

**Entwicklung einer
neuronalen Leitstruktur für die
biomimetische Freisetzung von
Wachstumsfaktoren im Rahmen der
cochleären Regeneration**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Inga Wille, M. Sc.

2022

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Behrens

Korreferentin: Prof. Dr. med. Athanasia Warnecke

Tag der Promotion: 09.03.2022

Danksagung

Zu Beginn möchte ich einigen Personen danken, ohne deren Hilfe das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Behrens sowohl für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, als auch für die langjährige Betreuung bedanken. Vielen Dank, dass ich innerhalb interdisziplinärer Kooperationen arbeiten und meine Ergebnisse auf unterschiedlichen Tagungen vorstellen durfte. Frau PD Dr. Athanasia Warnecke danke ich für die Übernahme des Korreferats und Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein großer Dank gilt allen Kooperationspartnern des Exzellenzclusters „Hearing4all“ für die gute Zusammenarbeit sowie viele konstruktive Diskussionen und die Möglichkeit über den „fachlichen Tellerrand“ hinauszuschauen. Vor allem Dr. Jennifer Harre danke ich für die Durchführung diverser *in vitro*-Untersuchungen und die Unterstützung bei der Auswertung. Weiterhin möchte ich Sarah Oehmichen sowie Maren Lindemann aus der AG Menzel der TU Braunschweig für die Durchführung der Zetapotential-Messungen und die Hilfe bei der Interpretation der Daten danken. Mein Dank gilt ebenfalls Saskia Zailskas und Dr. Karen Besecke für die Anfertigung zahlreicher REM-Aufnahmen. Außerdem durfte ich das Forschungspraktikum von M.Sc. Patrick Bessel und die Masterarbeit von M.Sc. Monika Seegers sowie B.Sc. Valentin Hagemann als Hiwi betreuen. Vielen Dank für diese Möglichkeit und für die unterstützenden Arbeiten, es hat mir viel Spaß gemacht.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis Behrens für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Stunden bedanken. Vor allem möchte ich mich für die tolle Zeit im NIFE bedanken, mit wunderbaren Gesprächen in den Pausen und viel Unterstützung während der Arbeitszeit. Ich habe die Zeit mit euch sehr genossen. An dieser Stelle möchte ich ebenfalls Merle Feldt, Birgit Zekoll und Simonetta Ruggieri für ihre kompetente Hilfe in vielen administrativen Fragen danken. Auch meinen Korrekturlesern Saskia Zailskas, Marvin Lietzow, Mosaieb Habib und Dr. Jennifer Harre danke ich für die Zeit, die sie sich genommen haben und die konstruktive Kritik. Hier gilt mein besonderer Dank Dr. Nina Ehlert sowie meiner Schwester Wiebke, die meine gesamte Arbeit gelesen haben.

Ich möchte meinen Freunden danken, die mir immer mehr ans Herz wachsen und mich sehr unterstützen. Vielen Dank für den Spaß und die unzähligen gemeinsamen schönen Stunden. Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken: bei meinen Eltern Ines und Horst, meiner Schwester Wiebke, meinen Großeltern Edith und Helmut und meiner Tante Karin. Vielen Dank für euren großen Einsatz und eure starke Unterstützung, eure Liebe und euren Rückhalt.

Kurzzusammenfassung

Geht der Hörsinn eines Menschen verloren, so können die Betroffenen möglicherweise nicht mehr am sozialen Leben teilnehmen. Ausgelöst durch verschiedene Faktoren, wie Traumata oder Krankheiten, kommt es bei den meisten Patienten zu einer sensorischen oder Innenohrtaubheit, bei der jedoch der Hörnerv mit den dort ansässigen Nervenzellen, den Spiralganglienneuronen (SGNs), sowie die zentrale Hörbahn intakt vorliegen. Mithilfe des sogenannten Cochlea-Implantats (CI) kann der äußere Schall aufgenommen und in elektrische Impulse umgewandelt werden, um die SGNs anschließend direkt zu stimulieren. Unter ruhigen Bedingungen ist mit dem CI bereits ein ausreichendes Sprachverständnis möglich. Befinden sich die Betroffenen jedoch in einer hohen Geräuschkulisse oder möchten sie Musik wahrnehmen, so liegen Defizite vor. Neben technischen Verbesserungen des Implantats fokussiert sich die aktuelle Forschung auf die medikamentöse Behandlung des Innenohres. Vor allem die Neuroprotektion der SGNs sowie die Regeneration ihrer Neuriten gehören zu den Zielen. Bevorzugt wäre dabei ein Wachstum der Neuriten in Richtung auf das Innenohrimplantat.

Hierzu wird im Rahmen dieser Arbeit an einer neuronalen Leitstruktur aus modifizierten, biologisch abbaubaren Polymerfasern gearbeitet, welche die nachwachsenden Neuriten zur Oberfläche der CI-Elektrode leiten soll. Beschichtet mit verschiedenen Biomolekülen der extrazellulären Matrix, wie Heparansulfat (HS) und Laminin, sowie Wachstumsfaktoren, wie dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), dient die neuronale Leitstruktur zudem als Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem, um das biologische Gleichgewicht im Innenohr wiederherzustellen. Als Basismaterial werden Fasern aus Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) und Polyglykolsäure (PGA) genutzt, welche bereits vielfältige Anwendung in der Biomedizin fanden.

Um die Immobilisierung und die Freisetzung der verschiedenen Biomoleküle gezielt zu steuern, wurden neben den unmodifizierten Fasern ebenfalls solche mit frei zugänglichen Aminogruppen auf der Oberfläche verwendet. Dazu wurden die Fasern aminolysiert, was eine Aufrauung der Oberfläche zur Folge hatte. Untersuchungen an sowohl un- als auch amino-modifizierten Fasern zeigten auf, dass diese innerhalb weniger Wochen im physiologischem Medium abgebaut und somit als degradierbare Leitstruktur eingesetzt werden können. HS konnte kovalent auf der Oberfläche immobilisiert werden, um in einem biomimetischen Ansatz BDNF anzubinden und langanhaltend und kontrolliert wieder abzugeben. In Release-Experimenten wurde von den amino-modifizierten Fasern weniger BDNF freigesetzt als von den unmodifizierten Fasern. Dies kann möglicherweise auf stärkere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Wachstumsfaktor und der Faseroberfläche zurückgeführt werden. Sowohl freigesetztes BDNF als auch der direkte Kontakt mit den BDNF-beladenen Fasern erhöhte die Überlebensrate der SGNs. Die vorliegenden Ergebnisse deuten zwar auf einen klaren neuroprotektiven Effekt des BDNFs hin, ein neuroregenerativer Effekt ist jedoch zweifelhaft, da sich die mittlere Neuritenlänge hier nicht ändert. Für eine detailliertere Betrachtung der Neuroregeneration wurden Experimente mit SGN-Strangstücken durchgeführt und es wurde, um quantitative Daten zu erhalten, die Sholl-Analyse für das hier vorliegende System weiterentwickelt. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Neuritenaussprossung durch die BDNF-tragenden Fasern vermehrt und die maximale Neuritenlänge gesteigert wird. Auch die mittlere Neuritenaktivität, welche sich aus der Anzahl sowie der mittleren Länge der Neuriten zusammensetzt, erhöht sich durch BDNF. Größere Mengen des Wachstumsfaktors verstärken die beobachteten Effekte. Ein gerichtetes Wachstum der Neuriten durch die Zugabe von BDNF war nicht zu erkennen. Auch konnte kaum eine Wirkung von HS auf die Zellen beobachtet werden. Um den nachwachsenden Neuriten in der biomedizinischen Anwendung Ankerpunkte auf ihrem Weg entlang der Fasern zur CI-Oberfläche zu bieten, sollten diese mit Laminin beschichtet werden. Vorläufige Untersuchungen hierzu deuten darauf hin, dass dies möglich ist.

Stichworte: Poly- ϵ -Caprolacton, Polyglykolsäure, Aminolyse, *drug delivery*, *brain-derived neurotrophic factor*, Heparansulfat, Laminin, neuronale Leitstruktur, Cochlea-Implantat, Neuroprotektion, Neuroregeneration

Abstract

If a person's hearing is lost, it can mean that those affected can no longer participate in social life. Triggered by various factors, like traumas or diseases, most patients experience sensory or inner ear deafness, in which, however, the auditory nerve with the nerve cells located there, the spiral ganglion neurons (SGNs), as well as the central auditory pathway are still intact. With the help of the so-called cochlear implant (CI), the external sound can be recorded and converted into electrical impulses in order to then directly stimulate the SGNs. With the CI, a sufficient understanding of language is already possible under quiet conditions. However, at a high level of background noise or at listening to music, several deficits appear. In addition to technical improvements of the implant, current research focuses on drug treatments of the inner ear. Major goals are the neuroprotection of the SGNs and the regeneration of their neurites. Preferably, growth of the neurites should be directed towards the inner ear implant.

For this purpose, within the scope of this work, a neuronal guidance scaffold made of modified, biodegradable polymer fibers is developed which should guide the regrowing neurites to the surface of the CI electrode. Coated with various biomolecules of the extracellular matrix, such as heparan sulfate (HS) and laminin, as well as growth factors such as the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), it also serves as an implant-associated drug delivery system to restore the biological balance in the inner ear. Fibers made out of poly- ϵ -caprolactone (PCL) and polyglycolic acid (PGA) are used as the base material, which have already been used in various ways in biomedicine.

In order to control the immobilization and the release of the various biomolecules in a targeted manner, fibers with freely accessible amino groups on the surface were also used in addition to the unmodified fibers. For this purpose, the unmodified fibers were aminolyzed, which resulted in a roughening of the surface. Investigations on both unmodified and amino-modified fibers showed that they degrade in a physiological medium within a few weeks and thus can be used as biodegradable guidance structure. HS could be immobilized covalently on the surface in order to bind BDNF in a biomimetic approach and to release it again in a long-lasting, controlled manner. In release experiments, less BDNF was released from the amino-modified fibers than from the unmodified fibers. This can be attributed to stronger hydrophobic interactions between the growth factor and the fiber surface. Both, released BDNF and the direct contact with BDNF-loaded fibers increased the survival rate of the SGNs. Although the available results indicate a clear neuroprotective effect of the BDNF, a neuroregenerative effect is doubtful, since the mean neurite length does not change. For a more detailed investigation on neuroregeneration, studies on SGN explants were performed and, in order to obtain quantitative data, were evaluated using the Sholl analysis which was adapted and further developed for the system investigated here. These investigations show that neurite sprouting by BDNF fibers as well as the maximum neurite length both increased. The mean neurite activity, which is composed of the number and the mean length of the neurites, is also increased by BDNF. Larger amounts of the growth factor amplify the observed effects. Directed growth of the neurites through the addition of BDNF could not be shown. Also, hardly any effect of HS on the cells could be observed. In order to provide the regrowing neurites in biomedical applications with anchor points on their way along the fibers to the CI surface, they should be coated with laminin. Initial investigations indicate in this direction show that this should be possible.

Keywords: polycaprolactone, polyglycolide, aminolysis, drug delivery, brain derived neurotrophic factor, heparan sulfate, laminin, neuronal guidance structure, cochlea implant, neuroprotection, neuroregeneration

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzzusammenfassung.....	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Allgemeine Grundlagen	6
2.1 Das Cochlea-Implantat	6
2.2 Wirkstoffe.....	19
2.2.1 Heparansulfat.....	19
2.2.2 BDNF	21
2.2.3 Laminin	23
2.3 Implantat-gestützte Neuroregeneration	26
2.4 Polymerfasern als neuronale Leitstruktur.....	31
2.4.1 PCL und PGA als Basismaterialien.....	31
2.4.2 Verarbeitung der Polymere und Nutzung als Biomaterialien.....	35
2.5 Funktionalisierung der verwendeten Polymerfasern für biomedizinische Anwendungen	38
2.5.1 Oberflächenfunktionalisierung	38
2.5.2 Anbindung und Freisetzung der Wirkstoffe	38
2.5.2.1 Heparansulfat.....	40
2.5.2.2 BDNF	43
2.5.2.3. Laminin	45
3 Materialien und Methoden	47
3.1 Synthesen und Zellkulturexperimente.....	47
3.1.1 Amino-Modifizierung	47
3.1.2 Degradation der Polymerfasern.....	49

3.1.3 Immobilisierung von Heparansulfat.....	49
3.1.4 Immobilisierung von BDNF	51
3.1.5 Immobilisierung von Laminin	53
3.1.6 Freisetzungsexperimente mit beladenen Fasern.....	54
3.1.7 Qualitativer Nachweis der Anbindung von HS.....	56
3.1.8 Qualitativer Nachweis der Anbindung von Laminin und BDNF.....	57
3.1.9 Quantifizierung der freigesetzten Mengen an HS und Laminin durch Fluoreszenz	58
3.1.10 Quantifizierung der angebundenen sowie freigesetzten Mengen an BDNF über ELISA	59
3.1.11 Probenpräparation für die <i>in vitro</i> -Untersuchungen	60
3.2 Physikochemische Charakterisierungsmethoden	61
3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie.....	61
3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie	62
3.2.3 Infrarotspektroskopie	62
3.2.4 UV / Vis- und Fluoreszenzspektroskopie	63
3.2.5 Stickstoff-Elementaranalyse	63
3.2.6 Dynamische Lichtstreuung	63
3.2.7 Zetapotential-Messung.....	64
3.2.8 Nachweis freier Aminogruppen unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen.	66
3.2.9 Kolorimetrischer Nachweis des angebundenen Heparansulfats unter Verwendung von Toluidinblau.....	67
3.3 Biochemische Charakterisierungsmethoden	68
3.3.1 ELISA	68
3.3.2 <i>In vitro</i> -Untersuchungen zum neuroprotektiven und –regenerativen Effekt von BDNF mit Spiralganglienzellen.....	69
3.3.3 <i>In vitro</i> -Untersuchungen zum neuroprotektiven und –regenerativen sowie richtungsweisenden Effekt von BDNF mit Spiralganglionstrangstücken.....	71
4 Ergebnisse und Diskussion	78
4.1 Polymerfasern	78

4.1.1 Charakterisierung der unmodifizierten und amino-modifizierten Polymerfasern	78
4.1.2 Degradation der Polymerfasern	84
4.1.3 Zusammenfassung	91
4.2 Dekoration der Polymerfasern mit dem Glykoprotein der extrazellulären Matrix: Heparansulfat	92
4.2.1 Immobilisierung von Heparansulfat	92
4.2.2 Stabilität des angebundenen Heparansulfats	110
4.2.3 Zusammenfassung	127
4.3 Entwicklung eines Freisetzungssystems für BDNF	130
4.3.1 Immobilisierung von BDNF auf den Polymerfasern	130
4.3.2 BDNF-Freisetzung von den Polymerfasern	134
4.3.3 Neuroprotektiver und -regenerativer Effekt von BDNF-beladenen Fasern	138
4.3.4 Zusammenfassung	174
4.4 Ausrüstung der Polymerfasern mit Laminin als neuronales Adhäsionsmolekül	178
4.4.1 Immobilisation von Laminin auf den Polymerfasern	179
4.4.2 Stabilität des angebundenen Laminin	184
4.4.3 Zusammenfassung	186
5 Zusammenfassung und Ausblick	188
6 Literatur	199
7 Anhang	224
7.1 Chemikalienverzeichnis	224
7.2 Zusatzinformationen	225
7.2.1 Inkubationsversuche mit fluorescentem HS	225
7.2.2 Zuordnung aller IR-Schwingungsbanden der Polymerfasern zu den funktionellen Gruppen	227
7.2.3 Zetapotential der verschiedenen Nanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes	228
7.2.4 Numerische Daten der Zellkulturuntersuchungen zum neuroprotektiven Effekt von BDNF gegenüber SGN	229
7.2.5 Zellkulturaufnahmen zur Methodenetablierung der Sholl-Analyse	230

