

Diagnostik humaner Perilymphe

H. Schmitt¹, G. Lilli¹, G. Reuter¹, T. Lenarz¹, M. Wollweber², M. Höhl², U. Morgner², A. Pich³

¹HNO-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. T. Lenarz)

²Institut für Quantenoptik, Leibniz Universität Hannover

³Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover

Material und Methoden

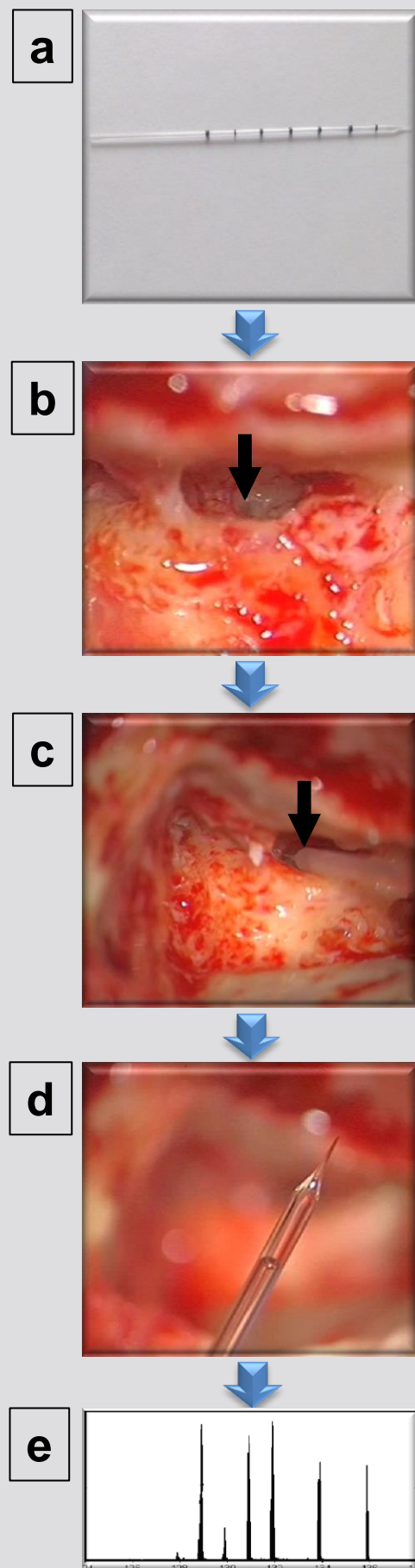


Abb. 1: Entnahmetechnik für humane Perilymphe

Bisher existieren nur in begrenztem Ausmaß Möglichkeiten einer genauen Diagnostik der Erkrankungen des Innenohres, die zu einer Innenohrschwerhörigkeit führen. Das Ziel dieses Projekts ist, die humane Perilymphe biochemisch zu analysieren, um ihre Zusammensetzung *per se* zu untersuchen. Weiterhin sollen perilymphspezifische Protein-Biomarker identifiziert werden, die mit Erkrankungen des Innenohres korrelieren, um Ursachen und Mechanismen unterschiedlicher Innenohrerkrankungen diagnostizieren zu können.

Humane Perilymphproben können intraoperativ bei Operationen am Innenohr entnommen werden (Abb. 1).

a: Modifizierte Mikrogaskapillare (Innendurchmesser 0,47 mm, skaliert mit 1µl Markern)

b: Im Rahmen einer Cochlea Implantat (CI)-Operation exponiertes rundes Fenster

c: Punktieren der Rundfenstermembran (RFM) mit der Mikrogaskapillare direkt vor der Insertion der CI-Elektrode

d: Durch Kapillarkräfte schonend angesaugte Perilymphe

e: Die Proteine der Perilymphe werden durch Massenspektrometrie gekoppelt mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS, Shotgun proteomics) identifiziert.

Der Proteingehalt der Proben wird über den Protein dotMETRIC Assay (G-Biosciences) bestimmt.

