmikroskopische Aufnahme, Dunkelfeld)

4 Ergebnisse

Färbungen des Kryofelsenbeinschliffpräparates A mit Toluidinblau ermöglichten eine Abgrenzung der Membranen zum Knochen. Die Anfärbbarkeit der Membranen war unzureichend und eine vollständige Beurteilung der gesamten Membran wurde nicht gewährleistet. Aufgrund der nicht befriedigenden morphologischen Beurteilbarkeit der Membranintegrität stellt die Toluidinblaufärbung keine geeignete Färbemethode für Kryofelsenbeinpräparate dar.

4.3.3 Immunhistologische Färbung von „Tissue Prints“

In Abb. 29 bzw. 30 sind das native humane Kryofelsenbeinschliffpräparat E sowie der damit angefertigte Gewebeabdruck A (Anpresszeit: 5 Sekunden, Anpressdruck: 1,73 N/mm²) dargestellt.

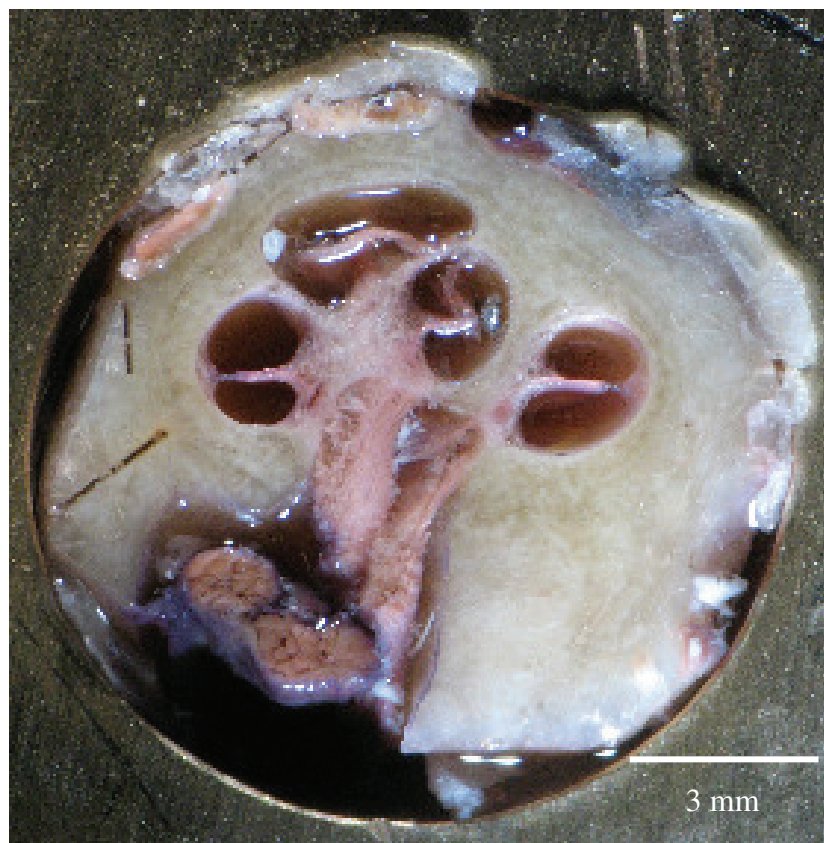


Abb. 29: humanes Felsenbeinschliffpräparat E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)

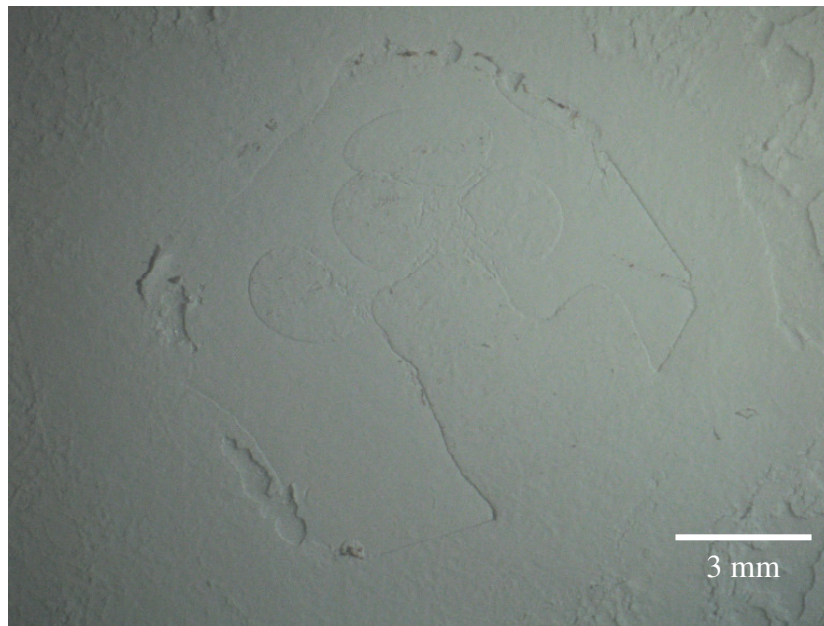


Abb. 30: Gewebeabdruck A des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Der native Gewebeabdruck A gewährleistete eine gute 3-D-Darstellung des humanen Felsenbeinpräparates E. Die Nitrozellulosemembran wies minimale Schäden am äußeren Rand des Abdrucks auf. Die projektionsmikroskopische Aufnahme des „Tissue Prints“ A zeigt am oberen Bildrand und in der Bildmitte makroskopische Partikel, die während des Drucks von dem Präparat auf die Membran übergegangen sind und entsprechend dem anatomischen Bereich der cochleären Membranen des Felsenbeinpräparates E lokalisiert sind.

Da nach einer 2 stündigen Inkubation des „Tissue Prints“ A in NBT/BCIP-Lösung weder makro- noch mikroskopisch eine Anfärbbarkeit gewebespezifischer Substanzen (hier: Connexin-26) nachweisbar war, erfolgte eine zusätzliche Farbstoffexposition (NBT/BCIP-Lösung) für 12 Stunden (Abb. 31).

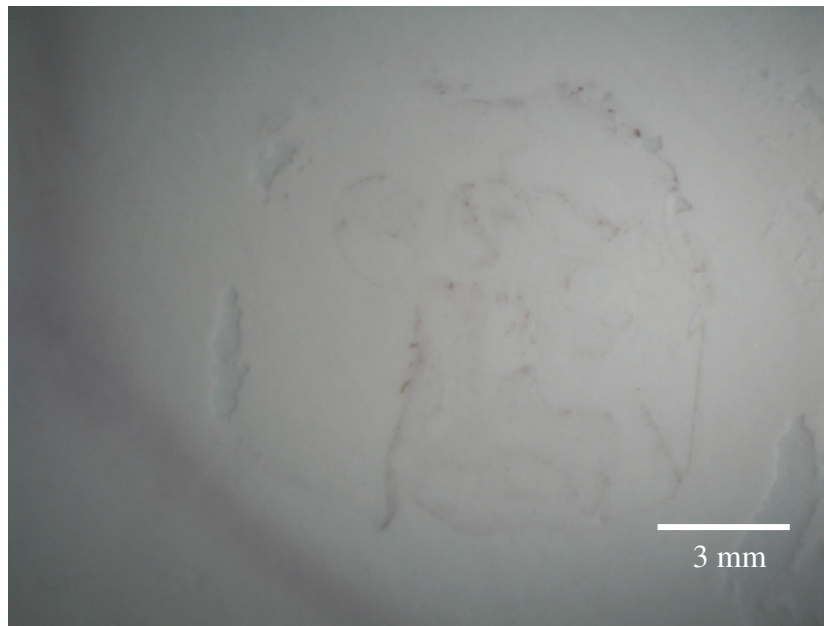


Abb. 31: Gewebeabdruck A des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Die zusätzliche Inkubation in NBT/BCIP-Lösung erbrachte lediglich eine minimale Anfärbbarkeit des Printrägers. Eine detaillierte Beurteilung der Membranintegrität konnte daher nicht gewährleistet werden.

In Abb. 32 - 35 b sind projektionsmikroskopische Aufnahmen der Gewebeabdrücke B - E dargestellt. Die Abdrücke C und E sind zusätzlich immunhistochemisch gefärbt abgebildet.

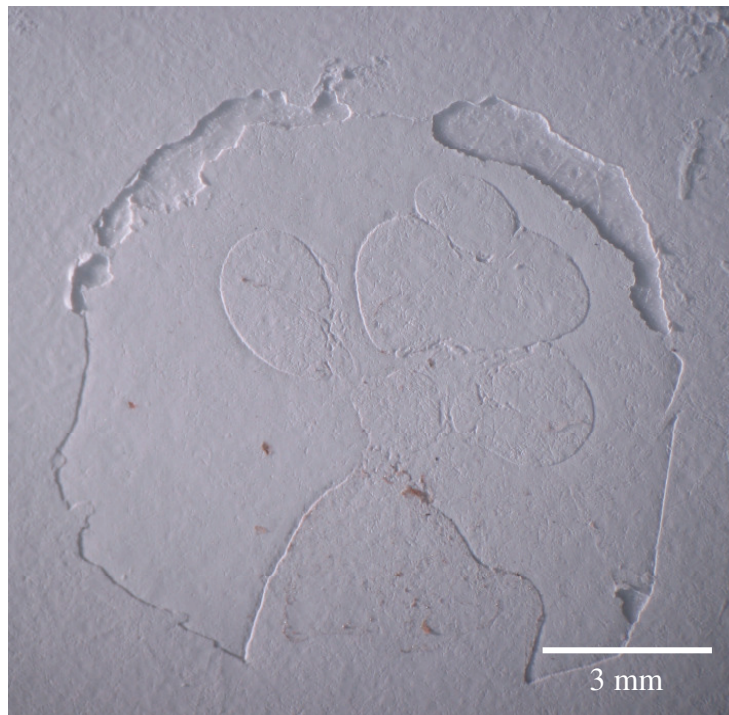


Abb. 32: Gewebeabdruck B des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ
(projektionsmikroskopische Aufnahme)

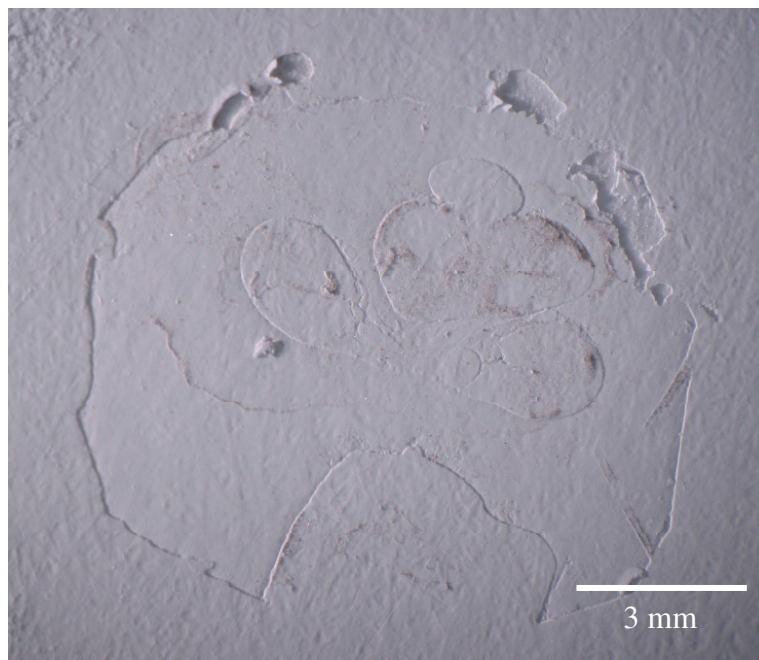


Abb. 33 a: Gewebeabdruck C des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ
(projektionsmikroskopische Aufnahme)



Abb. 33 b: Gewebeabdruck C des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)

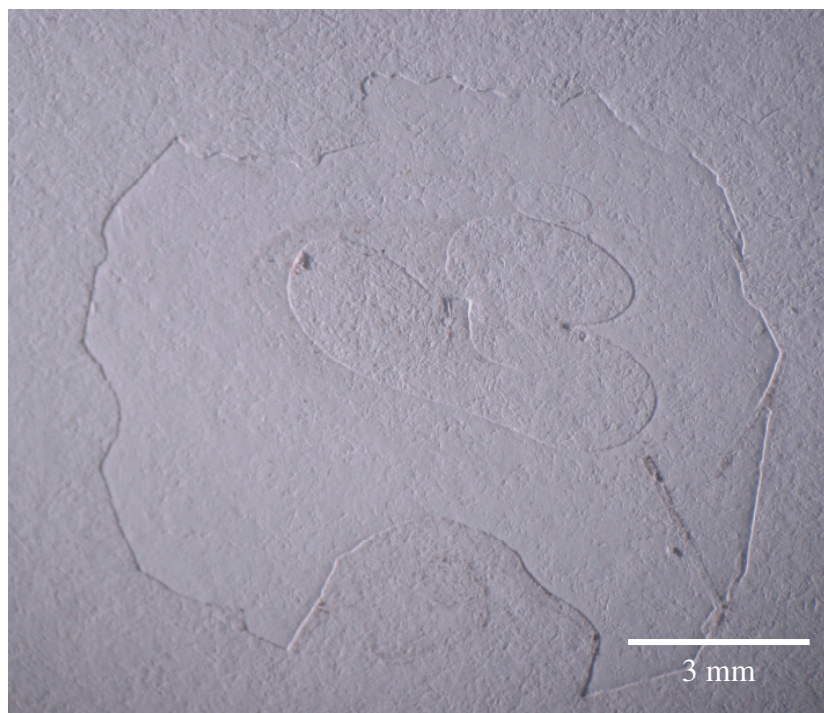


Abb. 34: Gewebeabdruck D des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)