7.2.6 Ausführungen zur Berechnung der mittleren Neuritenaktivität mittels Sholl-Analyse	231
7.2.7 Original-Zellkulturaufnahmen der ausgewerteten Sholl-Analyse.....	232
7.3 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....	234
7.4 Lebenslauf.....	235

Abkürzungsverzeichnis

A	Spaltdurchmesser
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
aCSF	engl.: <i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AFNB	4-Azido-1-fluoro-2-nitrobenzol
BDNF	engl.: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	engl.: <i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i>
CAFPAS	engl.: <i>common audiological functional parameters</i>
CI	Cochlea-Implantat
cAMP	engl.: <i>cyclic adenosine monophosphate)-responsive element-binding protein</i>
d	Durchmesser
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	engl.: <i>extracellular matrix</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EF	Enrofloxacin
EHS	engl.: <i>engelbreth-holm-swarm</i>
Em	Emission
ELISA	engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EP	Endolymphatisches Potential
ERK	engl.: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	und Andere
EtOH	Ethanol
Ex	Anregung

FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
FGF-2	engl.: <i>fibroblast growth factor-2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	fluoreszent
Gab1-Protein	engl.: <i>Grb2 associated binding protein</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GL	Glycolid
GlcA	β -D-Glucuronsäure
GlcA(2S)	β -D-Glucuronsäure-2-O-sulfatiert
GlcN	β -D-Glucosamin
GlcNAc	β -D-Glucosamin-N-acetyliert
GlcNAc(6S)	β -D-Glucosamin-N-acetyliert-6-O-sulfatiert
GlcNS	β -D-Glucosamin-N-sulfatiert
GlcNS(3S)	β -D-Glucosamin-N-sulfatiert-3-O-sulfatiert
GlcNS(3,6S)	β -D-Glucosamin-N-sulfatiert-3,6-O-sulfatiert
GlcNS(6S)	β -D-Glucosamin-N-sulfatiert-6-O-sulfatiert
GS	Gentamicinsulfat
HBSS	engl.: <i>Hanks ' Balanced Salt Solution</i>
HS	Heparansulfat
Hz	Hertz
I	Intensität
IdoA	α -L-Iduronsäure
Ido(2S)	α -L-Iduronsäure-2-O-sulfatiert
IEP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot
kov.	kovalent
LAM	Laminin
LF	Levofloxacin
LbL	engl.: <i>Layer-by-Layer</i>

MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NCAM	engl.: <i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF	engl.: <i>nerve growth factor</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NPs	Nanopartikel
NPSNPs	Nanoporöse Silica Nanopartikel
n.s.	nicht signifikant
NT	Neurotrophin
NT-3	engl.: <i>neurotrophic factor-3</i>
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCL	Poly-ε-Caprolacton
PGA	Polyglykolsäure
PEDOT	Poly-3,4-ethylendioxythiophen
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
PLA	Polylactid
PLLC	Poly(L-Lactid-Co-Caprolacton)
PLGA	Polylactid-Co-Glycolid
PMMA	Polymethylmetacrylat
PolySia	Polysialinsäure
[poly(TMC)]	Poly(1,3-trimethylcarbonat)
PS	Polystyrol
PSLBs	Polystyrol-Latex-beads
PSS	Polystyrolsulfonat
r	Radius
RBITC	Rhodamin B Isothiocyanat
REM	Rasterelektronenmikroskopie

rhEGF	engl.: <i>recombinant human epidermal growth factor</i>
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
R	Widerstand
RITC	Rhodaminisothiocyanat
RT	Raumtemperatur
SCN	Isothiocyanat
SGN	Spiralganglienneuron
SGNs	Spiralganglienneurone
SGZ	Spiralganglienzellen
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
t	Zeit
TB	Toluidinblau
TDMCA	Tridodecyl-methylammonium-chlorid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethyorthosilicat
TGF- β	engl.: <i>transforming growth factor-β</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins
V	Volumen
VEGF	engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>
Vis	engl.: <i>visible</i>
T _g	Glasübergangspunkt
T _m	Schmelzpunkt
Trk	Tyrosin-Kinase
U _{str}	Strömungspotential
UV	Ultraviolett
WHO	engl.: <i>World Health Organization</i>
ϵ	Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
λ	Wellenlänge

η	Viskositätskoeffizient des Lösungsmittels
ψ	elektrisches Potential
v	Wanderungsgeschwindigkeit
μ	Mikro
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
ξ / ZP	Zeta-Potential
$^{\circ}C$	Grad Celsius
Δp	Druckdifferenz
$\epsilon \times \epsilon_0$	Dielektrische Konstante der Elektrolytlösung

1 Einleitung

Der Hörsinn ermöglicht es den Menschen, mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten. Die Welt wird für sie erlebbar. Es werden Eindrücke und Informationen aufgenommen, indem Gesprächen zugehört oder Musik sowie Geräusche wahrgenommen werden. Zudem schützt der Hörsinn vor möglichen Gefahren.^[1] Geht dieser Sinn verloren, so kann dies dazu führen, dass sich die Betroffenen aus dem sozialen Leben zurück ziehen.^[2] Laut der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) leben auf diesem Planeten heutzutage 278 Millionen Menschen mit einer starken Schwerhörigkeit, sodass sie weder an einer Unterhaltung teilnehmen noch Musik wahrnehmen können.^[3]

In einem gesunden Ohr gelangt der Schall zunächst durch die Ohrmuschel in den äußeren Gehörgang und wird über Hammer, Amboss und Steigbügel mithilfe des Trommelfells an das Innenohr weitergeleitet. Die nun in Bewegung versetzte Flüssigkeit in der Cochlea dient der Anregung der dort ansässigen Sinneszellen, der sogenannten Haarzellen. Sie leiten den entstandenen Reiz als elektrisches Signal an die zugehörigen Neurone, die Spiralganglienneurone (SGNs), weiter. Anschließend gelangt der Reiz über den Hörnerv an die entsprechende Region im Gehirn, wo ein Höreindruck generiert wird.^[4-6] Bei einem Hörverlust leidet die Mehrzahl der Betroffenen (>95 %) an einer sensorischen oder Innenohrtaubheit,^[7] welche entweder vererbt oder aber durch verschiedene Krankheiten sowie schwerwiegende Kopfverletzungen oder Traumata ausgelöst werden kann.^[8] Hierbei sind die inneren Haarzellen geschädigt, wohingegen der Hörnerv mit den SGNs sowie die zentrale Hörbahn in einem intakten Zustand vorliegen. Es können aber die ausgefallenen Sinneszellen mithilfe einer elektronischen Reizprothese, dem sogenannten Cochlea-Implantat (CI), umgangen werden, um den Patienten zu neuem Hören zu verhelfen.^[7] Die ersten tauben Patienten wurden bereits 1957 operiert,^[9-11] wobei das CI aber erst in den 1970er Jahren seine breite klinische Anwendung fand. Während anfangs lediglich eine Elektrode zur Reizübertragung implantiert wurde,^[12] führten anschließende Studien dazu,^[7] dass heutzutage CI-Elektroden mit um die 22 einzelnen Platinkontakten ihre Anwendung finden, um die Qualität der erzeugten Hörleistung zu verbessern. Umgeben von einer Siliconmatrix können sie einzelne Nervenstränge ortsaufgelöst elektrisch anregen.^[7,13-15] Laut einer Hochrechnung des deutschen Ärzteblatts von 2013 wurden allein in Deutschland jährlich 3.000 CIs implantiert.^[16] Während den Menschen hierdurch ein gesteigertes Sprachverständnis unter ruhigen Bedingungen ermöglicht wird, ist es für CI-Träger immer noch schwer, sich in geräuschvollen Umgebungen („Cocktailparty-Situation“) zurechtzufinden oder Musik adäquat wahrzunehmen.^[7,17]

Aufgrund dessen wird heutzutage in den verschiedensten Bereichen am CI geforscht. Neben der Diagnostik^[18,19] soll ebenfalls die Signalverarbeitung^[20,21] optimiert werden. Zudem

spielen hierbei auch neuartige Materialien^[22–24] sowie die medikamentöse Behandlung des Innenohres eine wichtige Rolle.^[25–27] In diesem Zusammenhang ist die fortschreitende Degeneration der SGNs nach der Ertaubung zu nennen, welche sowohl auf eine unzureichende Stimulation als auch auf die vorliegende pathologische Situation zurückzuführen ist.^[15,28–30] Durch eine effektive Bereitstellung von Medikamenten sowie neurotrophen Substanzen kann das Überleben der SGNs erhöht und deren Funktion wieder hergestellt sowie ein gesundes Milieu in der Cochlea erzeugt werden.^[31–33] Zudem ist der Abstand zwischen den stimulierenden Kontakten der CI-Elektrode und den SGNs aufgrund der anatomischen Situation recht groß. Aufgrund dieser Lücke müssen elektrische Signale mit höherer Intensität verwendet werden und es kommt zu einer räumlichen Streuung des Stimulationssignals.^[34] Dies führt zu einer Überlappung der adressierten SGNs und reduziert die fokussierte neuronale Stimulation, was wiederum in einer geringeren Frequenzauflösung resultiert.^[35,36] Wenn nun die aus den SGNs hervorgehenden Neuriten diese Lücke überwinden, um in engem Kontakt mit der Elektrode zu stehen, könnte eine spezifischere elektrische Stimulation erreicht werden. Die aktuelle Forschung konzentriert sich daher auf die Verbesserung des Überlebens und der Funktionalität der SGNs sowie auf die Optimierung des Elektroden-Nerven-Kontakts.^[28,31,37]

Es wurde gezeigt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), an der Aufrechterhaltung und Entwicklung der SGNs in der Cochlea beteiligt sind.^[15,28–30,38] Weiterhin ist bekannt, dass ein Mangel an BDNF-Signalwegen zu fortschreitendem Hörverlust führt^[39] und dass bei schwerhörigen Mäusen reduzierte cochleäre BDNF-Spiegel zu beobachten sind.^[40] Darüber hinaus wird BDNF von den Haarzellen in der sich entwickelnden Cochlea und später von den SGNs sowie Unterstützerzellen bereitgestellt.^[39,41] Somit ist eine langfristige Bereitstellung physiologischer BDNF-Mengen eine vielversprechende Maßnahme nach einer Cochlea-Implantation.^[42,43] Die langanhaltende Freisetzung von BDNF ermöglichte bereits das Nachwachsen peripherer Hörnervenfaser^[26,27] sowie eine erhöhte Überlebensrate der SGNs *in vivo*. Dies wurde durch die elektrische Stimulation der CI-Elektrode unterstützt.^[44]

Es gibt mehrere Herausforderungen, wenn die Abgabe von BDNF an das Innenohr in Betracht gezogen wird. Neben systemischen Therapien, bei denen u. a. ein eingeschränkter Blutfluss zum Innenohr beachtet werden muss,^[45] weisen auch Darreichungsformen durch miniosmotische Pumpen Limitierungen auf.^[26,46–48] Die regelmäßige Befüllung des Reservoirs erhöht z. B. das Infektionsrisiko.^[49] Auch gen- sowie zellbasierte BDNF-Freisetzungen^[50–53] können durch die Zelltoxizität sowie unkontrollierbare Expression neurotropher Faktoren ein Risiko darstellen.^[54] Somit können Implantat-assoziierte *Drug Delivery*-Systeme eine effektivere und sicherere Alternative bieten. Erste experimentelle Ansätze zur physikalischen (z. B. durch Modifikation der Topographie)^[55–57] oder chemischen Funktionalisierung der Oberfläche der CI-Elektrode^[15,58] zur lokalen Wirkstoffabgabe wurden bereits beschrieben

und im Rahmen des Exzellenzcluster „Hearing4all“ durchgeführt.^[59,60] Neben Hydrogelen^[61] haben sich auch Mikrosphären^[62] und Nanopartikel^[27,35,59,63,64] als geeignete Träger für neurotrophe Wirkstoffe etabliert, obwohl nicht alle erfolgreich an der Implantatoberfläche befestigt werden konnten.^[35]

Um die anatomische Position der Implantatelektrode zu verbessern und sie näher an den SGNs zu platzieren, wurden bereits verschiedene Konzepte getestet. Neben vorgekrümmten sowie modiolaren Umarmungselektroden^[23] wurden aktivierende Hydrogele entwickelt, um die Elektrode zum Modiolus hin zu verbiegen.^[24] Um die SGNs jedoch in direkten Kontakt mit den stimulierenden CI-Elektroden zu bringen, müsste das Neuritenwachstum angeregt werden. Ein Nervenleitgerüst könnte diese anschließend zu den einzelnen Kontakten führen. Trotz der fortschreitenden Entwicklungen von neuronalen Leitkanälen für periphere Nerven^[65] sowie regenerativen Gerüsten zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen ist die Datenlage zur Leitung von regenerierten Neuriten der SGNs gering. Hier zeigten lediglich dezellularisierte Pferde-Halsschlagadern eine vielversprechende Wirkung auf die Neuritenregeneration.^[36] Weiterhin wurde an hohlen Calciumphosphat-Nanopartikel geforscht, welche angebracht auf der CI-Elektrode Wachstumsfaktoren freisetzen.^[35] Zudem kann eine topografische Modifikation der Elektrodenoberfläche,^[55] u. a. mit bestimmten Mustern,^[57] die Anhaftung sowie das Wachstum der Neuriten fördern. Bei den genannten Ansätzen wird den Neuriten jedoch keine Unterstützung auf ihrem Weg durch das flüssigkeitsgefüllte Lumen der *scala tympani* geboten. Ein BDNF-freisetzendes Hydrogel konnte den nachwachsenden Neuriten hier zwar eine günstige Umgebung, jedoch keine Führung zur CI-Oberfläche gewährleisten.^[66]

Somit wird im Rahmen dieser Arbeit sowie als Teil des Exzellenzclusters „Hearing4all“ der Ansatz verfolgt, ein neuronales Leitsystem aus modifizierten, biologisch abbaubaren Polymerfasern zu entwickeln, welche die nachwachsenden Neuriten zur Oberfläche des CIs leiten. Hierbei sollen die Fasern senkrecht auf die CI-Oberfläche aufgebracht und mit verschiedenen Biomolekülen beschichtet werden (siehe Abbildung 1). Die Fasern, unbehandelt sowie amino-modifiziert, dienen zunächst als Trägermaterial für die extrazelluläre Matrixkomponente Heparansulfat (HS). Dieses soll wiederum zur Abgabe eines neurotrophen Wachstumsfaktors genutzt werden. Hier wird sich in der Arbeit auf das bereits beschriebene BDNF konzentriert. Eine mögliche Alternative bietet NT-3 (*Neurotrophic Factor 3*), welches ebenfalls neuroprotektiv sowie regenerativ wirkt.^[41,43,44,54,67] Um den Neuriten Ankerpunkte auf ihrem Weg entlang der Fasern zur Oberfläche des CIs zu bieten, sollen diese mit dem Adhäsionsprotein Laminin (LAM) beschichtet werden.^[68-71] Zusätzlich können noch weitere Wirkstoffe in das System integriert werden, welche innerhalb dieser Arbeit jedoch keine Berücksichtigung finden. So ist es denkbar, die Fasern in Zukunft ebenfalls mit der anti-adhäsiven Polysialinsäure (PolySia) auszustatten, sodass die Neuriten auf dem Weg zu den Elektrodenkontakten des CIs lediglich an der Leitstruktur entlang

wachsen, anstatt vollständig dort zu verbleiben.^[72] Weiterhin kann die CI-Elektrode selbst mit dem neuronalen Adhäsionsmolekül L1CAM beschichtet werden, sodass die Neuriten letztendlich auf dessen Oberfläche anwachsen und eine ausreichende sowie differenzierte elektrische Signalübertragung erhalten wird.^[73–75] Nach dem Abbau der Polymerfasern fördert die Stimulation der CI-Elektrode das Anhaften der Neuriten.^[76–78]

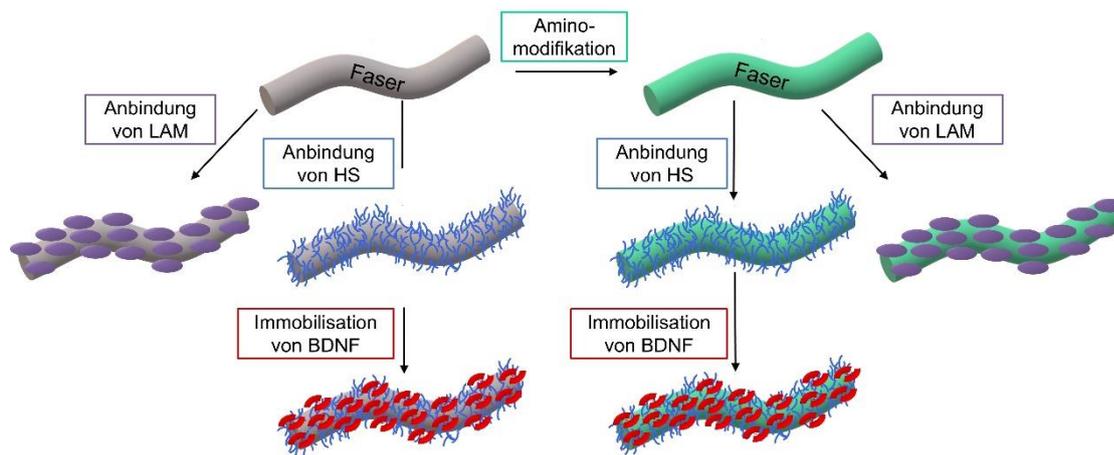


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Oberflächenfunktionalisierung der PGA/PCL-Fasern (grau), welche ebenfalls die Aminomodifikation (grün) beinhaltet. Neben Laminin (lila) werden die Fasern ebenfalls mit HS beschichtet (blau). Dieses dient als Trägermatrix für den Wachstumsfaktor BDNF (rot).