Parallel dazu wird die Raman-Spektroskopie (RS) eingesetzt, um die Perilymphproben zunächst ex vivo und später in vivo und nicht invasiv (Abb. 5) untersuchen zu können.

Ergebnisse

Bei 41 Patienten wurden während CI- und Vestibularisschwannom (VS)-Operationen mit translabrynthärem Zugang anhand der beschriebenen Entnahmetechnik (Abb. 1) Perilymphproben entnommen und analysiert. Es konnten Probenvolumina von 1-12µl erzielt werden, wobei das durchschnittliche Volumen der Proben 3µl beträgt (Abb. 2). Die durchschnittliche Proteinkonzentration der Perilymphproben von CI-Patienten beträgt 2,2µg/µl und von VS-Patienten 4,6µg/µl (Abb. 3). Die erhöhte Proteinkonzentration der VS-Perilymphe entspricht den Werten der Literatur [1].

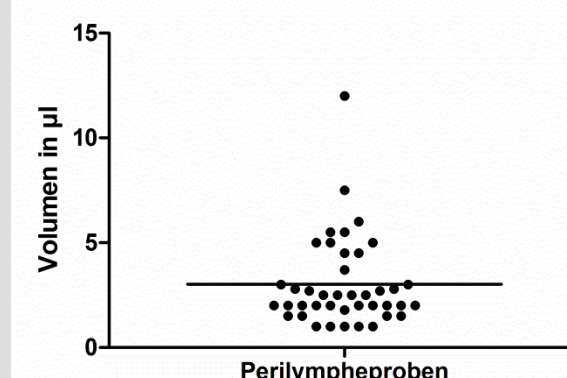


Abb. 2: Volumen der Perilymphproben, n=41

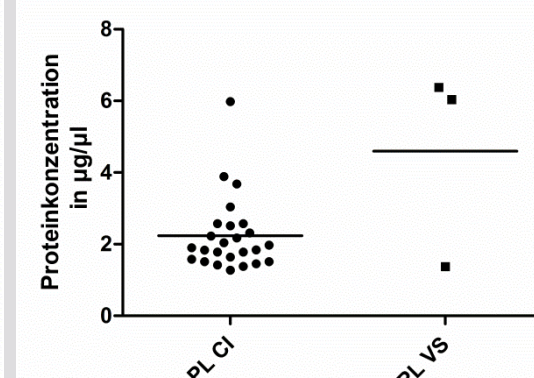


Abb. 3: Proteinkonzentration der Perilymphproben, PL CI: Perilymphe entnommen bei CI-Operationen, n=25
PL VS: Perilymphe entnommen bei VS-Operationen, n=3

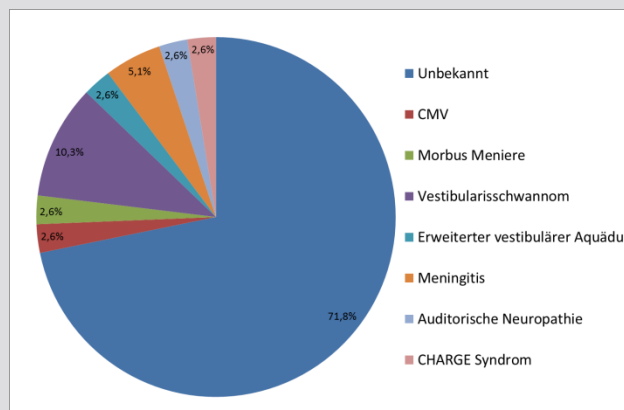


Abb. 4: Krankheitsursachen für Schwerhörigkeit der Patienten, bei denen Perilymphproben entnommen wurden.

Es wurden pro Probe durchschnittlich 269 Proteine und insgesamt 911 unterschiedliche Proteine über die *Max Quant Software* in der Perilymphe identifiziert. Erste Ergebnisse der RS belegen, dass einzelne Peptide anhand ihres Spektrums differenzierbar sind und auch die Charakterisierung von Proteingemischen aussichtsreich ist.