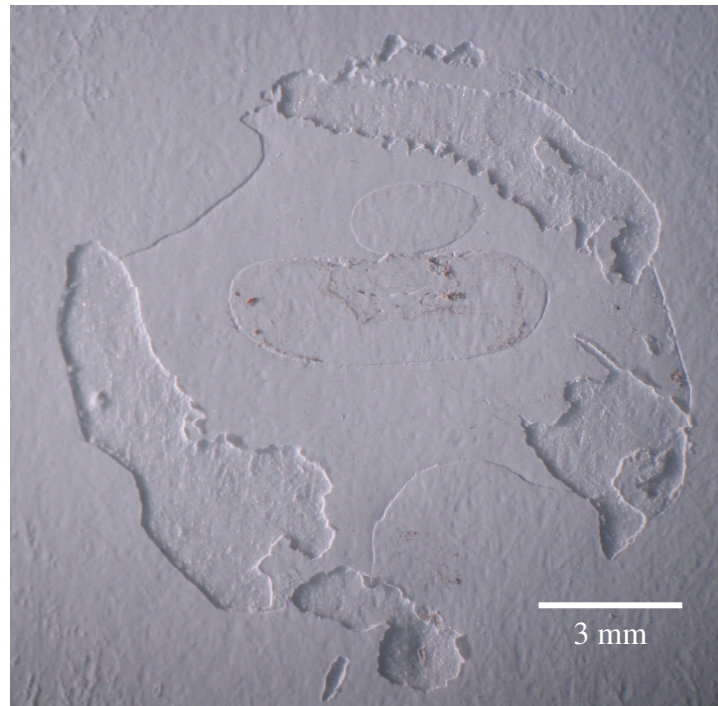


Abb. 35 a: Gewebeabdruck E des humanen Felsenbeinpräparates E, nativ (projektionsmikroskopische Aufnahme)

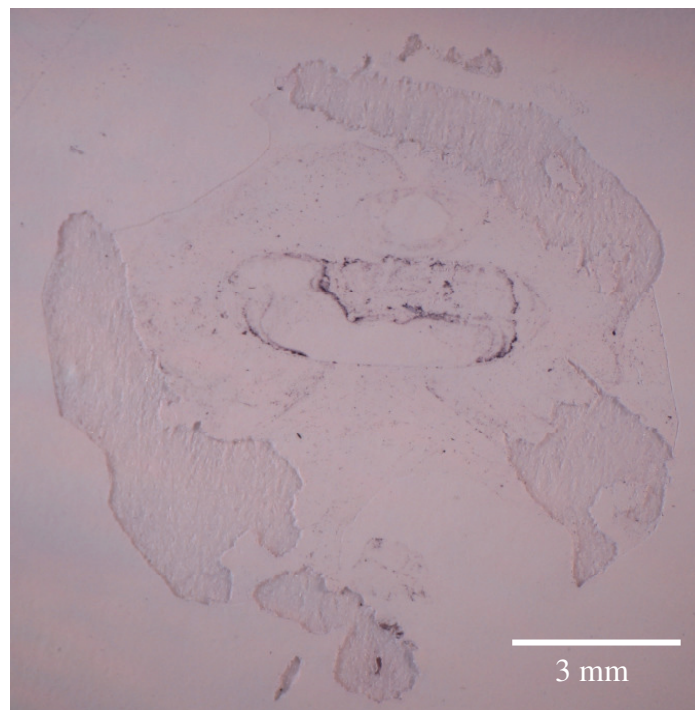


Abb. 35 b: Gewebeabdruck E des humanen Felsenbeinpräparates E, immunhistologisch gefärbt (projektionsmikroskopische Aufnahme)

4 Ergebnisse

Die Gewebeabdrücke B - E ermöglichten eine gute 3-D-Darstellung des humanen Felsenbeinpräparates E. Die Abdrücke B und C wiesen im oberen Randbereich geringe, der Gewebeabdruck D keine und „Tissue Print“ E starke Schäden der Nitrozellulosemembran auf. Eine immunhistologische Anfärbbarkeit der Prints B und D wurde nicht erreicht. Die Färbung der Gewebeabdrücke C und E erzielte eine gute, jedoch unvollständige Färbung membranöser Strukturen und Bestandteile (Connexin-26).

Die Machbarkeit des „Tissue Prints“ von Kryofelsenbeinpräparaten wurde damit nachgewiesen. Eine differenzierte Beurteilung der Membranintegrität wird aufgrund der unzureichenden Anfärbbarkeit des Connexin-26 z. Z. nicht gewährleistet.

4. 4 Dokumentation

4. 4. 1 Makroaufnahmen

Makroaufnahmen erwiesen sich als besonders geeignet zur Dokumentation von Übersichtsaufnahmen. Die erreichte Bildqualität war sehr gut und gewährleistete eine Lokalisierung der anatomischen Strukturen, makroskopische Untersuchungen der Membranen und der knöchernen Strukturen der Kryofelsenbeinpräparate sowie die Beurteilung der Membranintegrität mit eventuell vorhandenen groben Strukturveränderungen. Eine Minimierung der Abschattungen wurde durch eine Optimierung der Objektausleuchtung ermöglicht.

4. 4. 2 Auflichtmikroskopie

Aufgrund einer unzureichenden Objektausleuchtung und einer Limitierung durch technische Voraussetzungen erwiesen sich Untersuchungen im Auflicht-Hellfeld als nicht machbar. Die Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie ermöglichte eine Abgrenzung membranöser von knöchernen Präparatstrukturen. Die Membranintegrität konnte beurteilt werden. Die Bildqualität war wegen der ungenügenden Objektausleuchtung jedoch nicht ausreichend.

4.4.3 Projektionsmikroskopie

Abbildung 36 zeigt eine projektionsmikroskopische Aufnahme des humanen Felsenbeinpräparates B ohne eine Deckglasabdeckung und ohne erfolgte Ethanolspülung.

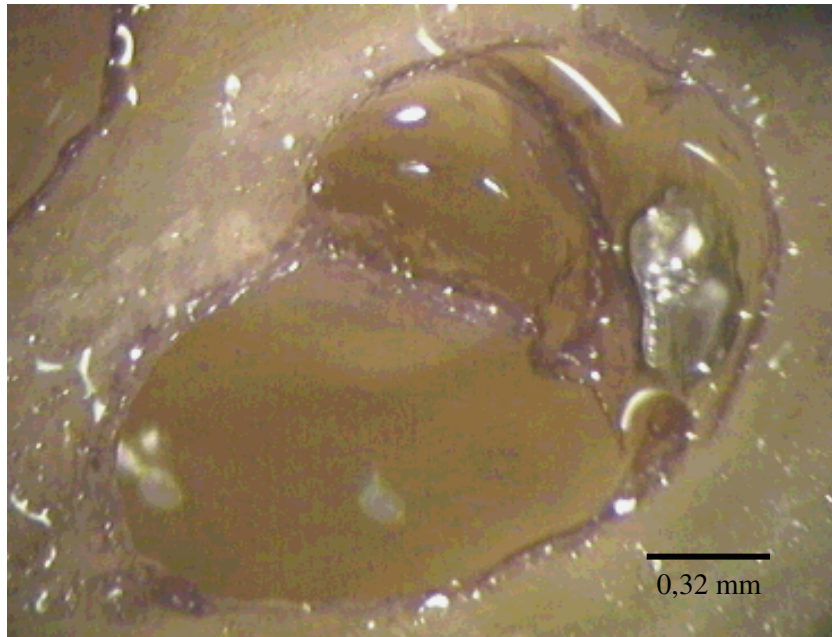


Abb. 36: humanes Felsenbeinpräparat B ohne Deckglas und Ethanolspülung, Schleifebene 1 – 250 μm (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Abbildung 37 zeigt eine projektionsmikroskopische Aufnahme des humanen Felsenbeinpräparates B mit einer Deckglasabdeckung nach erfolgter 96%iger Ethanolspülung.

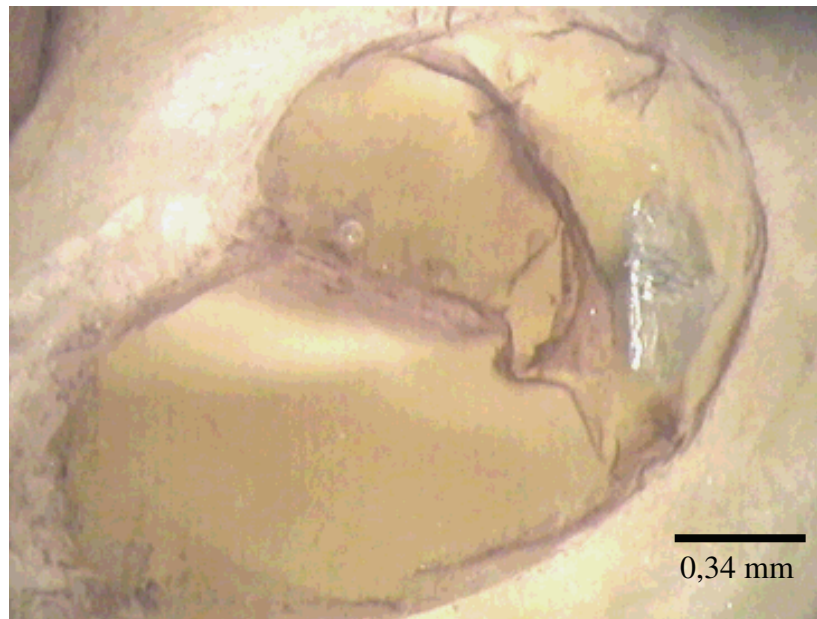


Abb. 37: humanes Felsenbeinpräparat B mit Deckglas und 96%iger Ethanolspülung, Schliffebene 1 – 250 μm (projektionsmikroskopische Aufnahme)

Die projektionsmikroskopischen Aufnahmen des Felsenbeinpräparates B ohne Deckglas sowie mit Deckglas und 96%iger Ethanolspülung ermöglichen eine Beurteilung der cochleären Strukturen. Projektionsmikroskopische Untersuchungen vom Präparat B ohne Deckglas gewährleisteten eine gute räumliche Darstellung des Präparates. Infolge von Lichtreflexionen war die Bildqualität unzureichend. Bei Verwendung des Deckglases wurden eine gute Darstellung der oberflächennahen Membranen und deren Integrität bei minimaler Unschärfe erreicht.

Die projektionsmikroskopischen Aufnahmen der Kryofelsenbeinpräparate A und E haben sich als sehr geeignet für Übersichtsdarstellungen, zur Beurteilung der Membranintegrität, zur Differenzierung der Lamina basilaris, des Ligamentum spirale, der Lamina spiralis ossea sowie der endostealen Region und der Elektrodenlokalisation erwiesen.

4.4.4 Kontaktendoskopie

In Abb. 38 ist eine kontaktendoskopische Aufnahme des ovinen Felsenbeinpräparates D dargestellt.

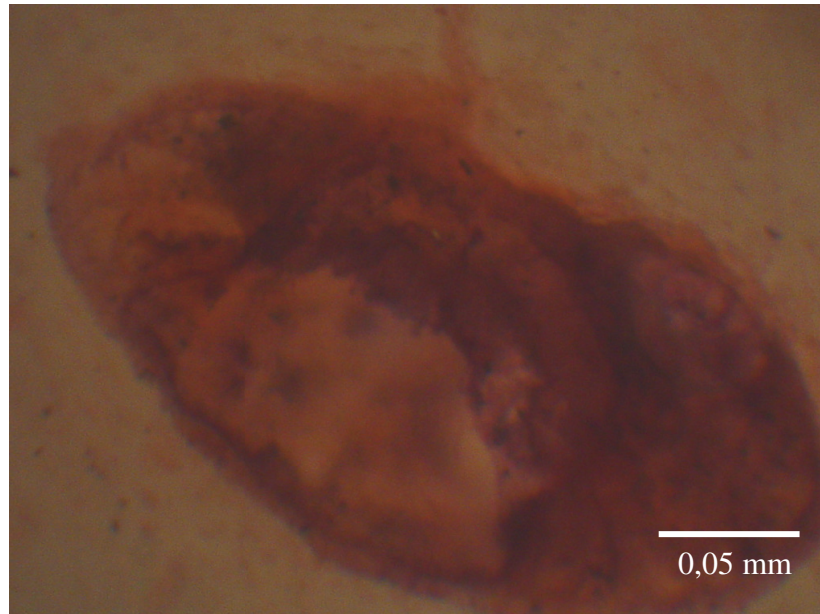


Abb. 38: ovines Felsenbeinpräparat D, Ebene 1 – 400 µm (kontaktendoskopische Aufnahme)

Die Kontaktendoskopie erwies sich an den untersuchten Materialien (Knochen bzw. dem Knochen angelagerte Weichteilstrukturen) als unzureichend lichtstark. Eine Differenzierung der Präparatstrukturen war daher nicht möglich. Auf weitere endoskopische Untersuchungen wurde im Verlauf der Arbeit verzichtet.