Während ein nanofaseriges Gerüst als vielversprechende Strategie zur Regeneration von Hörnerven bereits untersucht wurde,^[79] weisen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polymerfasern Durchmesser im Bereich von 100 μm auf, um den Neuriten als stabiles Trägermaterial zu dienen. Hierzu wurde ein langfristig biologisch abbaubares Nahtmaterial, bestehend aus Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) und Polyglykolsäure (PGA), welche in den letzten Jahrzehnten im Fokus der biomedizinischen Forschung standen, umfunktioniert.^[80,81] Neben ihrer Verwendung als degradierbares Nahtmaterial^[82–84] dienen diese Fasern bereits als *Drug Delivery*-System zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren während der Wundheilung oder wurden im Bereich des *Tissue Engineerings* als künstliche extrazelluläre Matrix (ECM, *extracellular matrix*) eingesetzt.^[85–87] Hierbei wurden die Wirkstoffe entweder bereits während des Herstellungsprozesses in die Fasern eingearbeitet^[85] oder anschließend physikalisch/chemisch angebunden.^[86,87]

Um auf der Oberfläche der Fasern eine natürliche Umgebung nachzuahmen, wurden diese zunächst mit Heparansulfat (HS), einem Glykosaminoglykan der ECM, beschichtet. Im Allgemeinen ist HS für seine wundheilenden und gerinnungshemmenden Eigenschaften sowie als Analgetikum bekannt.^[88] Nach Implantationen erhöht es sowohl die Biokompatibilität als auch die Gewebereaktionen.^[89,90] In biomedizinischen Anwendungen wirkt HS als regenerativer Faktor, da es als Bestandteil der natürlichen ECM die Bildung neuen Gewebes unterstützen

kann.^[88,91,92] Es ist bekannt, dass HS Wachstumsfaktoren binden, stabilisieren,^[93] vor Denaturierung sowie proteolytischem Abbau schützen kann^[94–96] und die (Langzeit-)Freisetzung^[97] sowie Präsentation des Biomoleküls für die Zellen kontrolliert.^[98–101] Während nach Literaturberichten HS selbst das Überleben sowie die Neuritenaussprossung der SGNs unterstützt, fördert die gleichzeitige Behandlung von SGN-Explantaten mit HS und dem bereits beschriebenen BDNF ein verstärktes Neuritenwachstum.^[102]

Der Wirkstoff Laminin, welcher über spezifische Stellen ebenfalls mit HS Bindungen eingehen kann,^[68,69] gehört zu den Glykoproteinen^[103,104] und wurde bereits im Rahmen des CIs als Elektrodenbeschichtung eingesetzt. Hier förderte es zum einen das Überleben der SGNs und verstärkte zum anderen den Auswuchs der Neuriten.^[105] Es ist ebenfalls in der Lage, Wachstumsfaktoren zu speichern und ihre Verteilung sowie Präsentation für die jeweiligen Zellen zu regulieren.^[68] Daneben agiert Laminin als Adhäsionsprotein auf Neurone.^[68–71] Um das Wachstum der Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur zu unterstützen, sollen die Fasern daher ebenfalls mit Laminin ausgestattet werden. Mit Laminin beschichtete *Polymer Scaffolds* erhöhten bereits die neuronale Adhäsion sowie die Regeneration der Neuriten.^[106]

Somit sind die Wirkstoffe BDNF, HS und Laminin geeignet, um aufgebracht auf den Polymerfasern sowohl das Überleben als auch die Regeneration der SGNs zu fördern. Entlang der neuronalen Leitstruktur sollen die Neuriten schließlich zum Implantat geführt werden, um später auf diesem anzuwachsen. Durch eine spezifische elektrische Anregung soll auf diese Weise der Höreindruck mittels des CIs optimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Polymerfasern zunächst einer Aminolyse unterzogen, um den Einfluss auf die spätere Anbindung der Biomoleküle zu untersuchen. Anschließend soll herausgefunden werden, inwieweit die Fasern mit HS beschichtet werden können. Als Trägermatrix für Wachstumsfaktoren wird untersucht, wie sich HS auf die Anbindung sowie Freisetzung von BDNF auswirkt. Hierzu wird eine Langzeitfreisetzung des BDNFs (105 d) von den Fasern untersucht. Außerdem werden der neuroprotektive sowie regenerative Effekt von HS und BDNF gegenüber den SGNs *in vitro* getestet. Abschließend erfolgen Untersuchungen, inwieweit sich die Polymerfasern mit Laminin als Adhäsionsmolekül für nachwachsende Neuriten ausstatten lassen.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Das Cochlea-Implantat

Im Jahr 2021 leben laut der WHO ca. 430 Millionen Menschen auf diesem Planeten, die an einer Hörbehinderung leiden. Es wird geschätzt, dass sich diese Zahl bis 2050 auf über 700 Millionen Betroffene ausweitet.^[107] 278 Millionen dieser Menschen leiden sogar an einer sehr starken Schwerhörigkeit. Diese macht es ihnen nicht möglich, normale Aktivitäten, wie z. B. eine Unterhaltung zu führen oder Musik zu hören, auszuüben.^[3] Das eingeschränkte Hörvermögen kann dazu führen, dass sich die betroffenen Personen aus dem sozialen Leben zurückziehen.^[2] In wenigen Fällen ist die Schwerhörigkeit, die bis zur Taubheit reichen kann, vererbbar, meistens sind jedoch externe Faktoren der Auslöser. Zum einen kann der Fötus vor der Geburt durch Medikamente sowie durch eine Viruserkrankung der Mutter (z. B. Röteln) geschädigt worden sein. Andererseits kann die Gehörlosigkeit während der Geburt durch Sauerstoffmangel oder Geburtstraumen ausgelöst werden. Häufige Gründe für einen späteren Hörverlust sind neben Schädelbrüchen und Gehirnhautentzündungen auch chronische Mittelohrentzündungen, Virusinfektionen wie Mumps oder Masern sowie Hörtraumata.^[8] Die meisten Patienten (>95 %) leiden an einer sensorischen Taubheit, welche auch Innenohrtaubheit genannt wird. Hierbei sind neben den äußeren auch die inneren Hörsinneszellen, die sog. Haarzellen, geschädigt bzw. ausgefallen, wobei in den meisten Fällen der Hörnerv sowie die zentrale Hörbahn intakt bleiben. Die ausgefallenen Sinneszellen können hier mithilfe einer elektronischen Reizprothese, dem Cochlea-Implantat, umgangen werden, um den Patienten zu neuem Hören zu verhelfen. Das CI ist in der Lage, den Schall in elektrische Impulse umzuwandeln und diese anschließend an die noch intakten Nervenenden zu leiten. Taubgeborenen Kindern wird frühzeitig ein CI eingesetzt, um den Spracherwerb, gestützt auf ein ausreichendes Hörvermögen, zu generieren.^[7] Im Gegensatz dazu ist bei Erwachsenen, welche erst nach abgeschlossenem Spracherwerb ertaubt sind, auch noch nach vielen Jahren eine Implantation möglich.^[108] Trotz dessen ist eine zeitnahe Insertion des Implantats nach dem Hörverlust entscheidend, um einer fortschreitenden Rückbildung der Nervenenden infolge mangelnder Stimulation entgegenzuwirken.^[28]

Die Anfänge des CIs gehen auf ALESSANDRO VOLTA zurück. Trotz bestehendem Hörvermögen versuchte er mithilfe von zwei Drähten im äußeren Gehörgang einen elektrischen Höreindruck bei sich selbst zu erzeugen.^[109] Jedoch erst Anfang des 20. Jahrhunderts kamen ernsthafte Bemühungen auf, das funktionell ausgefallene Innenohr durch elektrische Impulse zu ersetzen.^[110] ERYIS und DJOURNO operierten dazu im Jahr 1957 ihren ersten gehörlosen Pati-

enten. So konnten sie mittels Magnetfeldänderungen Spannungsimpulse in einer intern liegenden Drahtspule induzieren, sodass die ausgelösten Ströme über Wechselwirkung mit den vorliegenden Neuronen einen Höreindruck generierten. Es konnten jedoch nur einzelne Wörter sowie Geräusche wahrgenommen werden.^[9-11] Indes können ZÖLLNER und KEIDEL als „Pioniere“^[7] für ein sprachvermittelndes Implantat beschrieben werden. Sie wählten einen anderen Weg als ihre Vorgänger und führten 1963 eine Elektrode durch das runde Fenster in die Hörschnecke (Cochlea) ein, um ertaubten Patienten wieder zu neuem Hören zu verhelfen. Neben einer transkutanen Signalübertragung installierten sie intracochleäre Platinelektroden (Anzahl: 20-100) mit einer Frequenzverteilung zwischen 300-3000 Hz. Somit konnten schon in den 1970er Jahren die ersten Langzeitimplantate mit tragbaren Sprachprozessoren eingesetzt werden.^[111] Eine breite klinische Anwendung fand das Implantat jedoch erst durch HOUSE und URBAN, welche demnach als „Väter des CIs“^[7] bekannt sind. Die implantierten Elektroden enthielten jeweils einen stimulierenden Kontakt.^[12] In Europa wurde ebenfalls ein einkanaliges Implantat entwickelt sowie transplantiert. In Wien arbeiteten in den 70er Jahren BURIAN, HOCHMAIR-DESOYER und HOCHMAIR an dem CI, welches entweder eine extracochleäre Kugelelektrode oder aber einen intracochleären Elektrodenträger enthält.^[112] Demgegenüber versorgten SIMMONS und CLARK die ersten Patienten in den 1980er Jahren mit mehrkanaligen CI-Elektroden, um einen besseren Höreindruck zu vermitteln. Bis heute ist diese Technik überlegen.^[7,113,114]

Normaler Hörvorgang. Um die Funktionsweise sowie Wirksamkeit des CIs besser nachvollziehen zu können, wird im Folgenden zunächst der Hörvorgang eines gesunden Ohres erläutert. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau des Ohres, welches in drei Bereiche eingeteilt werden kann. Bei Normalhörenden gelangt der Schall zunächst in das Außenohr, bestehend aus Gehörmuschel, Gehörgang und Trommelfell. Hierbei bilden sowohl die Ohrmuschel als auch der Gehörgang einen Schalltrichter, der bei mittleren und hohen Frequenzen schallverstärkend wirkt.^[5] Es wird hier von einer Luftleitung gesprochen.^[4] Die nach innen trichterartig ausgezogene Membran des Trommelfells wird nun in Schwingung versetzt und wandelt auf diese Weise die Schallwellen in mechanische Energie um. Seine Bewegungen werden auf die im Mittelohr, in der Paukenhöhle, liegenden Gehörknöchelchen übertragen. Hammer (*malleus*), Amboss (*incus*) und Steigbügel (*stapes*) haben hier die Aufgabe, die niedrige Impedanz der Luft an die hohe Impedanz der darauffolgenden Innenohrflüssigkeit anzupassen. Durch die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen sowie den Flächengrößenunterschied zwischen Trommelfell und ovalem Fenster wird der Schall verstärkt. Über das ovale Fenster kann die Flüssigkeit im Innenohr in der Cochlea in Bewegung versetzt werden.^[4-6]

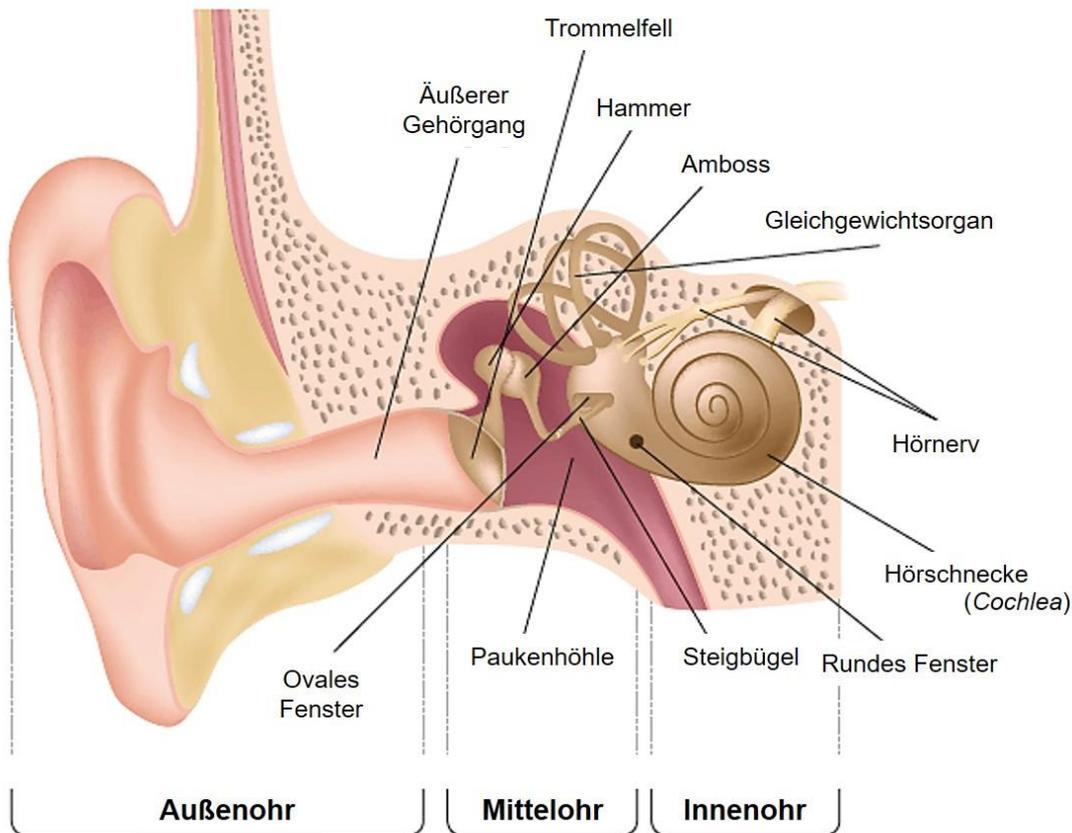


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des menschlichen Ohres. Der Schall wird über das Außenohr aufgenommen und mithilfe der Gehörknöchelchen im Mittelohr an das Innenohr übertragen, welches den Schall in elektrische Signale umwandelt (Nach Lit.^[115]).