Schlussfolgerung

Die identifizierten Perilymphe-Proteine müssen anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen und in Bezug zu den Patientendaten (z.B. Krankheitsursache, Alter, Genetik) weiterhin genau untersucht werden, um diese Proteine hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Innenohr detailliert zu charakterisieren.

Diskussion

Die Auswertung der Daten aus der LC-MS/MS Analyse wird anhand der Daten-Analyse-Software *Max Quant* und *Perseus* durchgeführt, die auch eine quantitative Auswertung der identifizierten Perilymphe-Proteine und eine statistische Analyse der Proteinverteilung in Patientengruppen ermöglicht. Daher werden die Perilymphproben bzw. die Patienten nach folgenden Kriterien gruppiert:

1. anhand des Alters (0-18 oder >18Jahre) und des Operationstyps (CI oder VS)

2. anhand der präoperativ gemessenen audiometrischen Daten
Eine Korrelation der Proteindaten zu den Krankheitsursachen der Patienten gestaltet sich momentan schwierig, da bei 72% der bisherigen Patienten die Krankheitsursache unbekannt ist (Abb. 4). Für eine diesbezügliche Auswertung müssen zukünftig weitere Perilymphproben von Patienten mit einer gesicherten Diagnose für die Schwerhörigkeit analysiert werden.

Die etablierte Raman-spektroskopische Methode soll zukünftig in ein faseroptisches System implementiert werden, um intraoperativ in vivo Untersuchungen des Innenohrs durch die RFM zu ermöglichen (Abb. 5).

Parallel dazu werden Untersuchungen an humanen RFM aus Felsenbeinpräparationen durchgeführt. Diese liefern erste mikroskopische Aufnahmen der RFM (Abb. 6) und erste positive Ergebnisse hinsichtlich der optischen Eigenschaften und zur Durchlässigkeit der RFM für Wellenlängen, die bei der RS zum Einsatz kommen.

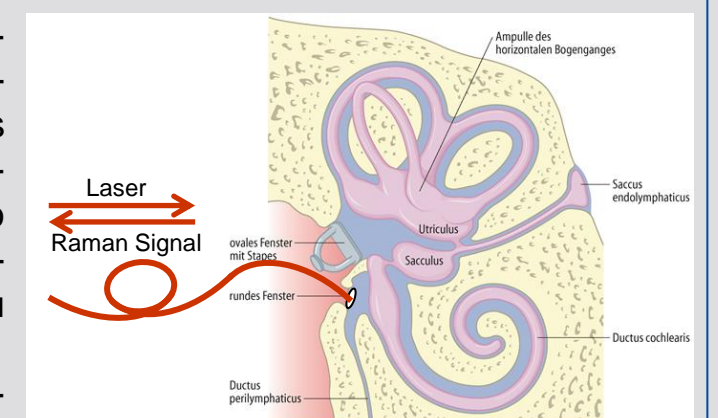


Abb. 5: Aufbau der faseroptischen nicht-invasiven Perilymphe-Diagnostik, modifiziert nach [2]

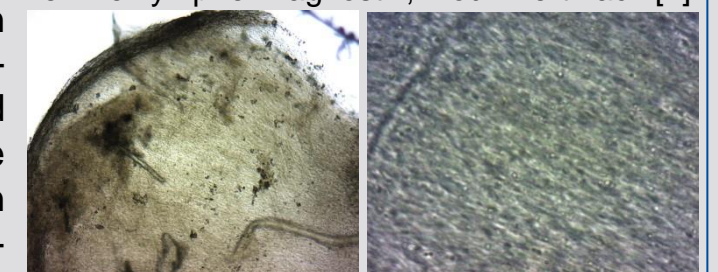


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahme einer humanen RFM, links: Vergrößerung 4x, rechts: Vergrößerung 40x

Literatur/Quellenangaben

- [1] Lysaght et al., The Proteome of Human Perilymph, J. of proteome research, 10, 3845-3851 (2011)
- [2] Lenarz, Boenninghaus; Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde; Springer-Verlag, 2012