4.4.5 Rasterelektronenmikroskopie

In Abb. 39 - 41 sind aus einer Vielzahl von Bildern eine Auswahl rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Kryofelsenbeinpräparate B und C dargestellt.

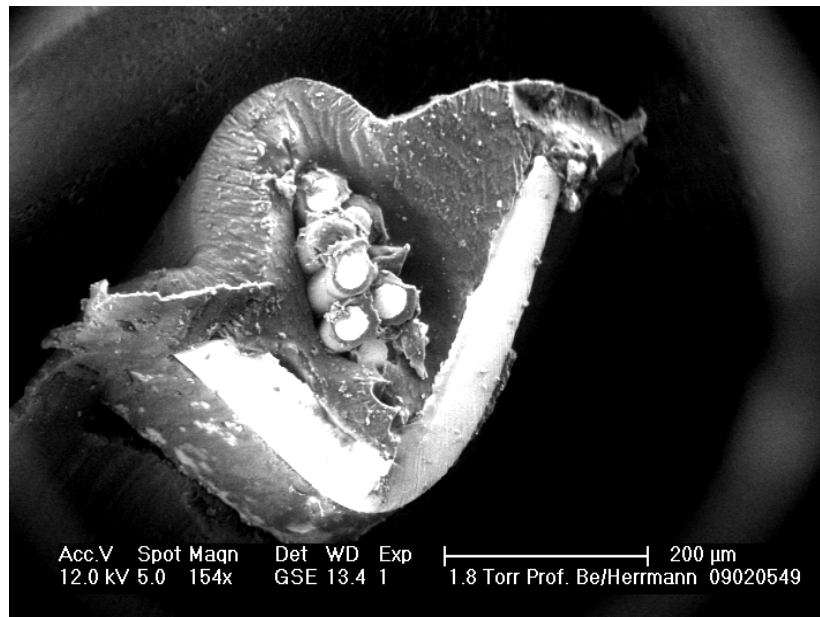


Abb. 39: humanes Felsenbeinpräparat B mit implantierter CI-Elektrode
(REM-Aufnahme im ESEM-Modus)

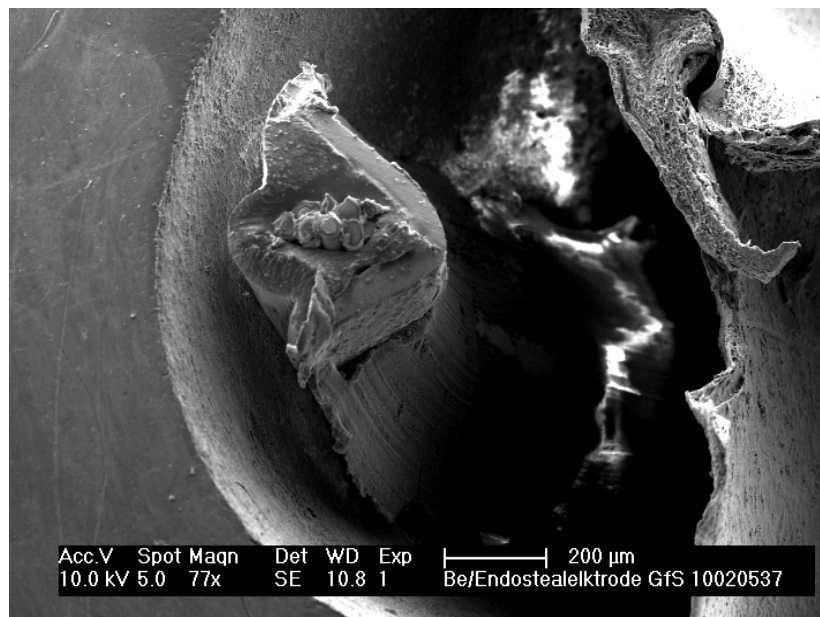


Abb. 40: humanes Felsenbeinpräparat B mit implantierter CI-Elektrode
(Standard-REM-Aufnahme)

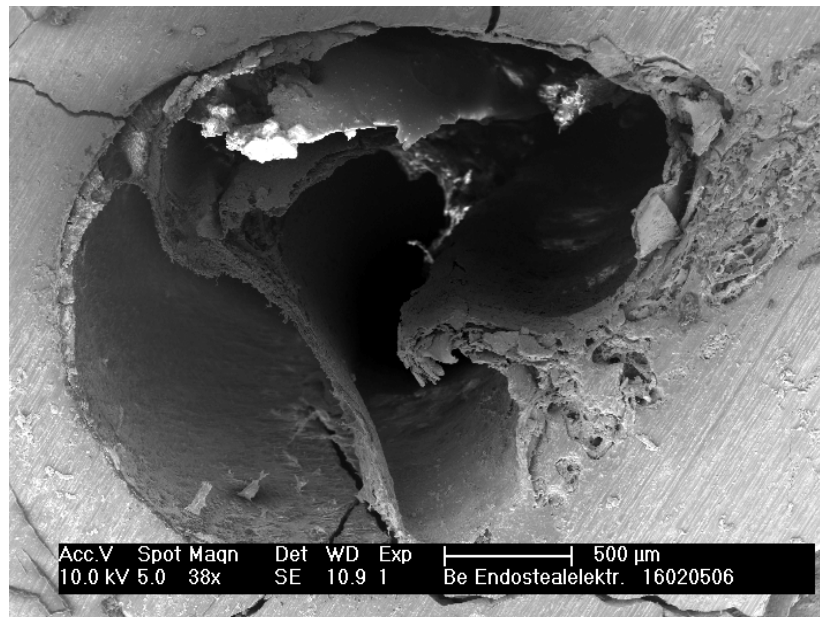


Abb. 41: humanes Felsenbeinpräparat C nach Elektrodenentfernung
(Standard-REM-Aufnahme)

Die Rasterelektronenmikroskopie der humanen Felsenbeinpräparate B und C ermöglichte eine sehr detaillierte Darstellung der knöchernen und membranösen Strukturen. Sowohl im Standard-REM als auch im ESEM-Modus wurden eine sehr gute Differenzierung und Beurteilung der membranösen Strukturen, der Oberflächenbeschaffenheit der Elektrode und der Elektrodenlokalisation realisiert. Eine Differenzierung zwischen insertionsbedingten Traumen und Trocknungsartefakten infolge der Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop (aufgrund der gerätespezifischen Druckverhältnisse) kann nicht sicher gewährleistet werden. Eine erneute Untersuchung derselben Probe mittels Rasterelektronenmikroskopie im Standard-REM-Modus war aufgrund der verfahrensspezifischen Strukturveränderung nicht möglich.

5 Diskussion

An eine ideale Cochlear-Implantation wird der Anspruch einer möglichst geringen Traumatisierung des Innenohres gestellt. Zur Minimierung der insertionsbedingten Schädigung der cochleären Strukturen werden kontinuierlich neue Elektroden-Prototypen entwickelt [2], die vor ihrem klinischen Einsatz v. a. am Felsenbeinpräparat getestet werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neu entwickelte Kryopräparationsmethode, speziell für Untersuchungen nativer humaner Felsenbeinpräparate, auf ihre Eignung zur histologischen Beurteilung der Integrität der Cochlea, insbesondere ihrer membranösen Strukturen, untersucht. Ein direkter Vergleich der ermittelten Daten mit Ergebnissen anderer Autoren wird durch z. T. gänzlich abweichende Verfahrensschritte der neu entwickelten Methode von bereits validierten Verfahren erschwert bzw. ist nicht möglich.

Unmittelbarer Anlass zur Entwicklung dieser Methode war eine sehr konkrete Fragestellung:

Als alternatives Elektrodenkonzept wurde eine sog. endosteale Elektrode entwickelt, die u. a. durch eine Lokalisation zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth ein eventuell vorhandenes Restgehör durch schonende Insertion erhalten soll. Ihre Machbarkeit, d. h. Insertion, Lokalisation und Handhabbarkeit, wurde im Vorfeld bereits an post-mortem-Felsenbeinpräparaten untersucht, welche mittels konventioneller Einbettverfahren behandelt wurden. Aussagen zur Eignung und zu insertionsbedingten Traumen wurden jedoch histologisch oft durch Trocknungsartefakte erschwert und bedurften daher einer neuen Präparationsmethode.

Die in dieser Arbeit entwickelte histologische Kryoschliffpräparationsmethode ermöglichte eine gute Beurteilung der membranösen cochleären Membranintegrität von nativen Kryopräparaten. Eine zuverlässige detaillierte Darstellung und Untersuchung der Lamina basilaris, des Ligamentum spirale, der Lamina spiralis ossea sowie der endostealen Region war möglich. Dislozierte Elektroden könnten somit exakt lokalisiert werden.

Zur Evaluation der implantationsbedingten membranösen Traumen existieren bereits zahlreiche Studien, in denen meist histologische Untersuchungen an eingebetteten Präparaten durchgeführt werden. In der Publikation von *Adunka et al.* [2] wurde zur histologischen Aufarbeitung die Hartschlifftechnik [107, 117] nach Polymethylmethacrylateinbettung verwendet. Diese Präparationsmethode erwies sich bei der Beurteilung geschädigter intracochleärer Strukturen als sehr effektiv und gewährleistete eine detaillierte Darstellung des Corti-Organ, der Stria vascularis, des Ligamentum spirale sowie der Lamina spiralis ossea. Damit konnte der Mechanismus des basalen

Traumas nach Insertion eines neuen Elektroden-Prototypens speziell für elektro-akustische Stimulationen genauer beurteilt werden. Auch in weiteren Publikationen werden Präparationstechniken beschrieben, die dem Hartschliff ähnliche Methoden zur histologischen Darstellung und Evaluation insertionsbedingter Traumen verwenden [45, 112, 127]. *Eshraghi et al.* [43] verwendeten zur Untersuchung intracochleärer Traumen eine Kryosektions- sowie eine Videofluoroskopietechnik. Frakturen und grobe Dislokationen cochleärer Membranen wurden dargestellt. Membrandetails konnten nicht beurteilt werden. In weiteren Studien werden die jeweiligen Präparate in Paraffin eingebettet [44, 68, 96, 123, 134]. Vor der Evaluation des cochleären Traumas wurden die Paraffinpräparate entkalkt und ein Entfernen der Elektrode war notwendig. Eine Beurteilung nativer Strukturen wurde dadurch nicht gewährleistet. *Klenzner et al.* [72] implantierten bei Raumtemperatur perimodiolare „Contour Advance Elektroden“ in native humane Kryofelsenbeinpräparate. Zur histomorphologischen Beurteilung der Präparate erfolgte anschließend eine Einbettung in ein Harz auf Methacrylat-Basis. Dabei wurde eine ausgeprägte insertionsbedingte Schädigung der Lamina spiralis ossea nach Insertion mittels „freehand“ Advance-off-stylett (AOS)-Technik, d. h. partielle Insertion bis 8,5 mm, dann Insertionsfortsetzung bis zum Markerring, beobachtet. Zur Minimierung der insertionsbedingten Traumen wurden von *Klenzner et al.* [72] Verbesserungen der Elektrodenbeschaffenheit und eine Insertion mittels Einführhilfe empfohlen. *Adunka et al.* [2] wiesen eine Ruptur der Basilarmembran an der Elektrodenspitze nach Insertion eines Elektroden-Prototypens, der speziell für elektro-akustische Stimulation entwickelt wurde, bei einem von fünf Felsenbeinpräparaten nach. In der basalen Schneckenwindung wurden massive Traumen intracochleärer Strukturen beobachtet. Nach *Adunka et al.* dienen zur Vermeidung von intracochleären Schäden eine atraumatische Chirurgie sowie schonende Elektrodeninsertionen unter Beachtung des „Punktes des ersten Widerstandes“. *Burton et al.* [21] analysierten die „Nucleus 22 Elektrode“ nach 3-jähriger Implantationszeit an Primaten und wiesen einen Verlust von Haarzellen im Bereich der Elektrodeninsertion nach. *Leake et al.* [79] beschrieben eine weitgehend erhaltene apikale Haarzellpopulation (hier keine Elektrodenlokalisation) bei gleichzeitigem basalen Haarzellverlust nach Elektrodeninsertion. In einer Studie von *Wardrop et al.* [129] erfolgte ein histopathologischer Vergleich intracochleärer Strukturen nach Insertion einer „Nucleus Banded Elektrode“ und der „Nucleus Contour Elektrode“ in Akrylharz eingebettete Felsenbeinpräparate. Die insertionsbedingten cochleären Schäden der „Nucleus Banded Elektrode“ glichen denen der „Nucleus Contour Elektrode“. Häufigstes Trauma bei beiden Elektrodentypen war die interscaläre Auslenkung. Infolge von Elektrodendeviationen erfolgte u. a. eine Penetration der Basalmembran und der Lamina spiralis ossea („Nucleus Contour Elektrode“ bei Insertionstiefen von 140° - 180°) mit anschließender Fehlinsertion. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten diese insertionsbedingten intracochleären Traumen [68, 97, 123, 134].

Bei sachgemäßer Insertion könnten bei endostealen Elektroden aufgrund ihrer Lokalisation o. a. Traumen vermieden werden. Endosteale Elektroden zeichnen sich u. a. durch einen flachen Elektrodenträger aus [68, 103] und die bisher gezeigten Insertionsresultate im humanen Felsenbeinpräparat mit Elektroden-Prototypen [103] sowie mit kompletten Elektroden (in der vorliegenden Arbeit) weisen die prinzipielle Machbarkeit der endostealen Elektrodeninsertion nach.