Die Cochlea bildet neben dem Gleichgewichtsorgan einen entscheidenden Bereich des Innenohres und dient der Transduktion von Schallwellen. Sie ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Anatomisch gesehen gleicht sie einem Schneckenhaus, welches sich mit einer Gesamtlänge von ca. 33 mm zweieinhalbmal um die Schneckenmitte, den sog. *modiolus*, windet. Hier befindet sich der Hörnerv.^[5] Weiterhin ist die Cochlea aus drei übereinander liegenden Gängen aufgebaut. Der obere Gang wird als *scala vestibuli* (Vorhoftreppe) und der untere Gang als *scala tympani* (Paukentreppe) bezeichnet. Der dazwischen liegende Gang (*scala media* oder *ductus cochlearis*) bildet die sogenannte cochleäre Trennwand.^[5] Durch das *helicotrema* (Schneckenloch) am *apex cochlearis* (Schnecken spitze) stehen der obere sowie untere Gang miteinander in Verbindung.

Dringt nun ein Schallsignal in das Ohr ein, so schwingt der Steigbügel im nachgiebigen ovalen Fenster, welches mit der *scala vestibuli* verbunden ist, im Wechsel in das Innenohr hinein und heraus. Dabei wird die inkompressible Lympheflüssigkeit in der Cochlea, die Perilymphe, in Bewegung versetzt, sodass die leicht bewegliche cochleäre Trennwand ausgelenkt und dadurch die Perilymphe in der *scala tympani* ebenfalls verdrängt wird. Diese kann ausweichen, da sie über ein rundes, nachgiebiges Fenster mit dem luftgefüllten Mittelohr verbunden ist.

Anschließend erfolgt die Umkehrung der Bewegung und somit die entgegengesetzte Auslenkung der cochleären Trennwand.^[4] Aufgrund der zahlreichen Schallwellen ergibt sich eine ständige Auf- und Abwärtsvibration der Trennwand. Eine Wanderwelle bildet sich in der Hörschnecke aus, welche an einem frequenzspezifischen Ort entlang der Trennwand ein Maximum ausbildet (Frequenzdispersion).^[7] An der Basis der Cochlea werden hohe Frequenzen um die 10000 Hz und an der Spitze der Hörschnecke niedrige Frequenzen um 500 Hz verarbeitet.^[6]

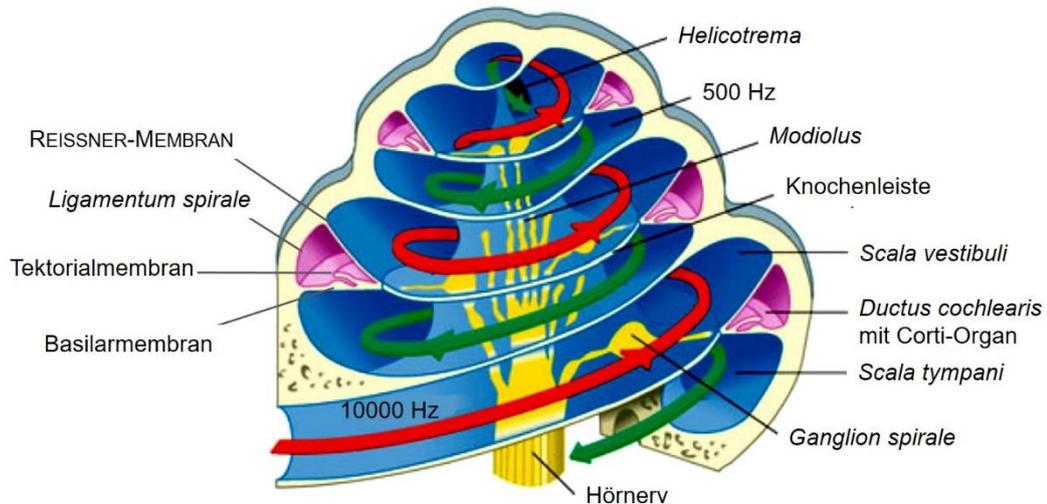


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Cochlea im Querschnitt. Es ist die aufgeklappte Schnecke mit Perilymphbewegung entlang der *Scala tympani* und *Scala vestibuli* sowie die Frequenzabbildung zu sehen. In der cochleären Trennwand befindet sich das Corti-Organ (Nach Lit.^[6]).

Die cochleäre Trennwand besitzt einen dreieckigen, komplexen Aufbau und ist zur *scala vestibuli* hin durch die für Ionen durchlässige REISSNER-MEMBRAN und zur *scala tympani* hin durch die Basilarmembran abgegrenzt. Sie wird als gallertartig beschrieben^[5] und besteht aus zwei Schichten. Während die obere Schicht, welche in den *ductus cochlearis* hineinzeigt, dünn und kompakt vorliegt, befindet sich darunter eine zweite fibröse Schicht. Sie ist aus in Querrichtung gebündelten Fasern zusammengesetzt. Diese sind unter dem Lichtmikroskop zu erkennen.^[116] Laut aktuellen Studien liegt als Hauptprotein in der faserigen Struktur Kollagen Typ II vor.^[117] Die Basilarmembran spannt sich in der Cochlea über eine Länge von ca. 33 mm auf. Während sie am ovalen Fenster mit einer Breite von 0.04 mm am stärksten gespannt vorliegt, beträgt die Dicke der Membran am *helicotrema* 0.5 mm. Hier ist sie am wenigsten gespannt.^[5] Die äußere Wand des *ductus cochlearis*, das *ligamentum spirale*, ist für die Bildung der Lympheflüssigkeit in diesem Bereich zuständig, der Endolymphe.^[6] In diesem Raum befindet sich das für den Hörsinn notwendige Corti-Organ, welches in Abbildung 4 sowohl schematisch (links) als auch in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme (rechts) dargestellt ist. Auf der Basilarmembran (grün) befinden sich die Stützzellen, welche ihrerseits wiederum die Hörsinneszellen tragen. Sie besitzen an ihrem oberen Ende feine Sinneshärchen

(Stereozilien), weswegen sie als Haarzellen bezeichnet werden. Im menschlichen Ohr befinden sich eine Reihe innerer (rot) und drei Reihen äußerer (blau) Haarzellen, wobei erstere für die Aufnahme des Hörsignals und letztere lediglich für dessen Verstärkung verantwortlich sind. Die Haarzellen werden von einer kollagenhaltigen Membran, der Tektorialmembran (lila), überspannt, welche die Spitzen der längsten Stereozilien der äußeren Haarzellen berührt.^[4-6]

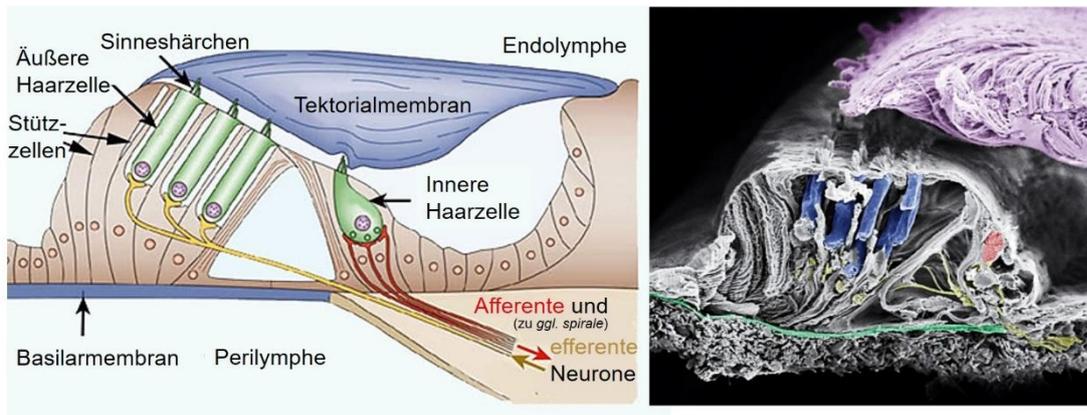


Abbildung 4: Links: Schematischer Aufbau des Corti-Organs (Nach Lit.^[118]). Rechts: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen Corti-Organs.^[119] Es besteht aus inneren (rot) sowie äußeren (blau) Haarzellen, deren Stereozilien oben an der Tektorialmembran (lila) verankert sind. Auf der anderen Seite sind die Haarzellen mit den Spiralganglienneuronen (gelb) verknüpft.

Während des Hörvorgangs bewegen sich die Tektorialmembran und das Corti-Organ relativ zueinander, wenn die cochleäre Trennwand ausgelenkt wird. Hierdurch bewegen sich somit auch die Sinneshärchen der äußeren Haarzellen im Wechsel nach außen sowie nach innen (Deflektion). Die Sinneshärchen der inneren Haarzellen werden womöglich durch die Bewegung der Flüssigkeit zwischen Tektorialmembran und Corti-Organ mit ausgelenkt. Dargestellt ist dieser Vorgang schematisch in Abbildung 5. Jede Haarzelle besitzt an ihrem oberen Ende ca. 80-100 Sinneshärchen, welche von innen nach außen in Reihen mit zunehmender Größe angeordnet sind. Hierbei sind die Spitzen der jeweils niedrigen Stereozilien mit den jeweils längsten Stereozilien über eine fadenartige Verbindung, den *tip link*, verknüpft. Im Ruhezustand weisen die inneren Haarzellen ein Ruhemembranpotential von -40 mV und die äußeren Zellen eines von -70 mV auf. Die umgebende Endolymphe in der *scala media* hat durch ihre extrem hohe Kaliumionenkonzentration (K^+ -Ionen) gegenüber den übrigen extrazellulären Räumen ein ständiges Potential von etwa $+85$ mV, das endolymphatische Potential (EP). Bei Deflektion der Stereozilien werden die Transduktionskanäle am oberen Ende der Haarzellen geöffnet und somit die hohe Potentialdifferenz der angrenzenden Räume wirksam, welche bis zu 155 mV betragen kann. Durch den darauffolgenden Einstrom der positiv geladenen Kaliumionen ändert sich das Membranpotential der Haarzelle. Es entsteht eine Depolarisation und somit das Sensorpotential. Somit wird das ursprünglich mechanische Signal in ein elektrisches Signal umgewandelt, sodass von einer mechanoelektrischen Transduktion gesprochen werden kann.^[4,5,7] Die Repolarisation der Zelle wird durch die entgegen gerichtete Verlagerung der

Stereozilienbündel sowie den Ausstrom der Kaliumionen zur Perilymphe hin erreicht.^[4,7] Bei den inneren Haarzellen werden während des Auftretens des Sensorpotentials an den unteren Enden afferente Neurotransmitter (Glutamat) aus Vesikeln freigesetzt. Grund hierfür ist der Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration, welche durch das Sensorpotential kontrolliert wird. Diese wechselwirken anschließend mit den afferenten Synapsen des Hörnervs, den Spiralganglienneuronen (engl.: *spiral ganglion neurons*, SGN) aus dem *ganglion spirale*, von denen 90 % an den basalen Enden der inneren Haarzellen liegen.

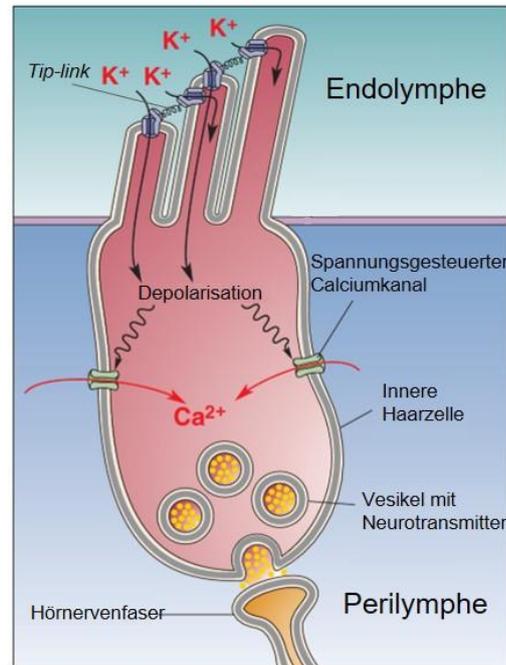


Abbildung 5: Depolarisation einer Haarzelle. Durch den Eintritt von K^+ wird die Haarzelle depolarisiert und es strömen Ca^{2+} Ionen ein, die zur Ausschüttung von Neurotransmittern führen. Diese diffundieren anschließend zur Hörnervenfaser (nach Lit.^[120]).

Der letzte Schritt löst in der Nervenzelle ein Nervenaktionspotential aus, welches in das zentrale Hörsystem zur weiteren Verarbeitung geleitet wird.^[4] Die Dendriten der SGNs sind entlang der Basalmembran ausgebreitet, ihre Zellkörper bündeln sich in der Schneckenachse. Von hier aus ziehen ihre Axone gebündelt als Hörnerv durch den inneren Gehörgang zum Hörkern im Hirnstamm.^[7]

Hörprozess mit einem CI. Liegen Schädigungen im Bereich des Innenohres vor, so kann das CI die Funktion der ausgefallenen Haarzellen überbrücken, um den jeweiligen Patienten zu neuem Hören zu verhelfen. Der Hörnerv muss in diesem Fall jedoch intakt sein. Schematisch ist die Funktionsweise des eingesetzten CIs im defekten Ohr in Abbildung 6 illustriert.

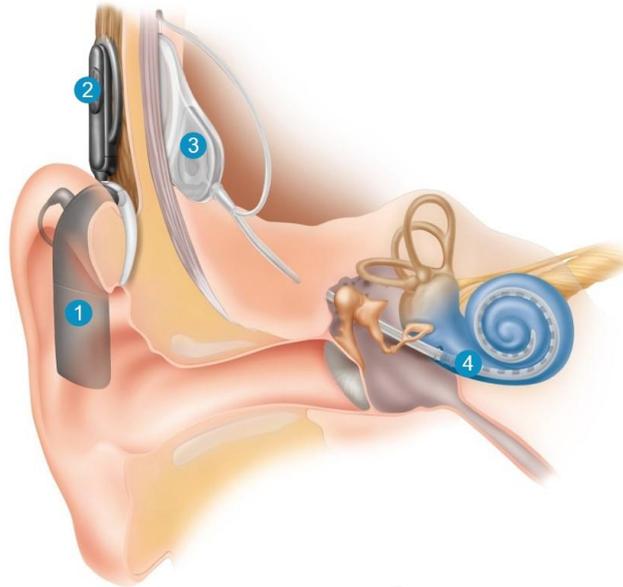


Abbildung 6: Darstellung der Funktionsweise des CIs im defekten Ohr (Nach Lit.^[13]). (1) externer Soundprozessor, (2) Sendespule, (3) unter der Haut liegendes Implantat, (4) Cochlea-Elektrode

Direkt hinter dem Ohr ist der externe Soundprozessor angebracht, welcher in diesem Fall die Schallwellen mit einem Mikrophon aufnimmt und sie in digitale Signale umwandelt (1). Diese werden gefiltert, es werden Störgeräusche entfernt und es wird eine Aufteilung in Frequenzblöcke vorgenommen.^[121] Zudem beinhaltet der Soundprozessor zusätzlich die Stromversorgung für das gesamte Implantat. Nach der Umwandlung leitet die Sendespule (2) die Signale als Radiowellen oder durch Induktion an das unter der Haut liegende Implantat weiter (3), welches im Schädelknochen verankert ist. Anschließend dekodiert das Implantat die ankommenden Signale und transferiert sie in elektrische Impulse. Diese werden an den Elektrodenträger in der Cochlea gesendet (4). Zuletzt stimulieren die Implantatelektroden die SGNs in der Cochlea entsprechend der Frequenz-Positions-Beziehung orts aufgelöst.^[122] Das Signal wird anschließend über den Hörnerv an das Gehirn übermittelt und dort weiter verarbeitet.^[7,13,14]

Unterstützend hierzu sind in Abbildung 7 die einzelnen Bestandteile des CIs dargestellt.