In Felsenbeinen gehen *Adunka* et al. von einem erhöhten Reibungswiderstand der Elektrode post-mortem aus [2], der eine insertionsbedingte cochleäre Schädigung verursachen kann. Auch *Roland* beschrieb eine erschwerte Insertion an post-mortem-Felsenbeinpräparaten, für die Trocknungsverfahren und möglicherweise Veränderungen der Weichteilgewebe ursächlich seien [114]. In einer Studie wies die Firma *Cochlear* [31] bei einigen elektrodeninsetierten Felsenbeinpräparaten cochleäre Traumen nach, die als primär nicht insertionsbedingt, sondern als mögliches Risiko der Einbettmethode, beurteilt wurden. So konnten Schädigungen, die weitab lokalisiert waren, nicht der Elektrodeninsertion angelastet werden: apikale Membranpenetration im Abstand von mehr als einer Schneckenwindung zur Elektrode, Traumen der Scala vestibuli bei intakter Basilarmembran, Schäden der Basilarmembran ohne direkten lokalen Elektrodenkontakt. Nachfolgende Modifizierungen der Einbetttechnik zeigten eine deutliche Verminderung cochleärer Schädigungen bei Präparaten ohne Elektrodeninsertion. Zur Minimierung hydrodynamischer Artefakte als Ursache membranöser Traumen erfolgte nun eine Einbettung in ein Harz mit geringerer Viskosität im Vakuum mit nachfolgender schonender Anpassung an den atmosphärischen Druck. In einer anschließenden Modifizierung wurde vor der Epoxydharzeinbettung eine zusätzliche Acetoninfiltration des Präparates nach vorheriger Dehydratation in aufsteigender Ethanolreihe durchgeführt, um die Trübung des Epoxydharzblocks zu minimieren. Diese Studie belegt die Bedeutsamkeit histologischer Beurteilungen nativer, nicht eingebetteter, Präparate, um eine sichere Unterscheidung insertionsbedingter von einbettbedingten Membrantraumen zu gewährleisten.

In der o. a. Studie der Firma *Cochlear* wurde eine einfache Schleifvorrichtung speziell für eingebettete Felsenbeinpräparate verwendet. Die Materialprobe wurde in einer Silikonform positioniert und anschließend in Epoxydharz eingebettet. Damit ermöglichte die Schleifvorrichtung die Fixierung des Felsenbeinpräparates. Zur besseren Handhabbarkeit war der Boden des Silikonblocks auf einer Grundplatte fixiert. Diese gefertigte Schleifvorrichtung diente einem beidseitigen Abschleiß des eingebetteten Felsenbeinpräparates bis zum Modiolus. Ein exakt definierter Abschleiß des Präparates konnte lediglich durch intermittierendes Ausmessen gewährleistet werden.

Zur histologischen Beurteilung sind nach Präparatfixierung und Schliff-/Schnittpräparation Färbungen spezieller Strukturen notwendig. Nach *Kaissling* [67] haben sich Färbungen mit Toluidinblau sowie Azur II und Methylenblau (90 °C – 100 °C) nach der Methode von *Richardson* [110] als Routinefärbung für in Epoxidharz eingebettete Semidünnschnittpräparate bewährt. Eine Intensivierung der Anfärbbarkeit ist durch eine Voroxydation oder vorheriges Beizen (z. B. Perjod-, Peressig- oder Perameisensäure) möglich. Bei Färbungen mit Hämatoxylinen wurde ein ausreichendes Ergebnis lediglich mit verschiedenen Eisenhämatoxylinen gewährleistet [91, 118]. *Watts et al.* [132] erreichten eine Anfärbbarkeit epoxydharzeingebetteter Knochenpräparate mit einer H.-E.-Lösung, wiesen jedoch eine verminderte Beurteilung histologischer Details an mineralisierten im Vergleich zu demineralisierten Knochenpräparaten nach. In zahlreichen aktuellen Studien werden eingebettete Felsenbeinpräparate, oft auf Methacrylat- oder Epoxydharzbasis, ebenfalls mit o. g. Farblösungen gefärbt [104, 111, 112]. So verwendeten *Pau et al.* [104] für in Epoxydharz eingebettete Felsenbeinpräparate eine Toluidinblaufärbung, *Richter et al.* färbten humane Felsenbeinpräparate (Methacrylatbasis) mit Azur II und Pararosanilin [111]. Und in einer weiteren Studie wurden die decalcifizierten paraffineingebetteten Präparate von *Richter et al.* in einer H.-E.-Lösung inkubiert [112]. *Gstoettner et al.* verwenden in einigen Studien Giemsa- [49, 52] bzw. Paragonfärbungen [54] nach *Plenk* [107] für eingebettete Felsenbeinpräparate. Die histologische Präparation der paragongefärbten Felsenbeine gewährleistet eine gute Darstellung der Cochlea mit Reissner'scher Membran, Corti-Organ, Ligamentum spirale sowie der Lamina spiralis ossea und ermöglichte damit eine Beurteilung der Strukturintegrität. Für das von uns entwickelte neue Verfahren existieren in der Literatur bislang keine weiteren Erfahrungen zu Färbemethoden von Kryofelsenbeinpräparaten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine gute Anfärbbarkeit der cochleären Membranen mittels der modifizierten H.-E.-Färbung nachgewiesen werden. Eine detaillierte Darstellung der Cochlea mit Reissner'scher Membran, des Ligamentum spirale sowie der Lamina spiralis ossea war damit möglich. Eine Inkubation in Toluidinblau hat sich aufgrund unzureichender Membranfärbung als nicht geeignet erwiesen.

Histologische Untersuchungsmethoden unterliegen ständigen Weiterentwicklungen. Mangelnde Erfahrungen in Bezug auf histologische Präparationen von Kryofelsenbeinpräparaten machen neue oder modifizierte Methoden notwendig. Ergänzend zu den in Felsenbeinstudien häufig verwendeten histologischen Färbungen führten wir eine immunhistochemische Färbung von Gewebeabdrücken („Tissue Print“) der Kryofelsenbeinpräparate durch (Anfärbung von Connexin-26) und konnten die Eignung von 3-D-Abdrücken für Gefrierschliffpräparate nachweisen. *Kubisch et al.* [75] beschreiben eine Expression von Connexin-26 u. a. im Ligamentum spirale. Die Beurteilung der Integrität dieser Struktur ist bei endostealer Elektrodeninsertion wesentlich. Die Anfärbung von Connexin-26 war

unzureichend, konnte durch eine verlängerte Inkubation in NBT/BCIP-Lösung jedoch verbessert werden und bedarf weiterer Optimierungen. Andere Autoren beziehen sich auf direkte immunologische Färbungen. *Bernhards* et al. [17] konnten eine Verbesserung des Ergebnisses bei zahlreichen immunhistochemischen Färbungen durch Übernachtinkubationen des primären Antikörpers nachweisen. Auch *Georgii* et al. [48] empfehlen eine längere Inkubationsdauer (z. B. über Nacht) sowie eine höhere Antikörperkonzentration des primären Antikörpers oft mit zusätzlicher Mikrowellenbehandlung [131] bei auf Kunstharzbasis eingebetteten Dünnschnittpräparaten im Vergleich zu Paraffinschnitten. Die notwendige Voraussetzung für immunhistochemische Färbungen stellt ein ausreichender Antigengehalt dar, der im Vergleich zu eingebetteten Präparaten (z. B. Paraffineinbettung) bei Kryopräparaten besser gewährleistet wird. *Derx* et al. [40] weisen an über 15 Jahre eingebettetem Material einen Antigengehalt nach, ebenso *Ingram* et al. [63] an über 10 Jahre alten Blöcken. Zur Verbesserung der in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbung bieten sich u. a. folgende Veränderungen an: Konzentrationsanpassungen, Verlängerung der Inkubationszeiten, chemischer anstelle physikalischer Print, alternative Antikörper. Direkte Anfärbungen der Kryofelsenbeinpräparate mit immunhistologischen Antikörperfärbungen können aufgrund meist langer Inkubationszeiten bei 4 °C – 37 °C nicht durchgeführt werden.

Die Kryoschliffpräparation ist eine relativ einfache und z. T. ausbaufähige ex-vivo-Präparationsmethode zur Beurteilung der Membranintegrität. Eine Untersuchung des jeweiligen Präparates unmittelbar nach einer Elektrodeninsertion ist möglich und gewährleistet frühzeitige Modifikationen der Insertion. Im Vergleich zu standardisierten Einbettpräparationen stellt die Kryoschliffpräparation eine schnelle und einfache Methode für histologische Untersuchungen an nativen Präparaten dar und ist auch für andere native, insbesondere empfindliche, Gewebe anwendbar. Untersuchungen und histologische Färbungen können mit bewährten sowie mit modifizierten Verfahren erfolgen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels mikroskopischer und histologischer Untersuchungen die Eignung einer neu entwickelten Kryoschliffpräparation zur Beurteilung von nativen humanen und ovinen Felsenbeinen mit inserierten Elektroden ex-vivo nachgewiesen werden.

Aktueller Anlass für die Methodenentwicklung war die notwendige Überprüfung der Machbarkeit sog. endostealer CI-Elektroden (Positionierung zwischen dem knöchernen und häutigen Labyrinth). Endosteale Elektroden sollen eine implantationsbedingte Schädigung cochleärer Membranen und der Haarzellen mit nachfolgendem Resthörverlust verhindern. Vor in-vivo-Implantationen ist eine Beurteilung der Membranintegrität mit Elektrodenimplantation in ex-vivo-Versuchen notwendig. Bereits erfolgte ex-vivo-Insertionen von Elektrodenmodellen erwiesen die prinzipielle Machbarkeit von endostealen Elektrodeninsertionen. In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Insertionsversuche zur Beurteilung der membranösen Integrität mit realen Elektroden-Prototypen durchgeführt und eine neue, artefaktarme, Präparationsmethode für Felsenbeinpräparate entwickelt.

Um eine Beurteilung von weitgehend nativen Präparaten zu ermöglichen, wurde eine Kryoschliffpräparationsmethode entwickelt. Hierfür wurde eine Kryoschleifvorrichtung für Felsenbeinpräparate konstruiert und gefertigt. Im Verlauf der Arbeiten erfolgten Optimierungen der Kryoschleifvorrichtung, um Anforderungen wie eine Präparatfixierung bei kontinuierlicher Kühlung und einen exakt definierten Vorschub mittels Mikrometerschraube zu gewährleisten. Für die Studie wurden ein ovines formaldehydfixiertes, ein humanes nicht fixiertes und drei humane formaldehydfixierte Felsenbeinpräparate verwendet, die getrimmt und in die Kryoschleifvorrichtung eingepasst wurden. Eine zusätzliche mechanische Fixierung erfolgte u. a. durch Einbettungen in H₂O-Eis und Modellierwachs. Die kontinuierliche Kühlung wurde mittels CO₂ solid und Zwischenkühlungen bei -80 °C bzw. -20 °C gewährleistet. Die Schliffpräparation wurde bevorzugt in Mindestabständen von 50 µm mittels SiC-Papier (1 000er Körnung) durchgeführt. In jeweils zwei Versuchsreihen wurden zur Optimierung der Schleifzeit und damit Minimierung von Präparationsschäden sowohl das Temperatur-Zeit-Verhalten als auch das Erreichen einer hinreichenden Planarität ermittelt. Färbungen mit Hämalaun-Eosin und Toluidinblau für 2 und 3 Minuten sowie immunhistochemische Färbungen gefertigter Felsenbein-Gewebsabdrücke („Tissue Print“) bei einem Anpressdruck von 1,73 N/mm² und einer in Versuchsreihen ermittelten maximalen Anpressdauer von 5 Sekunden dienten dem histologischen Nachweis der Membranintegrität nach Elektrodeninsertion. Die Dokumentation erfolgte mittels Makroaufnahmen (Übersichtsdarstellung), Auflichtmikroskopie mit Auflicht-

6 Zusammenfassung

Hellfeld-/Dunkelfeldbeleuchtung (Übersicht, Kontrolle der erreichten Oberflächenqualität, mikroskopische Untersuchungen), Projektionsmikroskopie (Übersichtsdarstellung), Kontaktendoskopie (mikroskopische Beurteilung der Epithelien) und Rasterelektronenmikroskopie u. a. im HiVac-ESEM-Modus (Analyse der Oberflächentopographie, Lagebeschreibung und Oberflächenbeschaffenheit der Elektrode).