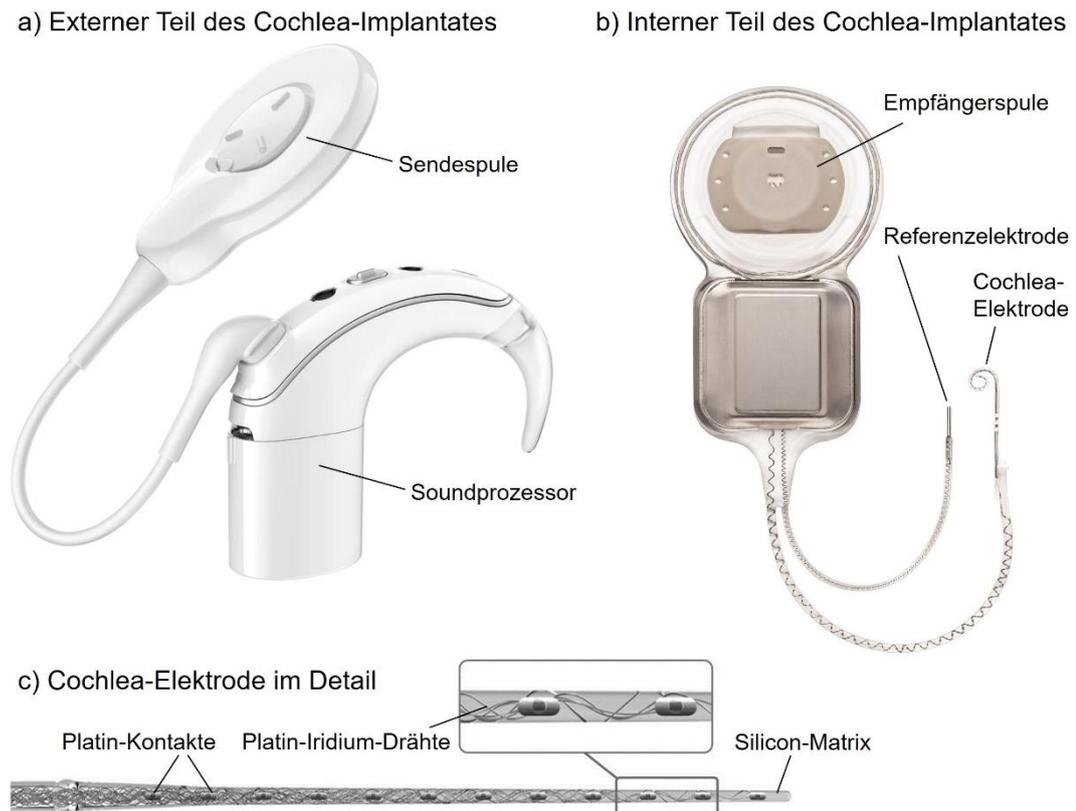


Abbildung 7: Komponenten des CIs: Soundprozessor mit Sender (a)^[123], Empfänger-Implantat mit Elektroden (b)^[124] sowie die ausgerollte Cochlea-Elektrode (c)^[125].

Die Elektrode besteht aus 22 Platin-Kontakten, welche jeweils über einen mit Teflon beschichteten Platin / Iridium-Draht (Platinanteil: 90 % / Iridiumanteil: 10 %) angesteuert werden. Platin weist eine hohe Ladungsspeicherkapazität sowie eine hohe chemische und mechanische Stabilität auf. Weiterhin zeugt es von einer guten Biokompatibilität, starken Korrosionsbeständigkeit und Langzeitstabilität. Die Nervenenden sollen so über langen Zeitraum mit gleichbleibender Qualität elektrisch angeregt werden. Die Elektroden sind von einem biostabilen Siliconmantel umgeben, welcher nicht nur isolierend wirkt, sondern auch die in der Hörschnecke benötigte Flexibilität bietet.^[15] Somit kann sich die Elektrode in der *scala tympani* einrollen und sich der Form der Cochlea anpassen,^[7,126] was in Abbildung 8 zu sehen ist. Je nach Art der Erkrankung bzw. Ertaubung können Elektroden mit unterschiedlicher Länge eingesetzt werden. Kürzere bzw. nur teilweise eingeführte Elektroden dienen dazu, das Resthörvermögen im apikalen Teil der Cochlea zu nutzen, da eine Ertaubung meist zunächst im basalen Teil der Hörschnecke auftritt.^[7,14,127]

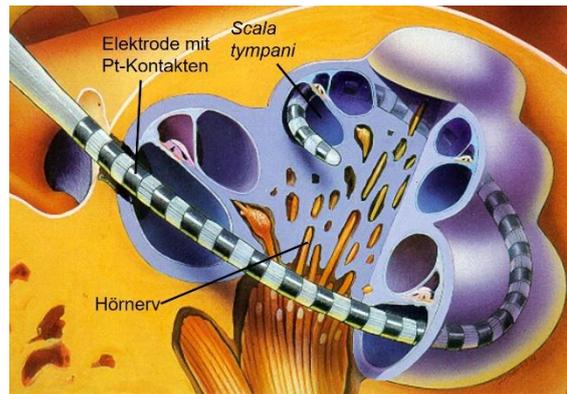


Abbildung 8: Intracochleäre Elektrodenlage des Implantats (nach Lit.^[128]). Die CI-Elektrode liegt lateral positioniert in der Hörschnecke vor.

Wie in der Abbildung zu sehen, ist die Elektrode lateral in der Cochlea positioniert, was die Wechselwirkung mit den Nervenzellen erschwert.^[28] Zusätzlich degenerieren die Spiralganglienneuronen nach dem Verlust der inneren Haarzellen, weil sie einerseits nicht mehr ausreichend durch Glutamat angeregt werden. Dieses wird eigentlich von den Haarzellen freigesetzt und aktiviert die Synapsen der SGN. Andererseits werden die SGNs nicht mehr ausreichend durch neurotrophe Faktoren, wie BDNF und NT-3, geschützt (neurotropher *support*).^[49,129,130] Diese werden in einem gesunden Ohr von den Haarzellen sowie Stützzellen produziert.^[48,131] Die Degeneration führt von der Rückbildung der Neuriten bis zum Verlust von Zellkörpern und ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Mit fortschreitender Degeneration erhöht sich das Ausmaß der Schädigung. Außerdem wird diese durch den Verlust von Stützzellen noch weiter verstärkt.^[15,28–30,132]

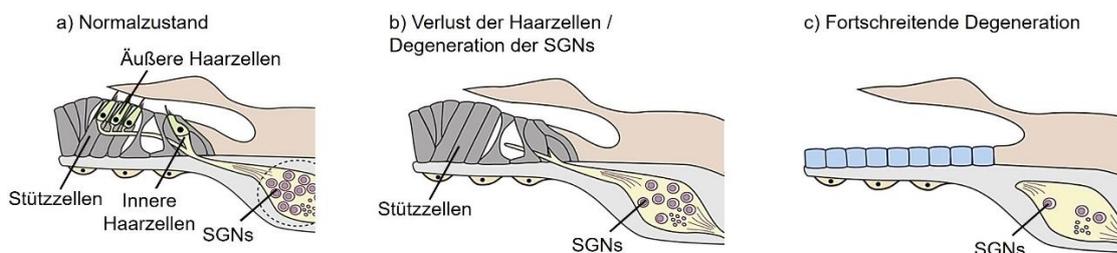


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Corti-Organs in einem gesunden Ohr sowie nach Verlust der Haarzellen in Abhängigkeit vom Fortschritt der Schädigung (nach Lit.^[28]).

In einem CI-implantierten Ohr besteht die Möglichkeit, dass Neurone durch die elektrische Stimulation zur Produktion von endogenen Faktoren angeregt werden. Weiterhin können verbliebene sensorische Zellen ebenfalls endogene Faktoren produzieren. In Einzelfällen kann so der Degeneration der SGNs entgegengewirkt werden.^[76–78] Generell ist der Abstand der Nervenenden zu der CI-Elektrode jedoch relativ groß, sodass sie nicht optimal stimuliert werden können, um die empfangenen Signale anschließend weiterzusenden.^[15,28–30] Der Abstand zwischen den SGNs und dem CI in der *scala tympani* beträgt ca. 2.3 mm.^[133] Zusätzlich sind sie

durch eine knöchernen Wand voneinander getrennt. Hinzu kommt, dass sich isolierendes Gewebe in dem vorliegenden Zwischenraum bilden kann.³⁾ Infolgedessen können einzelne Platinkontakte lediglich einen größeren Bereich von Nervenenden simultan anregen. In diesem Zusammenhang ist die Leistungsfähigkeit des Implantats durch die Streuung des zu übertragenden Signals begrenzt.^[17,134,135] Die Streuung ist dabei proportional zur Stromdichte, welche bei zunehmendem SGN-Elektrodenabstand ansteigen muss.^[28,136] Durch die Überlagerung von einzelnen Reizen zu einem verbreiterten und unspezifischen Reiz kann ein fehlerhaftes Signal im Nerv ausgelöst werden. Resultierend hieraus wird der Höreindruck ungenau, sodass trotz 22 vorhandenen Elektroden nur circa acht verschiedene Wahrnehmungskanäle angesteuert werden können. Die Forschung zeigt jedoch, dass mindestens 20 unterschiedliche Kanäle für einen ausreichenden Höreindruck in einer geräuschvollen Umgebung nötig wären. Für die Wahrnehmung von Musik sind 30 Kanäle erforderlich.^[7] Um zwischen verschiedenen Sprechern unterscheiden zu können, benötigt man ebenfalls mehr Kanäle.^[17] Im Gegensatz dazu besitzt ein gesundes Ohr in etwa 3400 natürliche auditorische Kanäle.^[136] Somit ist es heutzutage von großem Interesse, durch gezielte Forschung am CI die Anzahl an nutzbaren Kanälen zu erhöhen, um die Leistungsfähigkeit des Implantats zu verbessern.^{[134][15]}

Forschung am CI. Heutzutage wird in den verschiedensten Bereichen des CIs geforscht, um die Hörqualität für dessen Nutzer zu optimieren. Neben der Verbesserung und Beschleunigung individueller Diagnostiken wird auch an der Signalverarbeitung bzw. am Sprachprozessor sowie an unterschiedlichen Modellen zur Voraussage der Hörleistung mithilfe eines CIs gearbeitet. Ein Großteil der Forschung befasst sich mit verschiedenen Stimulationsmethoden bzw. der Verbesserung des Elektroden-Nervenkontakts, welche auch die Biointegration des Implantats beinhaltet. Aufgrund dessen werden die zuletzt genannten Aspekte im Rahmen dieser Arbeit fokussiert behandelt, wobei zusätzlich Einblicke in die weiteren Forschungsgebiete erfolgen.

Im Bereich der Diagnostik soll beispielsweise die Positronemissionstomographie als bildgebendes Verfahren die Aktivität des Nervengewebes sowie die Signalübertragung durch Botenstoffe im Gehirn unterstützen. Genutzt werden hierfür radioaktive Biomarker. Ziel ist es, die Pathophysiologie von Hörstörungen besser zu verstehen, um dadurch das Hörvermögen mittels Implantat besser wieder herstellen zu können.^[18,19] Weiterhin wird in der Signalverarbeitung bzw. in den Sprachprozessoren daran gearbeitet, die erhöhte Lautheitswahrnehmung von Schwerhörigen zu reduzieren. Mit binauralen breitbandigen Lautheitsmessungen wurde das lautheitsbasierende Anpassungskonzept „trueLOUDNESS“ entwickelt, um individuelle Unterschiede in der Wahrnehmung zu berücksichtigen und entsprechende Verstärkungswerte im Prozessor anzuwenden.^[20,21] Zusätzlich wird an dem neu entwickelten Hörgeräteprozessor KAVUAKA geforscht, um bei geringen Batterielaufzeiten und kleinem Bauformat das Hör-

vermögen zu verbessern. Dies geschieht mithilfe einer durch komplexe Algorithmen optimierten Prozessarchitektur sowie einer individuell anpassbaren *System-on-Chip*-Technologie.^[137,138] Um Ärzten sowohl bei der Diagnostik als auch bei der Behandlung nach einer CI-Operation helfend zur Seite zu stehen, dienen computergestützte Modelle zur Voraussage der späteren Hörleistung. So soll es möglich sein, mithilfe der Forschung an dem Modellkonzept CAFPAS („*Commin Audiological Functional Parameters*“) mit nur wenigen aussagekräftigen Zwischenvariablen eine kompakte und universelle Darstellung der audiologischen Befunde aus unterschiedlichen Datensätzen zu erreichen.^[139]

Wie bereits erwähnt, wird in der heutigen Forschung ein großer Fokus auf die Optimierung des Elektroden-Nerven-Kontaktes gelegt, um schon in der Cochlea die Hörleistung zu verbessern. Dies beinhaltet sowohl die Erhöhung der Überlebensrate der dort ansässigen Neuronen, den SGN, sowie deren Regeneration. Das Ziel ist die bessere Wechselwirkung mit den Elektroden des CIs.^[28,31,37] Es wurden schon vielfach Untersuchungen angestellt, um die Elektrode näher an dem *Modiolus* der Cochlea zu platzieren, sodass sich der Abstand zu den zu erreichenden Nervenenden verringert. Ein Ansatz beinhaltet die Nutzung beweglicher Teflonstreifen.^[22] Zudem wird an vorgeformten Elektroden geforscht, die sich von allein um den *Modiolus* legen^[23] sowie an quellenden Hydrogelen, welche die Elektrode um die Schneckenmitte biegen sollen.^[24] Weiterhin arbeiten Forscher daran, die Größe der intercochleären Elektrode zu minimieren, um einerseits Verletzungen während der Insertion des Implantats entgegenzuwirken. Andererseits soll das Wachstum von Bindegewebe,^[140] welches den Abstand zu den SGNs erhöht und die Übertragung des elektrischen Signals verschlechtert, verringert werden.^[15] Hierbei kommt die Chip-Technologie als eine Möglichkeit in Frage. Während sich der elektrische Schaltkreis direkt auf der Elektrodenanordnung befindet, sollen die aktiven elektronischen Elemente auf der Elektrode in der Cochlea platziert werden.^[15,141] Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz elektrisch leitender Polymere als Elektrodenmaterial sowie -beschichtung dar, sodass neben einer erhöhten Anzahl an einzelnen Elektroden auch die Flexibilität der gesamten Elektrode optimiert werden kann, um die Wechselwirkung mit den SGNs zu verbessern. Ein vielversprechender Kandidat stellt hier PEDOT (Poly-3,4-ethylendioxythiophen) dar.^[142] Die geringe Langzeitstabilität und Biokompatibilität sowie mangelnde elektrische Übertragungseigenschaften wirken einer klinischen Anwendung vieler leitfähiger Polymere jedoch oftmals noch entgegen.^[143–146] Flexible Elektroden aus biokompatiblen sowie chemisch stabilen Polyimiden werden dahingegen schon erfolgreich im Rahmen des CIs eingesetzt.^[147,148] Trotz dieser Fortschritte sind weitere Optimierungen notwendig, um die Leistung der Cochlea-Elektrode zu verbessern. Nach STÖVER *et al.*^[15] gibt es verschiedene Möglichkeiten, um die Elektrode zur Verbesserung des Elektroden-Nervenkontaktes zu modifizieren. Außerdem kann hierdurch die Einheilung des Implantats nach dessen Insertion verbessert werden sowie störendes Gewebewachstum vermieden werden. Hierbei kann die Oberfläche entweder

physikalisch (Veränderung der Topographie), chemisch (Beschichtung der Oberfläche), biologisch (Zellbesiedlung der Oberfläche) oder biochemisch (Beschichtung mit Signalproteinen) verändert werden. In diesem Zuge kann ein lokales *Drug Delivery*-System auf der Elektrodenoberfläche etabliert werden.^[15] Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine nanoporöse Modifizierung der Platinoberflächen sowohl die elektrische Signalübertragung als auch die Anlagerung der Neurone fördert.^[56] Zusätzlich reduziert die Mikro-Strukturierung der Platin- sowie Siliconoberfläche das Anwachsen von signalstörenden Fibroblasten.^[140] Den gleichen Effekt zeigt zudem die chemische Beschichtung des Implantats mit Polymeren. Hierbei kann die Überlebensrate sowie Neuritenausprossung der SGNs verbessert werden.^[149] Biodegradierbare Polymere können zudem als *Drug Delivery*-System für aktive Substanzen verwendet werden.^[150] Beispielsweise rief die Freisetzung von Dexamethasonphosphat aus den mit PEDOT-beschichteten Elektroden eine entzündungshemmende Wirkung in Ratten hervor. Weiterhin waren hierdurch in Elektrodennähe eine höhere Anzahl von Neuronen vorzufinden.^[25] Um Entzündungen / Infektionen entgegenzuwirken, erscheint die antimikrobielle Oberflächenmodifizierung mit Silber-Nanopartikeln vielversprechend. Nachdem sie in verschiedenen Dosen an das Innenohr verabreicht wurden, können sie Krankheitserreger, entweder allein oder in Kombination mit verschiedenen Antibiotika-Formulierungen, abtöten.^[151–153] Außerdem können genetisch modifizierte Zellen / Stammzellen als Verbindungselement zwischen der Elektrode und den SGNs dienen. In Tierexperimenten konnte nicht nur die Regeneration der Spiralganglienzellen, sondern auch eine bessere Effektivität des Implantats gezeigt werden.^[15,154] Obwohl eine gen- sowie zellbasierte Freisetzung des Wachstumsfaktors BDNF die Überlebensrate der SGNs *in vitro* erhöhte,^[50,52,53,155] müssen eine mögliche Zelltoxizität sowie unkontrollierbare Freisetzungen von neurotrophen Faktoren beachtet werden.^[54] Insgesamt stellt die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren, wie BDNF und NT-3, ein zentrales Thema für das Überleben bzw. die Regeneration der SGNs dar.^[29–31,33,156] In Meerschweinchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Überlebensrate von SGNs durch die anhaltende Freisetzung von BDNF im Innenohr erhöht wurde. Gleichzeitig erfolgte eine elektrische Stimulation der Neurone durch die eingesetzte CI-Elektrode.^[26,27] Zudem konnte die Freisetzung von BDNF in ertaubten Meerschweinchen das Nachwachsen peripherer auditorischer Nervenfasern fördern.^[44] Hierbei erweisen sich Implantat-assoziierte *Drug Delivery*-Systeme bzw. die biochemische Beschichtung der Implantatoberfläche mit den neurotrophen Faktoren als sicherer und effektiver. Unterschieden werden kann hier zwischen affinitäts- sowie reservoirbasierter Methoden zur Bereitstellung der Wachstumsfaktoren.^[62] Erstere beschreibt die nicht-kovalente Wechselwirkung der freizusetzenden Substanz mit einem Material.^[157] Diese Systeme imitieren die Wechselwirkungen in der extrazellulären Matrix.^[158] Bekannte Systeme arbeiten mit dem Glykosaminoglykan Heparin oder ihrem Verwandten Heparansulfat, welche die Anlagerung sowie Stabilität von Wachstumsfaktoren beeinflussen, um darüber die Freisetzung

der Stoffe zu regulieren.^[93–96,158–160] Die Reservoirbasierten Systeme werden dahingegen definiert als poröse Materialien, bei denen Diffusionsmechanismen die Freisetzungsraten bestimmen.^[161] Neben Hydrogelen^[61] konnten auch Mikrosphären^[62] sowie Nanopartikel^[27,35,59,64,162] als mögliche Träger neurotropher Faktoren für die Anwendung im Innenohr entwickelt werden. Es hat sich allerdings gezeigt, dass nicht alle von ihnen erfolgreich auf die Oberfläche des Implantats aufgebracht werden konnten.^[35] Eine Kombination der beiden Methoden stellt die Arbeit von TAN *et al.* dar.^[27] Hier wurden nanoporöse PGA-Partikel zunächst mit Heparin und anschließend mit BDNF beschichtet. Es konnte gezeigt werden, dass das freigesetzte BDNF die Überlebensrate von Neuronen in der Cochlea ertaubter Meerschweinchen effektiv erhöhte. Demgegenüber stehen konventionelle Methoden, um das Innenohr mit Neurotrophen zu versorgen. Da dieser Aspekt jedoch keine entscheidende Rolle für die vorliegende Arbeit spielt, wird er nur der Vollständigkeit halber dargestellt. Eine Möglichkeit stellt hier die systemische Gabe der Wachstumsfaktoren dar. Diese ist jedoch streng limitiert durch einen begrenzten Blutfluss zum Innenohr sowie das Überqueren der Blut-Hirn-Schranke.^[45] Eine andere Möglichkeit bieten osmotische Pumpen, die BDNF oder NT-3 in das Innenohr freisetzen.^[26,46–48] Damit ein solches System jedoch nicht mehr begrenzt ist, muss sein Reservoir periodisch wieder aufgefüllt werden. Somit erhöht sich auch das Risiko für Infektionen im Innenohr. Dieses ist ohnehin durch den permanenten Zugang der Pumpe zur Cochlea gegeben.^[49] Trotz dieser Fortschritte ist bis heute kein direkter Kontakt zwischen den Nervenenden und den Platinkontakten des CIs möglich, um die Reizweiterleitung des elektrischen Signals zu optimieren. Hierfür müssten die Neuriten der SGNs so stimuliert werden, dass sie mithilfe von Leitstrukturen zum Implantat hin wachsen. Im Zuge der erfolgreichen Forschung an Nervenleitschienen^[65] konnten schon dezellularisierte Halsschlagadern von Pferden eine neuronale Regeneration von SGNs hervorrufen.^[36] *In vitro* Versuche zeigten, dass die Neuriten von SGN-Explantaten auf diesen Strukturen aussprossen und an diesen entlang wachsen. Des Weiteren soll die anatomische Lücke zu den auditorischen Neuronen durch GDNF geschlossen werden, welches aus Calciumphosphat-Nanosphären, aufgebracht auf dem CI, freigesetzt wird.^[35]

Mithilfe topographisch modifizierter Elektrodenkontakte war eine gute Anlagerung der Ganglion-Neuriten möglich.^[55] Deren Wachstum kann mittels bevorzugter Muster gefördert werden.^[57] In der Absicht, dass die Neuriten der SGNs den flüssigkeitsgefüllten Raum in der *Scala Tympani* überqueren, um zu den Elektrodenkontakten zu gelangen, wird an einem BDNF-freisetzenden Hydrogel gearbeitet.^[66]

Auch in der Arbeitsgruppe BEHRENS wird auf vielfältige Weise daran geforscht, dass CI zu optimieren. Nanoporöse Kohlenstoffmaterialien als Elektrodenbeschichtungen sollten nicht nur die Impedanz des CIs verringern, sondern zusätzlich als Freisetzungssystem für Medika-

mente dienen.^[163] Als Alternative wurde zudem poröses Platin als Beschichtungssystem untersucht.^[164] Darüber hinaus lag der Fokus auf der Forschung an nanoporösen Silica Nanopartikeln, welche mit ihrer großen Oberfläche ebenfalls als Medikamentenreservoir dienen sollen. Aufgebracht auf das Implantat oder eingebettet in die Siliconmatrix soll auf diese Weise der Elektroden-Nervenkontakt verbessert werden.^[165,166] Als Kombination zweier Systeme wurde untersucht, inwieweit die Nanopartikel in die Hohlräume des porösen Platins integriert werden können, um die Eigenschaften des Implantats zu optimieren^[167,168]

2.2 Wirkstoffe

Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, kann die Kombination einer CI-Elektrode mit passenden Wirkstoffen den Elektroden-Nerven-Kontakt und damit die Hörleistung optimieren.^[15] Somit werden im folgenden Kapitel verschiedene Biomoleküle sowie ihre Funktionen vorgestellt, um im Rahmen des CIs eingesetzt zu werden.

2.2.1 Heparansulfat

Eine Option, um die Implantation einer Cochlea-Elektrode und ihre spätere Funktion zu optimieren, stellt die Nutzung des Wirkstoffes Heparansulfat (HS) dar.

Biologische Funktion. Als Molekül der extrazellulären Matrix (EZM) dient HS der Regeneration verschiedener Zellen und konnte sich laut Studien schon positiv auf das Überleben sowie die Regeneration der SGNs auswirken.^[88,102] In Säugetieren kommt es als biosynthetisiertes Proteoglykan (Protein mit HS-Seitenketten) vor, woraus sich viele weitere Funktionen ergeben. Hier ist es meist auf Zelloberflächen und in der ECM zu finden.^[88] Sowohl die Zelladhäsion^[169] als auch die Regulierung des Zellwachstums, der Zellproliferation^[170,171] sowie der Entwicklungsprozesse^[171] gehören zu seinen Aufgaben. Es unterstützt zudem die Blutgerinnung^[172] und Angiogenese.^[173,174] In biomedizinischen Anwendungen agiert HS als regenerativer Faktor, um die Bildung neuen Gewebes zu fördern, indem es die Struktur der ECM aufbaut.^[88,91] Vergangene Studien demonstrierten die erhöhte Biokompatibilität und verbesserte Gewebereaktion nach der Implantation von Kollagen-HS-Matrizen in Ratten.^[89,90] Es gilt als zentraler Baustein in Bezug auf Virenangriffe^[175,176] und Tumormetastasen.^[177,178] Seine Wechselwirkungen mit Proteinen sind vielfältig. HS ist in der Lage, selbst Wachstumsfaktoren anzubinden^[93] und diese schlussendlich auf die Zelloberfläche aufbringen zu können.^[179,180] Es stabilisiert^[93] die Wachstumsfaktoren und bewahrt sie vor Denaturierung und proteolytischer Degradation.^[94–96,181] In der ECM gelten HS-Proteoglykane als Reservoirs für Wachstumsfaktoren und erhöhen ihre langlebige Bioverfügbarkeit.^[160] So konnte der Wachstumsfaktor BDNF schon über einen längeren Zeitraum biologisch aktiv von Oberflächen freigesetzt werden, die HS-ähnliche Wirkstoffe enthalten.^[97] Außerdem vermittelt HS Internalisierungs-

prozesse von Proteinen^[182] und reguliert ihren Transport durch die Basalmembran hindurch,^[181] indem stabile Komplexe zwischen HS / Protein gebildet werden. Dieser Vorgang konnte schon für den bFGF gezeigt werden.^[100,101] Die gleichzeitige Behandlung von SGNs mit HS und BDNF fördert eine erhöhte Neuritenaussprossung.^[102]

Vorkommen und Aufbau. Entdeckt wurde der Wirkstoff HS zunächst als Verunreinigung in dem strukturell sehr ähnlichen Heparin. Aufgrund dessen wurde ihm ursprünglich der Name Heparitinsulfat zugewiesen.^[183] Die zwei Substanzen gehören zusammen mit Chondroitinsulfat, Dermatansulfat sowie Keratansulfat der Familie der Glykosaminoglykane (GAG) an, welche saure Polyanionen darstellen.^[184,185] HS selbst besitzt in PBS bei einem pH-Wert von 7.4 ein Zetapotential von -10 mV.^[186] Zudem handelt es sich bei den GAGs um lineare Polysaccharide, welche aus sich wiederholenden Disaccharid-Bausteinen von Uronsäure-(1 \rightarrow 4)-D-Glukoseamine aufgebaut sind. Hierzu zählen α -L-Iduronsäure (IdoA) bzw. β -D-Glucuronsäure (GlcA), welche zudem in einer 2-O-sulfatierten Form vorliegen können (Ido(2S) und GlcA(2S)). Diese werden mit den β -D-Glucosaminen (GlcN) kombiniert, die sowohl N-sulfatiert (GlcNS) als auch N-acetyliert (GlcNAc) vorkommen. Darüber hinaus liegen 6-O-sulfatierte Strukturen der Disaccharid-Bausteine vor (GlcNS(6S) und GlcNAc(6S)), wobei GlcNS und GlcNS(6S) auch als 3-O-sulfatiert (GlcNS(3S) und GlcNS(3,6S)) zu finden sind. Abbildung 10 illustriert die einzelnen Bausteine, welche die 24 Uronsäure-(1 \rightarrow 4)-D-Glukoseamine Sequenzen aufbauen. Sie stellen die sequentiellen Basiseinheiten sowohl von Heparin als auch von HS dar.^[88]

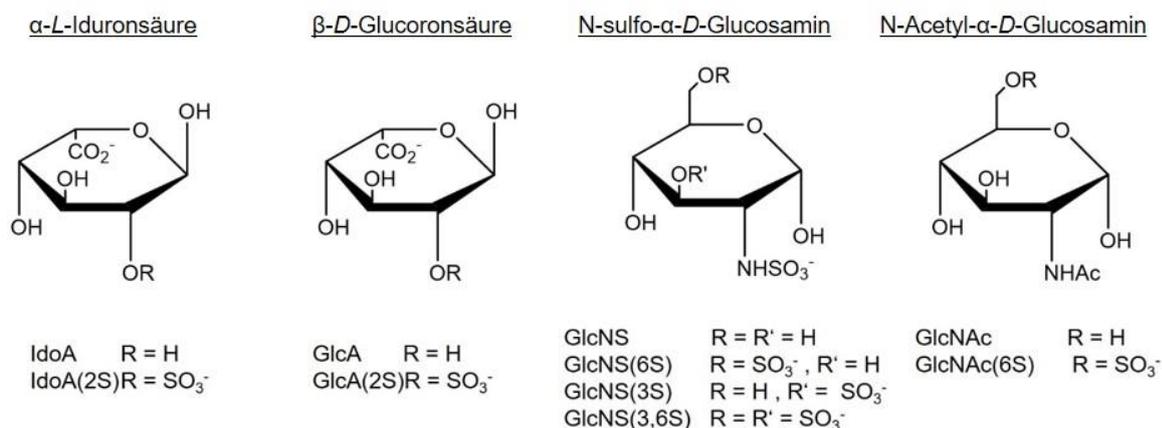


Abbildung 10: Darstellung der verschiedenen Monosaccharide, aus denen Heparin und HS aufgebaut sind (nach Lit.^[88]).

Der strukturelle Aufbau des HS unterscheidet sich zu demjenigen des Heparins insofern, als dass abweichende Verhältnisse der einzelnen Disaccharid-Bausteine zueinander auftreten. Es besitzt nicht nur ein erhöhtes Verhältnis der GlcA /IdoA- sowie GlcNAc / GlcNS-Einheiten, sondern zusätzlich einen niedrigeren SO₄-Gehalt.^[187] Die unsulfatierte GlcA-(1,4)-GlcNAc

Disaccharid-Sequenz kommt am häufigsten im HS vor^[188] und bildet damit einen Teil der Domänenstruktur des Wirkstoffs (NA-Domäne). Die NS-Domäne wird von dem hoch sulfatierten IdoA-(1→4)-GlcNS beherrscht,^[189] welches am häufigsten in Heparin vorkommt.^[88] Eine NA / NS-Zwischenschicht trennt die beiden sich wiederholenden Domänen.^[189] Abbildung 11 stellt die Domänenstruktur mit ihren Bestandteilen dar.