Sowohl die erzielte Planarität bei Minimierung der Schleifdauer als auch das Temperatur-Zeit-Verhalten wiesen die prinzipielle Eignung der Kryoschliffpräparation in einem ermittelten und definierten Arbeits-Zeit-Fenster nach. Die Kryoschliffpräparation gewährleistete als schonendes Verfahren zum Materialabtrag gut beurteilbare Schliffebenen. Zur histologischen Beurteilung der membranösen Integrität erwiesen sich die Hämalaun-Eosin-Färbung bei einer Inkubationsdauer von 3 Minuten und ergänzend dazu die immunhistochemische Färbung von „Tissue Prints“ für eine differenzierte Gewebedarstellung als geeignet. Untersuchungen im Auflichtmikroskop gewährleisteten eine bessere strukturelle Beurteilung bei Dunkelfeldbeleuchtung im Vergleich zu Hellfeldbeleuchtung. Eine strukturelle Beurteilung der Epithelien mit dem Kontaktendoskop war aufgrund der unzureichenden Objekt-Ausleuchtung nicht möglich. Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von nativen elektrodeninsetierten Präparaten ist weder der Standard-REM-Modus noch der ESEM-Modus geeignet, da eine Differenzierung insertionsbedingter Artefakte von Schäden durch die Untersuchungsmethode nicht sicher gewährleistet werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Schleifvorrichtung erfüllt die an sie gestellten Ansprüche und wurde in ex-vivo-Studien erfolgreich validiert. Im Vergleich zu der Schleifvorrichtung in der Studie der Firma *Cochlear* [31] wird ein Abschleiß in exakten μm -Abständen realisiert. Weitere Vergleiche beider Schliffmethoden sind aufgrund abweichender Verfahren nicht möglich. Zur weiteren Optimierung der Handhabbarkeit und der Schliffqualität der von uns gefertigten Kryoschliffvorrichtung sind folgende Weiterentwicklungen erforderlich: 1. feinere Abstufungen der Mikrometerskalierung, 2. Fixierung des PTFE-Schutzbechers zur sicheren Handhabbarkeit während des Schleifens, 3. manuelles Nachführen des Präparates ohne vorheriges Entfernen des PTFE-Schutzbechers, 4. vergrößertes Füllungsvolumen des Messingbechers für kontinuierliches Arbeiten sowie 5. eine verbesserte Temperaturisolation für eine bessere Handhabbarkeit und Erweiterung des Arbeitsfensters. Eine verbesserte Schleifvorrichtung ist schematisch in Abb. 42 und 43 dargestellt:

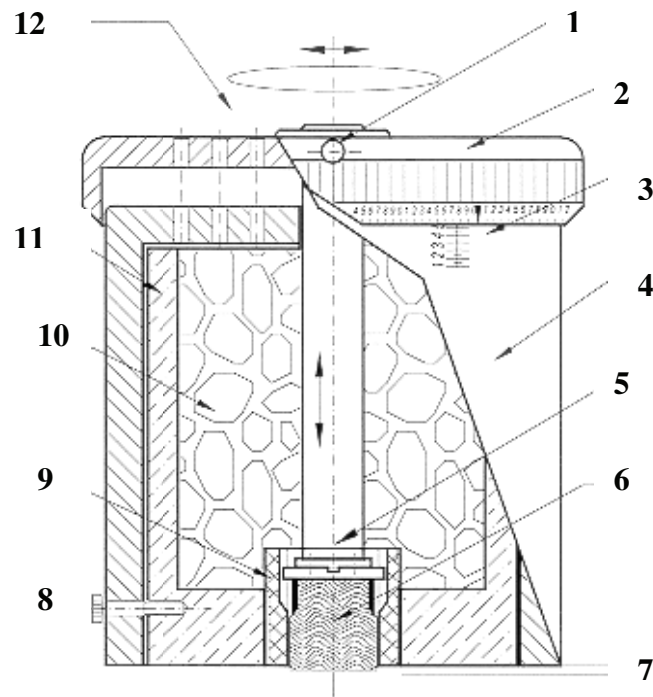


Abb. 42: schematische Darstellung einer optimierten Schleifvorrichtung, (1) konischer Fixierungsstift, (2) Stellkappe, Messing, (3) Feineinstellung, (4) PTFE-Schutzbecher, (5) Feingewindekolben mit Spindel aus POM, (6) Knochenzylinder, (7) Schleifspalt, (8) Feststellschraube 3 x 120°, (9) Wechselfixierungshülse, (10) Innenwanne, Trockeneis, (11) Aufnahmebecher, (12) Entlüftungsöffnungen

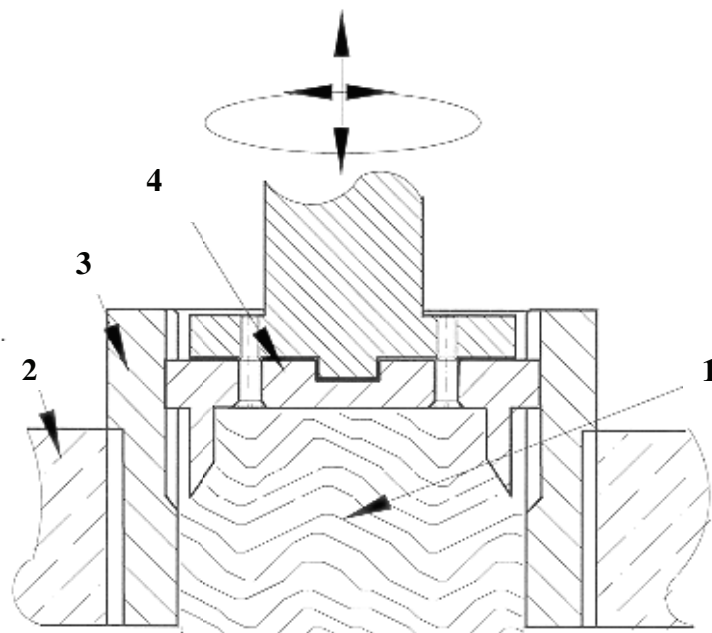


Abb. 43: schematische Darstellung einer optimierten Schleifvorrichtung, Querschnitt, (1) Knochenprobe, (2) Aufnahmebecher, (3) Wechselhülse, (4) Kolben mit Feingewinde

7 Literaturverzeichnis

- [1] Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Lehnert T, Gstoettner W (2004): *Development and evaluation of an improved cochlear implant electrode design for electric acoustic stimulation*. Laryngoscope 114 (7): 1237 - 1241
- [2] Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Radeloff A, Lehnert T, Gstoettner W (2004): *Evaluation eines Elektrodendesigns für die kombinierte elektrisch-akustische Stimulation*. Laryngorhinootologie 83 (10): 653 - 658
- [3] Adunka O, Unkelbach MH, Mack M, Hambek M, Gstoettner W, Kiefer J (2004): *Cochlear implantation via the round window membrane minimizes trauma to cochlear structures: a histologically controlled insertion study*. Acta Otolaryngol 124 (7): 807 - 812
- [4] Advanced Bionics (2004): *Hi Res 90K surgeon's manual for the HiFocus Helix and HiFocus Ij Electrodes*. Hannover
- [5] Advanced Bionics (2005): *Datenblatt HiResolution Bionic Ear System*. Hannover
- [6] Andrea M, Dias O, Macor C, Santos A, Varandas J (1997): *Contact endoscopy of the nasal mucosa*. Acta Otolaryngol (Stockh): 117 (2): 307 - 311
- [7] Andrea M, Dias O, Santos A (1995): *Contact endoscopy of the vocal cord: normal and pathological patterns*. Acta Otolaryngol (Stockh): 115 (2): 314 - 316
- [8] Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M, Glanz H (1999): *Endoskopische bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Kehlkopfkarzinoms und seiner Vorstufen*. Laryngorhinootologie 78 (12): 685 - 691
- [9] Aschendorff A, Klenzner T, Richter B, Kubalek R, Nagursky H, Laszig R (2003): *Evaluation of the HiFocus electrode array with positioner in human temporal bones*. J Laryngol Otol 117: 527 - 531
- [10] Bagger-Sjoberg D (1991): *Sodium hyaluronate application to the open inner ear: an ultrastructural investigation*. Am J Otol 12 (1): 35 - 39
- [11] Balkany TJ, Cohen NL, Gantz BJ (1999): *Surgical technique for the CLARION cochlear implant*. Ann Otol Rhinol Laryngol 108: 27 - 30
- [12] Ballantyne JC, Evans EF, Morrison AW (1982): *Electrical auditory stimulation in the management of profound hearing loss*. J Laryngol Otol 96 (9): 811 - 816
- [13] Banfai P, Hortmann G, Karczag A, Kubik S, Wustrow F (1984): *Results with eight-channel cochlear implants*. Adv Audiol 2: 1 - 18
- [14] Bargel HJ, Schulze G (1994): *Werkstoffkunde*. 6. Aufl., VDI-Verlag, Düsseldorf
- [15] Battmer RD (1987): *Das 22-kanalige Cochlear Implant-System nach Clark/NUCLEUS-eine Systembeschreibung*. In: Lehnhardt E, Hirshorn MS: Cochlear Implant-eine Hilfe für beidseitig Taube. Überblick über das 22-kanalige Cochlear Implant nach Clark/NUCLEUS. Springer, New York, Berlin: 101 - 106
- [16] Behrend D, Pau HW, Schmidt W, Enzenroß P, Schmitz KP, Guthoff R (2005): *Verfahren und Vorrichtung für Gefrierschliffe*. Patentschrift, DE 10 2005 017090.0, PCT/EP 2006 003379

- [17] Bernhards J, Weitzel B, Werner M, Rimpler M, Georgii A (1992): *A new histological embedding method by low-temperature polymerisation of methyl methacrylate allowing immuno- and enzyme histochemical studies on semi-thin sections of undecalcified bone marrow biopsies*. Histochemistry 98 (3): 145 - 154
- [18] Bjerregaard L, Geels K, Ottesen B, Rückert M (1992): *Metalog Guide*. Struers Tech A/S, Kopenhagen
- [19] Briggs RJ (2003): *Implantation and explantation bone study of the Nucleus 24 Contour with softip*. 9th Symposium Cochlear Implants in Children, Washington D.C., 24. - 26. April, Posterbeitrag
- [20] Briggs RJ, Tykocinski M, Xu J, Risi F, Svehla M, Cowan R, Stöver T, Erfurt P, Lenarz T (2006): *Comparison of round window and cochleostomy approaches with a prototype hearing preservation electrode*. Audiol Neurotol Suppl 1: 42 - 48
- [21] Burton MJ, Shepherd RK, Clark GM (1996): *Cochlear histopathologic characteristics following long-term implantation. Safety studies in the young monkey*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122 (10): 1097 - 1104
- [22] Chouard CH, MacLeod P (1976): *Implantation of multiple intracochlear electrodes for rehabilitation of total deafness: preliminary report*. Laryngoscope 86 (11): 1743 - 1751
- [23] Chouard CH, Meyer B, Fugain C, Koca O (1995): *Clinical results for the DIGISONIC multichannel cochlear implant*. Laryngoscope 105 (5 Pt 1): 505 - 509
- [24] Clark GM (2003): *Cochlear implants: fundamentals and applications*. Springer, New York, Berlin
- [25] Clark GM, Black R, Dewhurst DJ, Forster IC, Patrick JF, Tong YC (1977): *A multiple-electrode hearing prosthesis for cochlear implantation in deaf patients*. Med Prog Technol 5: 127 - 140
- [26] Clark GM, Pyman BC, Bailey QR (1979): *The surgery for multiple-electrode cochlear implantations*. J Laryngol Otol 93: 215 - 223
- [27] Clark GM, Tong YC, Martin LFA, Busby PA (1981): *A multi-channel cochlear implant. An evaluation using an open-set word test*. Acta Otolaryngol 91: 173 - 175
- [28] Clark GM, Tong YC, Patrick JF (1990): *Introduction*. In: Clark GM, Tong YC, Patrick JF: Cochlear Prostheses. Churchill, New York, Edinburgh: 1 - 14
- [29] Cochlear (2000): *Datenblatt Contour Electrode shapes in surgery*. N94247, Hannover
- [30] Cochlear (2000): *Datenblatt Nucleus 24 Double Array*. N94284F ISSI, Hannover
- [31] Cochlear (2002): *Temporal bone processing method*. I50476AE (2), Hannover: 1 - 15
- [32] Cochlear (2003): *Datenblatt Nucleus 24 Contour Advance*. N95604 ISSI, Hannover
- [33] Cochlear (2005): *Datenblatt Produkte*. Hannover
- [34] Cochlear (2006): *Datenblatt Nucleus freedom-Cochlear Implants*. N30970F ISSI, Hannover
- [35] Cohen NL (2000): *Surgical techniques for cochlear implants*. In: Waltzman SB, Cohen NL: Cochlear implants. 5. Aufl., Thieme, New York, Stuttgart: 151 - 156

- [36] Cohen NL, Roland JT, Fishman A (2002): *Surgical technique for the Nucleus Contour cochlear implant*. Ear Hear Suppl 23 (1): 59 - 66
- [37] Cohen NL, Waltzman SB (1993): *Partial insertion of the nucleus multichannel cochlear implant: technique and results*. Am J Otol 14 (4): 357 - 361
- [38] Colletti V, Fiorino FG, Carner M, Sacchetto L, Giarbini N (2000): *New approach for cochlear implantation: cochleostomy through the middle fossa*. Otolaryngol Head Neck Surg 123 (4): 467 - 474
- [39] Cowan R (2003): *Insertion of the Nucleus 24 Contour Electrode: review of temporal bone and safety studies*. 4th international symposium on electronic implants in otology & conventional hearing aids, Toulouse (Frankreich), 5. - 7. Juni, Paperpräsentation
- [40] Derkx P, Birkenhäger-Frenkel DH (1995): *A thionin stain for visualizing bone cells, mineralizing fronts and cement lines in undecalcified bone sections*. Biotech Histochem 70 (2): 70 - 74
- [41] Dowell RC, Clark GM, Martin LFA, Brown AM (1985): *Results of a preliminary clinical trial on a multiple-channel cochlear prosthesis*. Ann Otol Rhinol Laryngol 94: 244 – 250
- [42] Eddington DK, Dobelle WH, Brackmann DE, Mladejovsky MG, Parkin JL (1978): *Auditory prostheses research with multiple channel intracochlear stimulation in man*. Ann Otol Rhinol Laryngol 87 (6 Pt 2): 1 - 39
- [43] Eshraghi AA, Yang NW, Balkany TJ (2003): *Comparative study of cochlear damage with three perimodiolar electrode designs*. Laryngoscope 113 (3): 415 - 419
- [44] Fayad JN, Linthicum FH, Otte SR, Galey FR, House WF (1991): *Cochlear implants: histopathologic findings related to performance in 16 human temporal bones*. Ann Otol Rhinol Laryngol 100 (10): 807 - 811
- [45] Fayad JN, Luxford W, Linthicum FH (2000): *The Clarion electrode positioner: temporal bone studies*. Am J Otol 21 (2): 226 - 229
- [46] Franz BKH, Kuzma JA, Clark GM, Pyman BC, Webb RL (1989 a): *Fixation of the Melbourne/Cochlear multiple-electrode cochlear implant with a 0.1 mm four-stranded platinum wire and silastic cuff*. Zur Publikation angenommen
- [47] Gantz BJ, Turner CW (2003): *Combining acoustic and electrical hearing*. Laryngoscope 113 (10): 1726 - 1730
- [48] Georgii A, Bernhards J, Werner M (1995): *Die neue Hannover-Methode zur Kunststoffeinführung von Knochenmark: Kaltpolymerisation von Methylmetacrylat*. Pathologe 16 (1): 28 - 33
- [49] Gstoettner WK, Adunka O, Franz P, Hamzavi J, Plenck H, Susani M, Baumgartner W, Kiefer J (2001): *Perimodiolar electrodes in cochlear implant surgery*. Acta Otolaryngol 121 (2): 216 - 219
- [50] Gstoettner WK, Baumgartner WD, Franz P, Hamzavi J (1997): *Cochlear implant deep insertion surgery*. Laryngoscope 107: 544 - 546
- [51] Gstoettner WK, Baumgartner WD, Hamzavi J, Franz P (1997): *Surgical experience with the Combi 40 cochlear implant*. Adv Otorhinolaryngol 52: 143 - 146

- [52] Gstoettner WK, Franz P, Hamzavi J, Plenck H, Baumgartner WD, Czerny C (1999): *Intracochlear position of cochlear implant electrodes*. Acta Otolaryngol (Stockh) 119: 229 - 233
- [53] Gstoettner WK, Kiefer J, Baumgartner WD, Pok S, Peters S, Adunka O (2004): *Hearing preservation in cochlear implantation for electric acoustic stimulation*. Acta Otolaryngol 124 (4): 348 - 352
- [54] Gstoettner WK, Plenck H, Hamzavi J, Baumgartner WD, Czerny C (2000): *Combi 40 cochlear implantation: insertional trauma with different types of electrodes*. In: Waltzman SB, Cohen NL: Cochlear implants. 5. Aufl., Thieme, New York, Stuttgart: 178 - 179
- [55] Gstoettner WK, Pok SM, Peters S, Kiefer J, Adunka O (2005): *Kochlea-implantat mit Tieftonrestgehörerbhalt*. HNO 53: 784 - 791
- [56] Häusler R (2002): *Cochlear implantation without mastoidectomy: the percanal electrode insertion technique*. Acta Otolaryngol 122 (7): 715 - 719
- [57] Herrmann A, Pau HW, Behrend D, Löbner M, Schmidt W, Schmitz KP (2006): *Immunhistochemischer Nachweis gewebespezifischer Substanzen im Tissue Print von Gefrierschliffen humaner Felsenbeine*. Biomed Tech (Berl) Suppl 51: 125 - 126
- [58] Herrmann A, Pau HW, Behrend D, Schmidt W, Schmitz KP (2005): *The freeze grinding technique as a novel preparative method for human temporal bone*. Biomaterialien S1: 76 - 77
- [59] Hochmair ES, Hochmair-Desoyer IJ (1983): *Percepts elicited by different speech coding strategies*. Ann N Y Acad Sci 405: 268 - 279
- [60] Hüttenbrink KB (1992): *Die Mechanik und Funktion des Mittelohres. Teil 1: Die Ossikelkette und die Mittelohrmuskeln*. Laryngorhinootologie 71 (11): 545 - 551
- [61] Ilberg C von (2004): *EAS-elektrisch-akustische Stimulation; Strategie eines neuen Hörgerätes für hochgradig Schwerhörige*. Laryngorhinootologie 83 (2)
- [62] Ilberg C von, Kiefer J, Tillein J, Pfenningdorff T, Hartmann R, Stürzebecher E, Klinke R (1999): *Electric-acoustic stimulation of the auditory system*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 61 (6): 334 - 340
- [63] Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA (1993): *Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity*. J Bone Miner Res 8 (9): 1019 - 1029
- [64] Jaekel K, Richter B, Laszig R (2002): *Die historische Entwicklung der Cochlea-Implantate: von Volta bis zur mehrkanaligen intracochleären Stimulation*. Laryngorhinootol 81 (9): 649 - 658
- [65] Jolly CN, Gstoettner WK, Hochmair-Desoyer I, Baumgartner WD, Hamzavi J (2000): *Principles and outcomes in perimodiolar positioning*. Ann Otol Rhinol Laryngol 185: 20 - 23
- [66] Just T, Gafumbegete E, Kleinschmidt EG, Pau HW (2003): *Kontaktendoskopische Quantifizierung der fungiformen Papillen-Korrelation zum Schmeckvermögen?* Laryngo-Rhino-Otol 82 (7): 501 - 507

- [67] Kaissling B (1971): *Histologische und histochemische Untersuchungen an semidünnen Schnitten*. In: Becher H, Kadanoff D, von Mayersbach H, Scharf JH: Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch. Bd. 119. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig, 1 - 13
- [68] Kennedy DW (1987): *Multichannel intracochlear electrodes: mechanism of insertion trauma*. Laryngoscope 97 (1): 42 - 49
- [69] Kessler DK (1999): *The Clarion Multi-Strategy Cochlear Implant*. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 177: 8 - 16
- [70] Kiefer J, Pok M, Adunka O, Stürzebecher E, Baumgartner W, Schmidt M, Tillein J, Ye Q, Gstoettner W (2004): *Die kombinierte elektrische und akustische Stimulation des auditorischen Systems (EAS)*. 7. DGA Jahrestagung
- [71] Kiefer J, Weber A, Pfennigdorff T, Ilberg C von (2000): *Scala vestibule insertion in cochlear implantation: a valuable alternative for cases with obstructed scala tympani*. J Otorhinolaryngol Relat Spec 62 (5): 251 - 256
- [72] Klenzner T, Richter B, Nagursky H, Schipper J, Laszig R, Aschendorff A (2004): *Evaluation des Insertionstraumas des Nucleus Contour Advance-Elektrodenträgers im humanen Felsenbeinmodell*. Laryngorhinootologie 83 (12): 840 - 844
- [73] Klinke R, Silbernagel S (2001): *Lehrbuch der Physiologie*. 3. Aufl., Thieme, New York, Stuttgart
- [74] Kronenberg J, Migirov L, Baumgartner WD (2002): *The suprameatal approach in cochlear implant surgery: our experience with 80 patients*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 64 (6): 403 - 405
- [75] Kubisch C, Bolz H, Gal A (2000): *Genetik und molekulare Grundlagen der nicht-syndromalen Taubheit*. In: Ganten D, Ruckpaul K: Handbuch der molekularen Medizin. Bd. 7. Springer, New York, Berlin: 115 - 149
- [76] Kuzma, J, Seldon H, Brown GG (1999): *Selbstbiegende Cochlear-Elektrodengruppe*. Patentschrift, DE 692 28 397 T2
- [77] Lange RH, Blödorn J (1981): *Das Elektronenmikroskop: TEM + REM: Leitfaden für Biologen und Mediziner*. Thieme, New York, Stuttgart
- [78] Laszig R, Aschendorff A, Schipper J, Klenzner T (2004): *Aktuelle Entwicklung zum Kochleaimplantat*. HNO 52 (4): 357 - 362
- [79] Leake PA, Hradek GT, Snyder RL (1999): *Chronic electrical stimulation by a cochlear implant promotes survival of spiral ganglion neurons after neonatal deafness*. J Comp Neurol 412 (4): 543 - 562
- [80] Lehnhardt E (1992): *Intracochleäre Elektrodenplatzierung mittels Healon*. HNO 40 (3): 86 - 89
- [81] Lehnhardt E (1993): *Intrakochleäre Platzierung der Cochlear-Implant-Elektroden in soft surgery technique*. HNO 41 (7): 356 - 359
- [82] Lehnhardt E, Wagner H, Kabelka Z (2004): *Are we confident about operating on--or even inside--an inner ear that is still functional without having to fear that the patient will lose his residual hearing?* Otolaryngol Pol 58(1): 45 - 49

- [83] Lenarz T, Battmer RD, Goldring JE, Neuburger J, Kuzma J, Reuter G (2000): New electrode concepts (modiolus-hugging electrodes). *Adv Otorhinolaryngol* 57: 347 - 353
- [84] Leysieffer H, Zenner HP, Baumann J (2002): *Mindestens teilimplantierbares System zur Rehabilitation einer Hörstörung*. Patentschrift, DE 100 18 360 C2
- [85] Marangos N, Laszig R (1998): *Cochlear Implants - Die prothetische Versorgung bei Taubheit um die Jahrtausendwende*. *HNO* 46 (1): 12 - 26
- [86] Martin G, Loac R (2003): *Makrofotografie. Professionelle Anleitung*. Christian Verlag, München
- [87] Maurer J (1999): *Neurootologie mit Schwerpunkt Untersuchungstechniken*. Thieme, New York, Stuttgart
- [88] MED-EL (2005): *Datenblatt A new era in cochlear implantation*. Innsbruck
- [89] MED-EL (2006): *Datenblatt Elektrodentypen*. MKT3114G, Innsbruck
- [90] MED-EL (2006): *Datenblatt PULSAR_{CI}¹⁰⁰ Cochlea-Implantat*. MKT1094Gr.2.0, Innsbruck
- [91] Mercer EH (1963): *A scheme for section staining in electron microscopy*. *J roy microsc Soc* 81: 179 - 186
- [92] Merzenich MM, Rebscher SJ, Byers CL, Wilkinson DR, Zimmermann PA, Jefferis AF (1984): *Scala tympani electrode arrays*. NIH Contract NO1-NS-3-2353
- [93] Mollenhauer HH, Droleskey RE (1997): *Image contrast in sections of epoxy resin-embedded biological material: maintenance of a proper anhydride-epoxy ratio during tissue impregnation*. *Microsc Res Tech* 36 (5): 417 - 421
- [94] MXM (2005): *Datenblatt Digisonic SP "smooth profile"*. CE 0459, Saarbrücken
- [95] MXM (2006): *Datenblatt Digisonic SP*. CE 0459 (1), Saarbrücken
- [96] Nadol JB, Ketten DR, Burgess BJ (1994): *Otopathology in a case of multichannel cochlear implantation*. *Laryngoscope* 104 (3 Pt 1): 299 - 303
- [97] Nadol JB, Shiao JY, Burgess BJ, Ketten DR, Eddington DK, Gantz BJ, Kos I, Montandon P, Coker NJ, Roland JT, Shallop JK (2001): *Histopathology of cochlear implants in humans*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110 (9): 883 - 891
- [98] Otte J, Schuknecht HF, Kerr AG (1978): *Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation*. *Laryngoscope* 88 (8 Pt 1): 1231 - 46
- [99] Parkinson AJ, Arcaroli J, Staller SJ, Arndt PL, Cosgriff A, Ebinger K (2002): *The Nucleus 24 Contour cochlear implant system: adult clinical trial results*. *Ear Hear Suppl* 23 (1): 41 - 48
- [100] Patrick JF, Seligman PM, Money DK, Kuzma JA (1990): *Engineering*. In: Clark GM, Tong YC, Patrick JF: *Cochlear Prostheses*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh: 153 - 179
- [101] Pau HW (2005): *Persönliche Mitteilung*