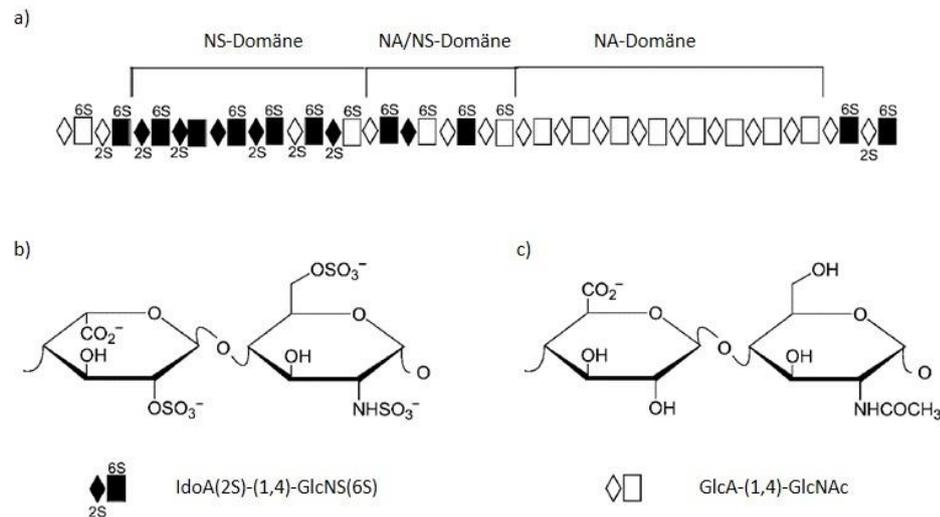


Abbildung 11: Darstellung der Domänenstruktur des HS (a) mit den zwei Disaccharideinheiten (b,c). Hierbei bildet die hoch sulfatierte IdoA-(1→4)-GlcNS-Einheit die NS Domäne. Sie ist zusätzlich Hauptbestandteil des Heparins (b). Die unsulfatierte GlcA-(1,4)-GlcNAc Disaccharid-Sequenz kommt am häufigsten im HS vor und bildet die NA Domäne (c).^[88]

Die einzelnen Stränge des HS sind aus ca. 50-200 Disaccharid-Einheiten aufgebaut, aus denen sich eine erweiterte helikale Struktur mit einer Länge von 40-160 nm ergibt.^[88]

2.2.2 BDNF

Einen essentiellen Beitrag zur Optimierung des Elektroden-Nervenkontaktes im Rahmen des CIs stellt die Nutzung des Wachstumsfaktors BDNF dar.^[26,27,33,44] Innerhalb eines gesunden Ohres wird er von den existierenden Haarzellen geliefert und wirkt sowohl während des axonalen als auch dendritischen Wachstums von Neuronen, wie den Spiralganglienneuronen.^[43] 1982 wurde der Wachstumsfaktor von der Arbeitsgruppe um YVES BARDE am Max-Planck-Institut für Psychiatrie erstmals aus dem Gehirn von Schweinen extrahiert und somit entdeckt. Da sich BDNF hauptsächlich im Gehirn nachweisen lässt, erhielt es den Namen „*brain-derived neurotrophic factor*“ (aus dem Gehirn stammender neurotropher Faktor).^[42,190]

Biologische Funktion. Neurotrophe Faktoren sind Proteine, welche eine entscheidende Rolle in der Proliferation, Differenzierung, Erhaltung, Plastizität, dem Überleben und der Funktion der Neurone im zentralen sowie peripheren Nervensystem spielen.^[54,191,192] Zudem partizipieren die neuroprotektiven Moleküle an lokalen Reaktionen gegenüber verschiedenen neuronalen Stressoren.^[193,194] In Säugetieren dient BDNF der Regulierung von axonalem Wachstum

sowie deren Konnektivität, neuronaler Differenzierung, neuronalem Überleben und synaptischer Plastizität.^[54,195,196] Zudem spielt es eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Medikamenten für neurologische Erkrankungen.^[54,193,194] In zu hohen Dosen kann BDNF jedoch auch gefährliche Nebeneffekte, wie Epilepsie, im Körper auslösen.^[197]

Vorkommen und Aufbau. Zu der Gruppe der Neurotrophine gehören neben BDNF und dem bereits bekannten NGF (*nerve growth factor*)^[198] auch die später entdeckten Neurotrophine 3 (NT-3)^[199], -4 (NT-4)^[200], -5 (NT-5)^[201] und -6 (NT-6)^[202] dazu. Da NT-4 und NT-5 lediglich Variationen desselben Moleküls darstellen, werden sie als NT-4/5 zusammengefasst.^[203] Neurotrophine bilden Homodimere, welche einen löslichen, stark basischen (pH 9-10.5)^[62] Charakter und ein Molekulargewicht um 27 kDa aufweisen. Sie besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau, der durch drei Disulfid-Brücken zwischen Cystein-Aminosäuren gekennzeichnet ist.^[204,205] Bezeichnet wird diese Charakteristik als Cystin-Knoten. Hierbei wird das Polypeptid-Rückgrat durch zwei Disulfidbrücken zu einem Ring verbunden, durch den eine dritte Disulfidbrücke hindurchragt.^[206-208] Jede Monomer Einheit besteht aus ≈ 120 Aminosäuren und bildet drei Paare an antiparallelen β -Strängen, welche mit drei lösungsexponierten Haarnadelschleifen (Schleife 1, 2 und 4) und einer längeren Schleife (Schleife 3) verbunden sind. Bei der Haarnadelschleife handelt es sich um einen doppelsträngigen Bereich in einer einzelsträngigen Nukleinsäure.^[190,208] Die Dimere sind parallel zueinander angeordnet und werden nichtkovalent über hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten.^[209-211] Aufgrund dieser Wechselwirkungen können sich auch Heterodimere von BDNF mit NT-3 bzw. NT-4/5 ausbilden, welche schon Aufschluss über die BDNF-Struktur geben konnten.^[204,205] Des Weiteren lässt sich durch die Homologie mit NGF und dessen Röntgen-Kristallstrukturanalyse die Größe eines BDNF-Moleküls abschätzen. Das NGF besitzt eine Größe von $60 \times 25 \times 30 \text{ \AA}$.^[212] Neben der Größe ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Immobilisierung des BDNFs auf Substraten dessen Oberflächenladung. Es handelt sich bei BDNF um ein stark basisches Protein, welches seinen isoelektrischen Punkt bei pH 10 besitzt.^[42,62] Die positiv geladenen Bereiche auf der Oberfläche des BDNF-Moleküls überwiegen hierbei. Dargestellt ist dies in Abbildung 12 c durch die Anfärbung des elektrostatischen Oberflächenpotentials.^[213]

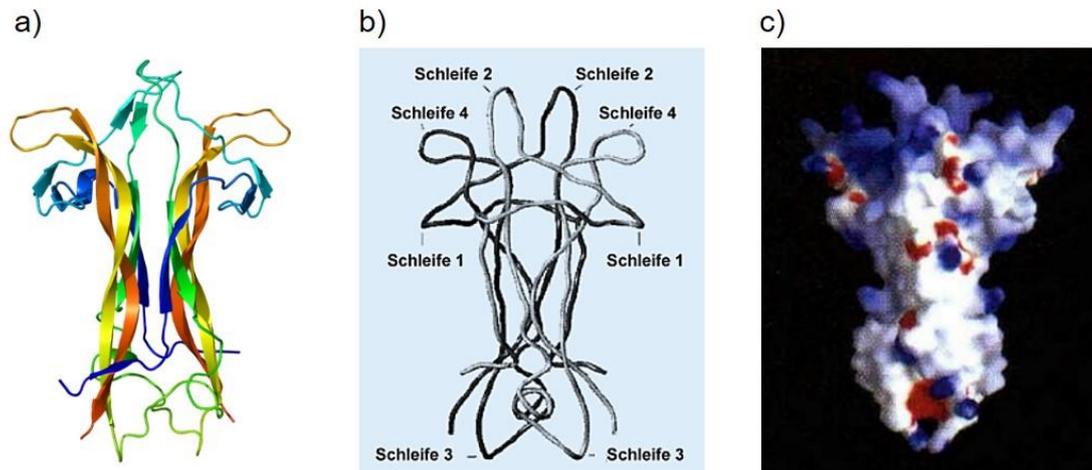


Abbildung 12: Verschiedene Darstellungen eines BDNF-Homodimers. A) Modulierte Proteinstruktur, wobei die Pfeile die β -Stränge darstellen.^[214] B) Molekularstruktur eines BDNF-Moleküls.^[190] C) Visualisierung des elektrostatischen Potentials auf der Oberfläche des BDNF-Homodimers (weiß: unpolare Bereiche, blau: positives Potential, rot: negatives Potential).^[213]

Gebildet wird BDNF aus seinem Vorläuferprotein pro-BDNF, welches aus 382 Aminosäuren besteht und mit 32 kDa ein wenig schwerer ist.^[215] Hierbei enthält die pro-Region wahrscheinlich eine Differenzierungssequenz, sodass eine zielgenaue Sortierung von BDNF möglich ist. Im synaptischen Spalt wird pro-BDNF von Proteasen, wie Plamin, zu BDNF gespalten. Das Vorläuferprotein bindet hauptsächlich an den für ihn hochaffinen p75N-Rezeptor. Dieser ist im Gegensatz dazu für BDNF selbst niedrigaffin. Der Wirkstoff kann zwar Bindungen mit dem Rezeptor eingehen, bindet jedoch eher an den für ihn hochaffinen Tyrosin-Kinase-B (TrKB)-Rezeptor, um eine Wirkung im Körper zu generieren. Anschließend werden Signalkaskaden ausgelöst, die über mehrere Schritte zur Wirkung von BDNF führen.^[216] Dies wird jedoch genauer in Kapitel 2.3 erläutert.

2.2.3 Laminin

Um die Hörqualität mithilfe eines CIs zu verbessern, ist es nach vorangegangenen Studien^[14,28] von großer Wichtigkeit, die Nähe der Spiralganglienneurone zu dem Platinkontakten des Elektrodenarrays zu berücksichtigen. Hierbei stellt der Wirkstoff Laminin eine wichtige unterstützende Komponente dar. Er wurde schon als Elektrodenbeschichtung eingesetzt und konnte nicht nur eine erhöhte Überlebensrate der SGNs generieren, sondern auch eine vermehrte Neuritenausprossung in Richtung der Elektrode erzeugen.^[105]

Vorkommen und Aufbau. Im menschlichen Körper kommt Laminin ausschließlich in der ECM bzw. in der Basalmembran vor und ist vor allem für die Zellbindung verantwortlich. Es handelt sich hierbei um eine dünne Membran, die neben Epithelgewebe auch Nerven-, Fett- und Muskelzellen umhüllt.^[103,104] Im Jahr 1979 wurde erstmals Laminin von TIMPL *et al.* aus dem *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS) Sarkom einer Maus isoliert,^[103,217] welches einzig allein der Produktion von Bestandteilen der Basalmembran dient.^[218] Ebenfalls im gleichen Jahr

konnten CHUNG *et al.* Laminin aus embryonalen Karzinomzelllinien einer Maus isolieren.^[104] Laminin gehört strukturell zu den Glycoproteinen mit einem Molekulargewicht von ungefähr 850 kDa.^[103,104] Diese bestehen zu einem Teil aus Aminosäuren, welche zu Peptiden miteinander verbunden sind. Kovalent angebunden sind hieran langkettige Kohlenhydratmoleküle, wobei die Bindung entweder *N*-glycosidisch oder *O*-glycosidisch erfolgen kann. Die Bindung kann also entweder über den Stickstoff der funktionellen Gruppe des Asparagins oder aber über den Sauerstoff der funktionellen Gruppe des Serins bzw. Threonins geknüpft werden.^[219] Der Kohlenhydrat-Anteil im Laminin beträgt in etwa 13 %. Die Kohlenhydrate bilden in verschiedenen Bereichen des Laminins Clusters.^[69] Laminin besitzt zudem einen isoelektrischen Punkt bei pH 5.^[220]

Abbildung 13 a) zeigt das aus dem EHS isolierte Laminin, anhand dessen seine Struktur genauer erläutert wird. Als Heterotrimer ist es aus drei Peptidsträngen (α, β, γ) aufgebaut, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind.^[68,69,103,104] Die einzelnen Ketten enthalten sowohl kugelförmige als auch stäbchenförmige Einheiten und sind in einer asymmetrischen Kreuzform angeordnet. Neben drei kurzen Armen wird zudem ein langer Arm, welcher in etwa 77 nm misst und aus allen drei Ketten aufgebaut ist, gebildet.^{[221][222]} Er stellt eine α -helikale *Coiled-Coil* Struktur dar, bei der jede einzelne Kette eine α -Helix aus sich wiederholenden Heptad-Einheiten darstellt. In einer Sequenz von sieben Aminosäuren befinden sich an der ersten und vierten Position jeweils hydrophobe Aminosäuren, um die später gebildete *Coiled-Coil* Struktur zu stabilisieren. Sie baut sich aus drei miteinander verdrehten α -Helices auf (Abbildung 13 b).^[223,224] Am Ende des langen Armes befinden sich fünf kugelförmige Einheiten, welche als C-Terminus für die Bindung an Calciumionen verantwortlich sind.^[68,225] An den Enden der kurzen Arme (34 – 48 nm) befindet sich jeweils eine kugelförmige Einheit (N-Terminus) und innerhalb der Kette sind jeweils zwei bis drei kugelförmige Strukturen vorhanden.^[68,69,221,222,226] Während die kugelförmigen Strukturen einen geringen Anteil an Cystein-Resten besitzen, weisen die stäbchenförmigen Bereiche zwischen den Kugeln einen hohen Cystein-Gehalt auf.^[227] Neben dem Laminin aus dem EHS wurden mit der Zeit viele genetisch unterschiedliche Laminin-Moleküle entdeckt, welche aus verschiedenen Kombinationen der α -, β - und γ -Ketten aufgebaut sind. Das hier beschriebene Biomolekül trägt die Bezeichnung Laminin-111.^[226] Insgesamt sind jedoch theoretisch über 50 verschiedene Strangkombination denkbar, wobei sowohl im menschlichen Körper^[68] als auch in der Maus^[226] durch experimentelle Daten bis jetzt lediglich 16 verschiedene Moleküle vorausgesagt werden können.^[226]

Biologische Funktion. Biologisch gesehen wirkt Laminin maßgeblich am Aufbau der Basalmembran mit. Es bindet an die anderen Komponenten der Basalmembran, um ein stabiles Netzwerk zu erzeugen (siehe Abbildung 13 c).^[69,71] Mit Nidogen, einem Glykoprotein und Netzwerkbildner der EZM, bildet es einen stabilen Komplex,^[228–230] der die Zellbindungsaktivität erhöht. Collagen IV geht eine Bindung mit den Enden der kurzen Arme und des langen

Arms des Laminins ein.^[69,231,232] Auch Osteonectin geht mit dem Laminin einen Komplex ein.^[69] Über die Heparin Bindungsstelle am Ende des langen Arms können verschiedene Pro-teoglycane an das Laminin angebunden werden.^[69,233] Es handelt sich hier ebenfalls um Gly-coproteine, wobei ihr Kohlenhydratanteil höher als ihr Proteinanteil ist.^[234] Hierzu zählen u. a. Heparin und HS, wobei letzteres sowohl in hoher als auch in niedriger Dichte in der Basal-membran vorkommt. Ersteres bindet nur schwach an das Laminin. Durch eine erhöhte Salz-konzentration kann diese Verknüpfung gespalten werden.^[235] Dahingegen sind die Bindungs-verhältnisse für das HS mit geringerer Dichte noch unbekannt.^[236] Zusätzlich ist Laminin in der Lage mit anderen Laminin-Molekülen reversibel selbst assemblierte Strukturen zu erschaf-fen.^[69,237]