- [102] Pau HW, Herrmann A, Schmidt W, Behrend D (2005): *New possibilities of examining temporal bone specimens using a "frozen-grinding technique"*. Biomed Tech (Berl) Suppl 50: 519 - 520
- [103] Pau HW, Just T, Dommerich S, Lehnhardt E, Behrend D (2005): *Concept and anatomical feasibility study of an "endosteal electrode" for bimodal stimulation in severely deaf ears*. Laryngorhinootologie 84 (6): 402 - 407
- [104] Pau HW, Just T, Lehnhardt E, Hessel H, Behrend D (2005): *An "endosteal electrode" for cochlear implantation in cases with residual hearing? Feasibility study: preliminary temporal bone experiments*. Otol Neurotol 26 (3): 448 - 454
- [105] Pau HW, Peimann CJ, Ußmüller J (1993): *Über die Wittmaack-Felsenbeinsammlung und Möglichkeiten einer EDV-Katalogisierung*. HNO 41 (11): 512 - 518
- [106] Peeters S, Marquet J, Offeciers FE, Bosiers W, Kinsbergen J, Van Durme M (1989): *Cochlear implants: the Laura prosthesis*. J Med Eng Technol 13 (1 - 2): 76 - 80
- [107] Plenk H (1986): *The microscopic evaluation of hard tissue implants*. In: Williams DF (Hrsg.): *Techniques of biocompatibility testing*. CRC Press 1: 35 - 81
- [108] Raphael Y, Altschuler RA (2003): *Structure and innervation of the cochlea*. Brain Res Bull 60 (5 - 6): 397 - 422
- [109] Reid PD, Pont-Lezica RF (1992): *Tissue Printing. Tools for the study of anatomy, histochemistry, and gene expression*. Academic Press, New York, London
- [110] Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): *Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy*. Stain Technol 35: 313 - 323
- [111] Richter B, Aschendorff A, Lohnstein P, Husstedt H, Nagursky H, Laszig R (2001): *The Nucleus Contour electrode array: a radiological and histological study*. Laryngoscope 111 (3): 508 - 514
- [112] Richter B, Jaekel K, Aschendorff A, Marangos N, Laszig R (2001): *Cochlear structures after implantation of a perimodiolar electrode array*. Laryngoscope 111 (5): 837 - 843
- [113] Riesenberger H (Hrsg.), Bergner J, Beyer H (1988): *Handbuch der Mikroskopie*. 3. Aufl., VEB Verlag Technik, Berlin
- [114] Roland JT, Fishman AJ, Alexiades G, Cohen NL (2000): *Electrode to modiolus proximity: a fluoroscopic and histologic analysis*. Am J Otol 21 (2): 218 - 225
- [115] Roland JT, Magardino TM, Go JT (1995): *Effects of glycerine, hyaluronic acid and hydroxypropyl methycellulose on the spiral ganglion of the guinea pig cochlea*. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 9: 64 - 68
- [116] Roland JT, Svehla M, Gibson P (2003): *Electrode Insertion Mechanics: Forces on the Outer Wall*. Conference on Implantable Auditory Prostheses, Asilomar, 17. - 22. August, Posterbeitrag
- [117] Romeis B, Böck P, Denk H (1989): *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Baltimore
- [118] Schantz A, Schecter A (1965): *Iron-hematoxylin and safranin O as a polychrome stain for epon sections*. Stain Technol 40: 279 - 282

- [119] Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999): *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Springer, New York, Berlin
- [120] Schmidt PF (1994): *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. expert-Verlag, Renningen-Malmsheim
- [121] Schmidt RF, Thews G (1990): *Physiologie des Menschen*. 24. Aufl., Springer, New York, Berlin
- [122] Shannon RV (1985): *Loudness summation as a measure of channel interaction in a cochlear prosthesis*. In: Schindler RA, Merzenich MM: *Cochlear Implants*. Raven Press, New York: 323 - 334
- [123] Shepherd RK, Clark GM, Pyman BC, Webb RL (1985): *Banded intracochlear electrode array: evaluation of insertion trauma in human temporal bones*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 94 (1 Pt 1): 55 - 59
- [124] Skarzynski H, Lorens A, Piotrowska A, Anderson I (2006): *Partial deafness cochlear implantation provides benefit to a new population of individuals with hearing loss*. *Acta Otolaryngol* 126 (7): 934 - 940
- [125] Tölke A, Tölke I (1977): *Makrofoto, Makrofilm: technische Probleme der Makrofotografie und des Makrofilms*. 3. Aufl., VEB Fotokinoverlag, Leipzig
- [126] Tonndorf J, Khanna SM (1972): *Tympanic-membrane vibrations in human cadaver ears studied by time-averaged holography*. *J Acoust Soc Am* 52 (4): 1221 - 1233
- [127] Tykocinski M, Cohen LT, Pyman BC, Roland T, Treaba C, Palamara J, Dahm MC, Shepherd RK, Xu J, Cowan RS, Cohen NL, Clark GM (2000): *Comparison of electrode position in the human cochlea using various perimodiolar electrode arrays*. *Am J Otol* 21 (2): 205 - 211
- [128] Van-de-Heyning PH, D'Haese PS, Claes J, Koekelkoren E, De Bodt M (1998): *Cochlear implantation: an overview of existing implants*. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 52 (2): 91 - 103
- [129] Wardrop P, Whinney D, Rebscher SJ, Roland JT, Luxford W, Leake PA (2005): *A temporal bone study of insertion trauma and intracochlear position of cochlear implant electrodes. I: Comparison of Nucleus banded and Nucleus Contour electrodes*. *Hear Res* 203 (1 - 2): 54 - 67
- [130] Waschull H (1984): *Präparative Metallographie: Präparationstechnik für die Lichtmikroskopie*. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig
- [131] Wasielewski R von, Werner M, Nolte M, Wilkens L, Georgii A (1994): *Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue sections on a broad panel of antibodies*. *Histochemistry* 102 (3): 165 - 172
- [132] Watts RH, Green D, Howells GR (1981): *Improvements in histological techniques for epoxy resin embedded bone specimens*. *Stain Technol* 56 (3): 155 - 161
- [133] Webb RL, Pyman BC, Franz BKHG, Clark GM (1990): *The surgery of cochlear implantation*. In: Clark GM, Tong YC, Patrick JF: *Cochlear Prostheses*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, 153 - 179
- [134] Welling DB, Hinojosa R, Gantz BJ, Lee J (1993): *Insertional trauma of multichannel cochlear implants*. *Laryngoscope* 103 (9): 995 - 1001

- [135] Wever EG, Lawrence M (1954): *Physiological acoustics*. Princeton University Press, Princeton: 454
- [136] Wilson BS (2000): *New directions in implant design*. In: Waltzman SB, Cohen NL: Cochlear implants. 5. Aufl., Thieme, New York, Stuttgart: 43 - 56
- [137] Ylikoski J, Savolainen S (1984): *The cochlear nerve in various forms of deafness*. Acta Otolaryngol (Stockh) 98 (5 - 6): 418 - 427

Thesen

1. Ex-vivo-Untersuchungen von insertionsbedingten Traumen sollen bevorzugt an nativen Präparaten erfolgen, um eine Differenzierung von präparationsbedingten Schäden zu gewährleisten.
2. Kryofelsenbeinpräparate müssen formstabil und anfärbbar sein. Eine kontinuierliche Temperatur von unter 0 °C muss aufrechterhalten werden.
3. Einbettungen von Felsenbeinpräparaten haben sich als Standardpräparationsmethode für histologische Untersuchungen durchgesetzt. Trotzdem weisen sie z. T. einen nicht zufriedenstellenden Strukturerhalt auf.
4. Im Gegensatz zu eingebetteten Präparaten erfolgen bei nativen Kryopräparationen keine einbettbedingten Strukturschäden. Sie setzen keine Probenvorbereitung mit Fremdstoffen voraus. Durch eine Minimierung der Probenvorbereitung wird bei Kryopräparaten ein natives formstabiles Material gewährleistet.
5. Cochlear-Implantat-Elektroden sollen eine atraumatische Insertion gewährleisten, um eventuell nachfolgende insertionsbedingte Hörminderungen zu minimieren.
6. Im Gegensatz zu anderen Elektrodenmodellen können endosteale Elektroden durch ihre besonders flache Form und ihre Lokalisation außerhalb der flüssigkeitsgefüllten Räume bei schonender und atraumatischer Insertion insertionsbedingte Hörminderungen limitieren.
7. Die an eine Schleifvorrichtung für Kryofelsenbeinpräparate gestellten Anforderungen einer Fixierung, kontinuierlichen Kühlung und eines exakten Vorschubs in definierten µm-Abständen werden durch die konstruierte, gefertigte und optimierte Schleifvorrichtung erfüllt.
8. Eosin-Hämalaun-Färbungen und immunhistochemische Färbungen von „Tissue Prints“ sind ein geeignetes Verfahren, um cochleäre Membranen optisch zu kontrastieren.
9. Um eine zufriedenstellende immunhistochemische Anfärbbarkeit von „Tissue Prints“ zu gewährleisten, sind Optimierungen der Inkubationszeiten, Konzentrationsanpassungen, Anpassung der Printtechnik und Auswahl der Antikörper notwendig.

10. Zur Übersichtsdarstellung von Kryofelsenbeinpräparaten sind besonders gut Makroaufnahmen und projektionsmikroskopische Aufnahmen geeignet. Sie gewährleisten eine Beurteilung der Membranintegrität, bei guter Bildqualität. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen im ESEM-Modus zeichnen sich durch eine sehr gute Detaildarstellung aus, sind für die Beurteilung insertionsbedingter Schäden am Nativpräparat jedoch nicht geeignet.
11. Als unzureichende mikroskopische Verfahren zur Beurteilung der cochleären Membranintegrität haben sich auflichtmikroskopische und kontaktendoskopische Untersuchungen erwiesen.
12. Die Kryoschliffpräparation stellt eine relativ einfache und z. T. ausbaufähige ex-vivo-Präparationsmethode zur Beurteilung der Membranintegrität dar, die eine frühzeitige Vergleichbarkeit mit in-vivo-Insertionsbedingungen ermöglicht.
13. Die Kryoschliffpräparation ist auch für andere native, insbesondere empfindliche, Gewebe anwendbar.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Köln,

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Anne Herrmann
Geburtsdatum: 14. Februar 1981
Geburtsort:
eMail: anne_herrmann@gmx.net
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1987 - 1991 Grundschule Klint in Braunschweig
1991 - 1993 Orientierungsstufe Leonhardstraße in Braunschweig
1993 - 2000 Gymnasium Ricarda-Huch-Schule in Braunschweig
2000 Abitur, Note: 2,1

Freiwilliges Soziales Jahr

08/2000 – 07/2001 Freiwilliges Soziales Jahr an der Klinik für Orthopädie in Bad Bentheim
08/2001 Praktikum an der Klinik für Orthopädie in Bad Bentheim

Universitäre Ausbildung

2001 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Rostock
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Rostock, Note: 3
2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Rostock, Note: 2

Praktisches Jahr

08/2006 – 12/2006 Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie „Otto Körner“, Universität Rostock
12/2006 – 04/2007 Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Klinikum Leverkusen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Köln
04/2007 – 07/2007 Klinik für Chirurgie, Klinikum Leverkusen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Köln

Beruflicher Werdegang

seit 02/2008 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, plastische Operationen, Phoniatrie und Pädaudiologie, Städtische Kliniken Neuss Lukaskrankenhaus GmbH, Akademisches Lehrkrankenhaus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Danksagung

Ich danke dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie "Otto Körner", Prof. Dr. med. H. W. Pau, für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung.

Mein spezieller Dank gilt Prof. Dr.-Ing. D. Behrend, dem stellvertretenden Direktor des Instituts für Biomedizinische Technik, für seine jederzeit gewährte Geduld, Hilfsbereitschaft und Ermutigung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische Technik Rostock für wertvolle Anregungen und die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Herrn P. Enzenross, Herrn Dipl.-Ing. P. Behrens, Herrn Dipl.-Ing. P. Littwin, Dr. rer. nat. habil. M. Löbler und Herrn Dr. Ing. N. Grabow.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihren Rat und ihre Geduld.

Anhang

Tab. 1a: Klassifikation kommerziell verfügbarer Cochlear-Implantate, Nucleus/Cochlear

Implantat	CI Mini 22 Implantat [80, 85]	Nucleus CI 22 Implantat [33, 128]	CI 24M Implantat [85, 111, 128]	Nucleus 24 Double Implantat [30, 33]
Abmessung (mm)	(-)	(-)	27 x 18 x 6,4	27 x 18 x 6,4
Gewicht (g)	(-)	(-)	9,5	(-)
Material Gehäuse	Silikon- elastomer/ Titan	Silikon- elastomer/ Titan	Silikon- elastomer/ Titan	Silikon- elastomer/ Titan
Material Elektrode	Platin	(-)	Platin	Platin
Material Elektroden- träger	(-)	(-)	Silikon- elastomer	(-)
Anzahl Elektroden	22	22	22 + 2 (Referenz)	22 (11 pro Array) + 3 (E)
Anzahl Kanäle	(-)	22	22	22
Platzierung Elektroden	Scala tympani	Scala tympani	Scala tympani	Scala tympani
Stimulations- rate (Hz)	(-)	(-)	15 000 (14 400)	14 400
Stimulations- modus	BP, CG	(-)	BP, MP, CG	BP, MP
Stimulations- art	mehrkanalig	mehrkanalig	mehrkanalig	mehrkanalig
Signal- übertragung	transkutan	transkutan	transkutan	transkutan
Sprach- kodierungs- strategie	SPEAK, CIS, ACE	SPEAK	SPEAK, CIS, ACE	SPEAK, CIS, ACE
Magnet	auswechsel- bar	(-)	auswechsel- bar	auswechsel- bar
Telemetrie	NRT, Compliance	NRT	NRT, Compliance	NRT
Besonder- heiten	(-)	individuell angepasster optimaler Klang	(-)	ossifizierte Cochlea

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 1b: Klassifikation kommerziell verfügbarer Cochlear-Implantate, Nucleus/Cochlear

Implantat	Nucleus 24 Contour Implantat (Model C124R) [33, 111]	Nucleus 24 Contour Advance (Model CI 24R (CA)) [32]	Ineraid [136]
Abmessung (mm)	22 x 20 x 6,9	20,3 x 19,3 x 6,9	(-)
Gewicht (g)	(-)	9,5	(-)
Material Gehäuse	Silikon-elastomer/ Titan	Titan/Platin	(-)
Material Elektrode	Platin	Platin	(-)
Material Elektroden-träger	Silikonelastomer	Silikonelastomer	(-)
Anzahl Elektroden	22 + 2 (E)	22 + 2 (E): CAE 22 + 10 + 2: Straight	(-)
Anzahl Kanäle	22	22	(-)
Platzierung Elektroden	Scala tympani, perimodiolar	(-)	Scala tympani
Stimulations-rate (Hz)	14 400	14 400	(-)
Stimulations-modus	BP, MP, CG	BP, MP, CG	(-)
Stimulations-art	mehrkanalig	mehrkanalig	mehrkanalig
Signal-übertragung	transkutan	(-)	transkutan
Sprach-kodierungs-strategie	(-)	SPEAK, CIS, ACE	(-)
Magnet	auswechselbar	auswechselbar	(-)
Telemetrie	NRT	NRT, Compliance, Impedence	(-)
Besonder-heiten	(-)	AOS-Technik	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 2: Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, MED-EL

Implantat	Combi 40 [51, 88, 128]	Combi 40+ [85, 88, 128]	PULSAR_{CI}¹⁰⁰ [90]
Abmessung (mm)	(-)	33,5 x 23,4 x 4	33,6 x 23,7 x 4
Gewicht (g)	(-)	9	9,3
Material Gehäuse	(-)	Keramik	Keramik
Material Elektrode	(-)	Platin-Iridium	Platin-Iridium (90/10)- Drähte, Iridium-Kontakte
Material Elektroden-träger	(-)	Silikon-elastomer	(-)
Anzahl Elektroden	16	24 + 1 (Referenz)	24
Anzahl Kanäle	8	12	(-)
Platzierung Elektroden	(-)	Scala tympani	(-)
Stimulationsrate (Hz)	12 120	18 000 (18 180)	18 181 (50 704)
Stimulationsmodus	MP	MP	(-)
Stimulationsart	mehrkanalig	mehrkanalig	mehrkanalig
Signalübertragung	transkutan	transkutan	(-)
Sprachkodierungsstrategie	CIS	CIS, SPEAK	(-)
Magnet	(-)	(-)	(-)
Telemetrie	+	+	IFT, ART
Besonderheiten	(-)	(-)	24 separate Stromquellen, Präzisionsstimulation

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 3: Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, Advanced Bionics

Implantat	Clarion [69]	Clarion 1.2 [85, 88, 128]	Clarion 1.2 [85, 88, 128]
Abmessung (mm)	37 x 25 x 6 (31 x 25 x 6)	31 x 25 x 6	31 x 25 x 6
Gewicht (g)	(-)	8	8
Material Gehäuse	(-)	Keramik	Keramik
Material Elektrode	Platin-Iridium (90/10)	Platin-Iridium	Platin-Iridium
Material Elektroden-träger	Silikon-elastomer	Silikon-elastomer	Silikon-elastomer
Anzahl Elektroden	16	16 + 1 (E)	16 + 1 (E)
Anzahl Kanäle	8	8	8
Platzierung Elektroden	(-)	Scala tympani	Scala tympani
Stimulationsrate (Hz)	(-)	6 500	6 500
Stimulationsmodus	(-)	BP, MP	BP, MP
Stimulationsart	(-)	mehrkanalig	mehrkanalig
Signalübertragung	(-)	transkutan	transkutan
Sprachkodierungsstrategie	CIS, SAS	CIS,PPS, CAS, SAS	CIS,PPS, CAS, SAS
Magnet	(-)	mit und ohne	mit und ohne
Telemetrie	(-)	NRT	NRT
Besonderheiten	(-)	(-)	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 4: Klassifikation verschiedener Cochlear-Implantate, MXM, A.B.S.

Hersteller	MXM	A.B.S. (Philips)
Implantat	Digisonic DX10 [23, 85, 88, 128]	Laura [85, 88, 128]
Abmessung (mm)	29 ø x 6,8 (6,7)	26,5 x 25,5 x 4,5
Gewicht (g)	15	12,5
Material Gehäuse	Keramik	Titan
Material Elektrode	Platin-Iridium	Platin-Iridium
Material Elektroden­träger	Silikonelastomer	Silikonelastomer
Anzahl Elektroden	15	16
Anzahl Kanäle	15	8
Platzierung Elektroden	Scala tympani	Scala tympani
Stimulationsrate (Hz)	7 800 (12 000)	12 500
Stimulationsmodus	MP (CG + Referenz­elektrode)	BP
Stimulationsart	mehrkanalig	mehrkanalig
Signalübertragung	transkutan	transkutan 10 MHz
Sprachkodierungsstrategie	FFT	CIS, Phase Locked CIS
Magnet	(-)	(-)
Telemetrie	+	+
Besonderheiten	verbessertes Sprachverstehen und Musikhören, „größte“ Elektrode	„kleinste“ Elektrode

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 5 a: Elektrodengeometrien, Cochlear

Elektrodenbezeichnung	Nucleus Mini 22 Array [80, 85]	Nucleus Straight Elektroden- array [34, 85, 111, 128]	Nucleus 24 Double Array [33]
Anzahl Elektroden	22	22 + 10 (inaktiv) + 2 (E)	22
Material Elektroden	Platin-Iridium (90/10)	Platin	(-)
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	(-)	(-)	(-)
Anordnung Kontakte	(-)	(-)	(-)
Maße Kontakte (µm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kanäle	(-)	22	(-)
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	1	1	2
Material Elektrodenträger	Silikon- elastomer	Silikon- elastomer	(-)
Anzahl Drähte	(-)	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Draht (mm)	0,025	(-)	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	0,4 - 0,6	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	0,3	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	0,75	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	(-)	28	(-)
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	0,4	0,4	0,4 - 0,5
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	0,4	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	0,6	0,6	(-)
Länge Elektrodenbereich (mm)	(-)	17	8,25
Insertionstiefe (mm)	17	25	(-)
Form	(-)	gerade	(-)
Lokalisation	Scala tympani	Scala tympani	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 5 b: Elektrodengeometrien, Cochlear

Elektrodenbezeichnung	Nucleus 24 Contour Array [33, 111]	Nucleus 24 Contour Advance Array (CI 24R) [32, 34]	Nucleus 24k Array [33, 111]
Anzahl Elektroden	22	22 + 2 (E)	22
Material Elektroden	(-)	Platin	Platin
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	(-)	(-)	(-)
Anordnung Kontakte	(-)	(-)	(-)
Maße Kontakte (µm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kanäle	(-)	22	(-)
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	1	(-)	1
Material Elektrodenträger	Silikon-elastomer	Silikon-elastomer	Silikonelastomer
Anzahl Drähte	(-)	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Draht (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	19,3	(-)	(-)
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	0,4 - 0,5 (0,5)	0,2 (Softip)	0,4 - 0,5 (0,4)
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	0,5	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	0,8	0,8	0,6
Länge Elektrodenbereich (mm)	(-)	15	(-)
Insertionstiefe (mm)	(-)	(-)	25
Form	gebogen	selbstbiegend	gerade
Lokalisation	Scala tympani, perimodiolar	Scala tympani, perimodiolar	Scala tympani

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 6 a: Elektrodengeometrien, MED-EL

Elektrodenbezeichnung	Combi 40 Elektrodenarray [51, 49]	Standard Elektrodenarray [1, 3, 85, 88, 89, 90, 128]	Compressed Elektrodenarray [89, 90]
Anzahl Elektroden	16	24 + 1 (Referenzelektrode)	(-)
Material Elektroden	(-)	Platin-Iridium (90/10)	(-)
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	12	24	24
Anordnung Kontakte	paarig	paarig	paarig
Maße Kontakte (µm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	(-)	2,4	1,1
Anzahl Kanäle	8	12	12
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	(-)	(-)	(-)
Material Elektrodenträger	Silikonelastomer	Silikonelastomer	(-)
Anzahl Drähte	(-)	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Draht (µm)	(-)	25	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	(-)	30 (31,5 (I))	(-)
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	(-)	0,50 x 0,48 (0,5)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	(-)	0,80 x 0,78 (1,3; 0,8)	(-)
Länge Elektrodenbereich (mm)	(-)	27,4 (26,4)	12,1
Insertionstiefe (mm)	30	30 - 31	30
Form	(-)	(-)	(-)
Lokalisation	Scala tympani, perimodiolar	(-)	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 6 b: Elektrodengeometrien, MED-EL

Elektrodenbezeichnung	Split Elektrodenarray [89, 90]	Medium Elektrodenarray [2, 89, 90]	Flex EAS Elektrodenarray [1, 3]
Anzahl Elektroden	(-)	24	(-)
Material Elektroden	(-)	(-)	(-)
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	24	24	24
Anordnung Kontakte	paarig	paarig	paarig/singulär
Maße Kontakte (µm)	(-)	800 x 500	800 x 500
Abstand Kontakte (mm)	1,1	1,9	1,9
Anzahl Kanäle	12	12	(-)
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	2	(-)	2
Material Elektrodenträger	(-)	Silikonelastomer	Silikonelastomer
Anzahl Drähte	(-)	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)	Platin-Iridium (90/10)
Durchmesser Draht (µm)	(-)	(-)	25
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)	26 (I)
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	(-)	0,50 x 0,48	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	(-)	0,80 x 0,78	0,8
Länge Elektrodenbereich (mm)	9,3	20,9	20,9
Insertionstiefe (mm)	24 - 26	20 - 30 (360°)	360°
Form	(-)	(-)	(-)
Lokalisation	(-)	Scala tympani	Scala tympani

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 7: Elektrodengeometrien, Advanced Bionics

Elektrodenbezeichnung	Hi Focus 1j Elektrodenarray [4, 5]	Hi Focus Helix Elektrodenarray [4, 5]
Anzahl Elektroden	16	16
Material Elektroden	Platin-Iridium	Platin-Iridium
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	(-)	(-)
Anordnung Kontakte	linear, medial (Innenseite)	linear, medial (Innenseite)
Maße Kontakte (µm)	(-)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	1,1	0,85
Anzahl Kanäle	(-)	(-)
Durchmesser extracochlärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	(-)	(-)
Material Elektrodenträger	Silikonelastomer	Silikonelastomer
Anzahl Drähte	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)
Durchmesser Draht (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	25	24,5
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	0,4	0,6
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	0,8	1,1
Länge Elektrodenbereich (mm)	17	13
Insertionstiefe (mm)	25	18 - 21
Form	(-)	(-)
Lokalisation	(-)	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 8: Elektrodengeometrien, MXM

Elektrodenbezeichnung	Digisonic Elektrodenarray [23, 24]	Digisonic DX 10 Elektroden- array [85, 128]	Digisonic DX 10/SP Elektroden- array [94, 95]
Anzahl Elektroden	15	15	20 + 2 (Referenz- elektroden)
Material Elektroden	Platin-Iridium	Platin-Iridium	Platin-Iridium
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)	0,8 - 1,8
Anzahl Kontakte	(-)	(-)	(-)
Anordnung Kontakte	bandförmig	(-)	(-)
Maße Kontakte (µm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	0,7	(-)	(-)
Anzahl Kanäle	(-)	15	20
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)	1,1
Anzahl Elektrodenträger	(-)	(-)	(-)
Material Elektrodenträger	Silikonelastomer	Silikonelastomer	Silikon- elastomer
Anzahl Drähte	(-)	(-)	(-)
Material Draht	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Draht (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	24	(-)	25
Breite Elektrodenarray (mm)	0,5	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	(-)	(-)	0,5
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	(-)	(-)	0,9
Länge Elektrodenbereich (mm)	(-)	18	(-)
Insertionstiefe (mm)	(-)	(-)	(-)
Form	gerade	(-)	(-)
Lokalisation	Scala tympani	(-)	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers

Tab. 9: Elektrodengeometrien, A.B.S. (Philips)

Elektrodenbezeichnung	Laura Elektrodenarray [106]	Laura Flex Elektrodenarray [128]
Anzahl Elektroden	16	16
Material Elektroden	Platin-Iridium	Platin-Iridium
Elektrodenoberfläche (mm ²)	(-)	(-)
Anzahl Kontakte	8	(-)
Anordnung Kontakte	(-)	(-)
Maße Kontakte (µm)	140 (Durchmesser)	(-)
Abstand Kontakte (mm)	2,3 (längs) 1,4 (Breite)	(-)
Anzahl Kanäle	(-)	8
Durchmesser extracochleärer Abschnitt (mm)	(-)	(-)
Anzahl Elektrodenträger	(-)	(-)
Material Elektrodenträger	Silikonelastomer	(-)
Anzahl Drähte	16	(-)
Material Drähte	Platin-Iridium	(-)
Durchmesser Draht (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Zylinder (mm)	(-)	(-)
Breite Zylinder (mm)	(-)	(-)
Abstand Zylinder (mm)	(-)	(-)
Länge Elektrodenarray (mm)	110	22
Breite Elektrodenarray (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Spitze (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, apikal (mm)	(-)	(-)
Durchmesser Elektrodenarray, Basis (mm)	(-)	(-)
Länge Elektrodenbereich (mm)	(-)	16,6
Insertionstiefe (mm)	(-)	(-)
Form	gerade, Krümmung an der Spitze	(-)
Lokalisation	(-)	(-)

(-) keine Angaben des Herstellers