Eine weitere wichtige Aufgabe des Laminins ist die Zellanbindung, welche im mittleren Ab-schnitt der Kreuzform stattfindet.^[69,71] Hierdurch werden verschieden Effekte in den Zellen ausgelöst. Neben der Steuerung des Wachstums,^[71] der Morphologie,^[71,238] der Adhä-sion,^[71,239] Genexpression und Signalübermittlung^[68] beeinflusst es ebenfalls das Überle-ben^[68,71] und die Differenzierung^[71,240] der Zellen. Zudem kann Laminin als chemotaktisches Molekül die Migration von Zellen fördern.^[68,241] Weiterhin unterstützt Laminin mithilfe einer Domäne am unteren Ende der *Coiled-Coil*-Struktur die Neuritenausprossung in Nervenzel-len. Es wirkt vor allem im zentralen Nervensystem.^[69,70,242]

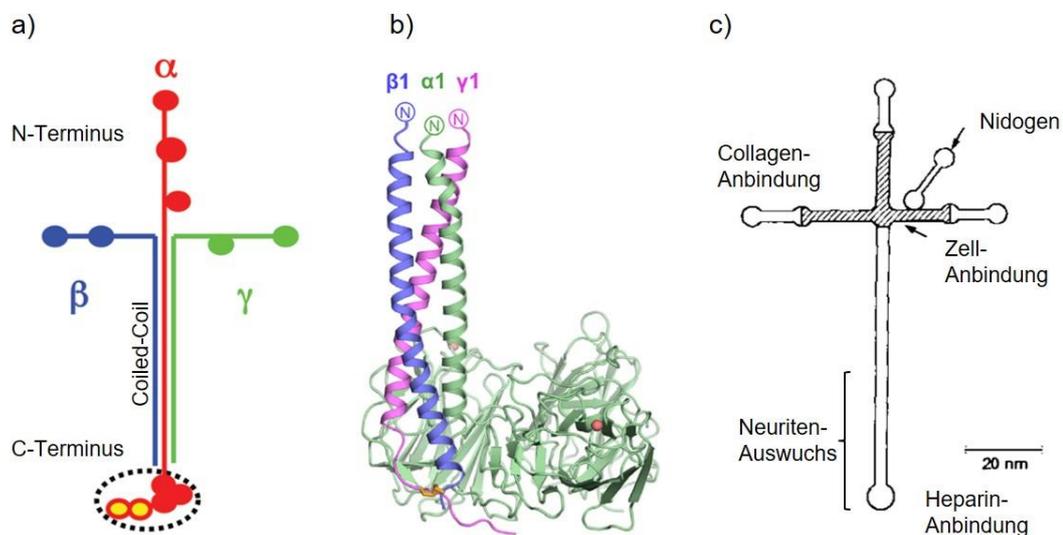


Abbildung 13: Verschiedene Darstellungen eines Laminin Moleküls. A) Schematischer Aufbau des 111-Laminins mit der α -, β - und γ -Kette. Zu sehen sind sowohl die kugelförmigen als auch die stäbchenförmigen Bereiche wie auch der N- bzw. C-Terminus (nach Lit.^[68]). B) Kristallstruktur der *Coiled-Coil* Struktur des 111-Laminins sowie Teile des C-Terminus.^[243] C) Visualisierung der Bindungsstellen im Laminin für Collagen, Nidogen, Heparin sowie Zellen. Zudem ist der Bereich gekennzeichnet, der für den Neuriten-Auswuchs verantwortlich ist (nach Lit.^[69]).

2.3 Implantat-gestützte Neuroregeneration

Die verschiedenen Wirkstoffe können im Rahmen des CIs eingesetzt werden, um seine Funktion zu unterstützen bzw. seine Wirksamkeit zu verbessern. Während Laminin schon erfolgreich als Elektrodenbeschichtung verwendet wird,^[105] zeigen sowohl HS als auch BDNF erfolgsversprechende Ergebnisse im Hinblick auf ihren Einsatz in der Cochlea.^[26,27,44,102] Wie schon in Kapitel 2.1 erwähnt, ist einerseits die Degeneration der SGNs ein entscheidender Faktor für die limitierte Wirkungsweise des CIs. Die Übertragung des elektrischen Signals von der Elektrode an die verbliebenden SGNs ist mit einer starken Streuung und folglich auch Signalüberlappung verknüpft, was einen unzureichenden Höreindruck generiert.^[28] Nun können die verschiedenen Wirkstoffe dazu eingesetzt werden, um sowohl die Überlebensrate der SGNs zu erhöhen als auch die Aussprossung der Neuriten in Richtung der Elektrode zu fördern. Eine optimale Signalübertragung ließe sich schlussendlich durch das Anwachsen der Neuriten auf der Elektrodenoberfläche erreichen. Dieser Vorgang wird in diesem Abschnitt als Implantat-gestützte Neuroregeneration genauer beschrieben. Neben Laminin, HS und BDNF gibt es noch weitere Wirkstoffe, die hier ihren Einsatz finden. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine unterstützend wirkende neuronale Leitstruktur^[36] aus biodegradierbaren Polymerfasern, welche senkrecht stehend auf der Elektrodenoberfläche aufgebracht und mit Wirkstoffen beschichtet sind, entwickelt werden. Die Wirkstoffe können anschließend lokal ihre Wirkung entfalten. Nach der Degradation der Polymerfasern können die regenerierten Neurone direkt von der Elektrodenoberfläche stimuliert werden. Somit werden im Folgenden nacheinander die Wirkungsweisen der einzelnen Biomoleküle, die als Bestandteile eines CI-assoziierten Scaffolds dienen könnten, erläutert.

BDNF und NT-3. Der Ertaubung im menschlichen Ohr folgt die Degeneration der für den Hörvorgang notwendigen SGNs, welche langfristig das Absterben der Zellkörper mit sich bringt.^[28] Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Neurotrophine, wie BDNF und NT-3, die Überlebensrate der SGNs erhöhen,^[67] wobei dem BDNF ein höherer Effekt zugeschrieben wird.^[28,44,244] Innerhalb eines gesunden Ohres werden die beiden Neurotrophine zunächst von den Haarzellen und später von den SGNs sowie Unterstützerzellen bereitgestellt.^[39,41] Sie entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an neurotrophinspezifische Rezeptoren. Für NT-3 handelt es sich um den TrkC- und für BDNF um den TrkB-Rezeptor.^[54,245,246] Weiterhin weisen alle Neurotrophine dieselbe Affinität für den p75-Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}) auf. Während diese Bindung auch einen gegensätzlichen Effekt hervorrufen kann, dient sie zudem als Corezeptor, um die Spezifität der Trk-Rezeptoren zu steigern.^[246] Nachdem diese das Neurotrophin gebunden haben, dimerisieren die Trk-Rezeptoren und aktivieren eine intrinsische Kinaseaktivität. Weiterhin unterliegen die Rezeptoren einer Autophosphorylierung und stimulieren einen komplexen Satz intrazellulärer Signalkaskaden.^[191,247] In der Cochlea kann durch

BDNF sowie NT-3 der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K)- / Protein Kinase B (AKT)-Signalweg initiiert werden. Durch das Gab1-Protein (*Grb2 associated binding protein*) wird so das Überleben und die Proliferation der Neuronen gefördert.^[54] Schlussendlich wird hierdurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-responsive element-binding protein*) reguliert. Infolgedessen leitet CREB die Expression von überlebensfördernden Genen in den SGNs ein.^[43,54] Daneben wird durch BDNF / NT-3 die synaptische Plastizität sowie die Neurotransmission gefördert.^[54] Zudem wird der ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) / MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg ausgelöst, um die neuronale Differenzierung zu unterstützen, welche sowohl die Neurogenese als auch das Neuritenwachstum umfasst.^[41,43,44,54] Eine langanhaltende Freisetzung von BDNF ermöglichte bereits das Nachwachsen peripherer Hörnervenfaser.^[26,27] Hierbei fördert laut vorangegangenen Studien NT-3 die Neuritenaussprossung stärker als BDNF.^[248,249] Mithilfe eines NT-3-Konzentrationsgradienten, ausgehend von der Oberfläche der neuronalen Leitstruktur, soll zudem ein gerichtetes Wachstum der Neuriten gefördert werden. Dazu zeigten CAO *et. al.*^[250] bereits *in vitro*, dass Axone in Richtung eines NT-3-Konzentrationsgradienten wachsen. Weiterhin wurde *in vivo* das axonale Wachstum in Richtung eines NT-3-Konzentrationsgradienten beobachtet, um Rückenmarksverletzungen zu heilen.^[251] Es wurde bereits gezeigt, dass Neuriten unter Zuhilfenahme von NT-3 in der Cochlea eine Distanz von 12.5 mm überwinden können.^[250]

Heparansulfat. Um das Wachstum der Neuriten auf ihrem Weg zur Elektrodenoberfläche entlang der neuronalen Leitstruktur zu unterstützen, ist diese zusätzlich mit HS beschichtet. Hierbei soll das HS über einen langen Zeitraum stabil anhaften. Als Trägermatrix dient es zunächst dazu, die Neuronen und Neuriten mit biologisch aktivem BDNF / NT-3 zu versorgen. Zu den Aufgaben des HS gehört es, Wachstumsfaktoren anzubinden, zu stabilisieren, kontrolliert freizusetzen sowie ihre Bioverfügbarkeit zu erhöhen.^[93–96,160,179–181] Zusätzlich fördert es selbst das neuronale Überleben der SGN, indem es verschiedene Signalwege aktiviert. Hierzu gehören neben dem Wnt / Ca²⁺-Signalweg auch die *Fibroblast Growth Factor* (FGF)- und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β)-Signalwege.^[102] Zudem unterstützt es weitere Neuritenaussprossungen.^[102,170,171] Untersuchungen haben ergeben, dass sich eine simultane Zugabe von BDNF und HS additiv auf die Neuritenaussprossung auswirkt.^[102] Zudem unterstützt HS die Adhäsion der ausgewachsenen Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur.^[169] Es bietet als Molekül der ECM strukturelle Unterstützung. Generell dient es den Neuriten im Rahmen einer Matrixtherapie, indem es die natürliche Zellumgebung bewahrt bzw. wiederherstellt.^[88,91,102] HS soll im Rahmen dieses Projekts die ECM imitieren. In diesem Zuge soll es auch die Wundheilung nach dem verursachten Trauma durch die Insertion des Implantats fördern.^[172–174]

Laminin. Weiterhin kann HS über spezifische Bindungsstellen am „unteren“ Ende von Lamininmolekülen Bindungen mit diesem eingehen.^[68,69] Die neuronale Leitstruktur soll ebenfalls mit Laminin beschichtet werden, welches analog zu HS über einen langen Zeitraum stabil auf der Oberfläche der neuronalen Leitstruktur anhaften soll. In Anlehnung an das HS besitzt es ebenfalls die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren, wie BDNF und NT-3, zu speichern. Dabei reguliert es nicht nur die Verteilung, sondern auch die Aktivierung und Präsentation der Cytokine für die jeweiligen Zellen.^[68] Hinzu kommt, dass es ebenfalls die Regeneration von Nervenzellen fördert.^[69,252] Als Adhäsionsmolekül soll das Laminin hauptsächlich das Wachstum der Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur unterstützen.^[68-71] Die Zellanbindung findet dabei im mittleren Teil der Kreuzstruktur des Laminins statt.^[68,226,253] Am unteren Ende der *Coiled-Coil*-Struktur liegen die Bereiche, welche die Neuritenaussprossung der SGNs fördern.^[69,70,242] Die Auswirkungen des Laminins auf die Neurone steigen proportional mit der Menge des Laminins an, denen sie ausgesetzt sind.^[69,70] Die neuronalen Zellen selbst besitzen mindestens zwei Laminin-spezifische Rezeptoren für die jeweiligen Wechselwirkungen.^[69,254] Es konnte schon vielfach in Studien gezeigt werden, dass Laminin das Wachstum von Nervensträngen fördert.^[255-257]

Polysialinsäure. Um die Neuriten nicht zu fest auf der neuronalen Leitstruktur anwachsen zu lassen und sie somit von ihrem eigentlichen Ziel, der CI-Elektrode, fernzuhalten, soll die Struktur ebenfalls mit adhäsionsverhindernden „permissiven“ Wirkstoffen beschichtet werden. Hierzu gehört die Polysialinsäure (PolySia), welche als lineares Homopolymer der α -2,8-verknüpften Sialinsäure^[72] fast ausschließlich gebunden an das neuronale Zell-Adhäsions-Molekül (NCAM) im Vertebraten zu finden ist.^[258-260] Seine Entdeckung lässt sich darauf zurückführen, dass es die Adhäsionseigenschaften des NCAMs verringert.^[261-263] Sowohl durch seinen sterischen Anspruch als auch durch seine negative Ladung wirkt PolySia antiadhäsiv und kann somit die Anzahl der Zell-Anbindungen auf der neuronalen Leitstruktur verringern.^[261] Hierdurch erzeugt PolySia ein permissives Medium, welches ebenfalls die Nervenregeneration fördert. PolySia bewirkt nicht nur eine vermehrte Neuritenaussprossung, sondern verhindert ebenfalls eine Bündelung der Neuriten.^[264-266]

L1CAM. Die Oberfläche der Elektrode kann letztendlich mit den schon erwähnten neuronalen Adhäsionsmolekülen beschichtet werden, um die Neuriten für eine ausreichende und differenzierte elektrische Anregung zu verankern. L1CAM zeigt in diesem Fall eine deutliche Spezifität für die neuronale Anbindung, das neuronale Überleben sowie das Aussprossen von Neuriten.^[73-75] L1CAM fördert die Adhäsion über homophile Bindungen. Die neuronale Anbindung sowie der Neuritenauswuchs konnten schon *in vitro* gezeigt werden.^[267] Zusätzlich verbessert eine gemusterte Beschichtung der Elektroden mit dem L1CAM das Wachstum der Nervenfortsätze.^[75]

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer neuronalen Leitstruktur für die Regeneration der SGNs in der Cochlea auf der Basis von biodegradierbaren Polymerfasern. In diesem Rahmen wird lediglich an der Beschichtung der Fasern mit den drei Biomolekülen HS, BDNF und Laminin gearbeitet. Die restlichen Moleküle sind jedoch Bestandteil der Zukunftsvision, sodass Abbildung 14 das gesamte Projekt illustriert. Es zeigt schematisch den Querschnitt durch die Cochlea mit eingesetztem Implantat in der *scala tympani*. Zum einen ist die Situation abgebildet, welche sich lediglich aus dem Einsetzen des CIs ergibt (a). Die SGNs degenerieren. Zusätzlich ist zu sehen, wie das Implantat mit senkrecht darauf angebrachten Polymerfasern ausgestattet ist, welche mit verschiedenen Biomolekülen beschichtet sind. Hierdurch soll die neuronale Regeneration der SGNs gefördert und die Führung der Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur zur Implantatoberfläche hin generiert werden. Anschließend sollen diese auf dem Implantat anwachsen (b). Zukünftig könnten alternative Stimuli in das hier beschriebene System integriert werden, um die Nervenenden vom Implantat aus anzuregen. So würde eine Freisetzung von Neurotransmittern von der Implantatoberfläche aus die elektrische Anregung der SGNs ersetzen.^[268] Auch die Anregung der Neurone mithilfe von Licht stellt eine Alternative zur klassischen elektrischen Anregung dar. Die SGNs könnten auf diese Weise präziser angeregt werden. In der aktuellen Forschung wird an der Entwicklung eines optogenetischen CIs gearbeitet.^[269]

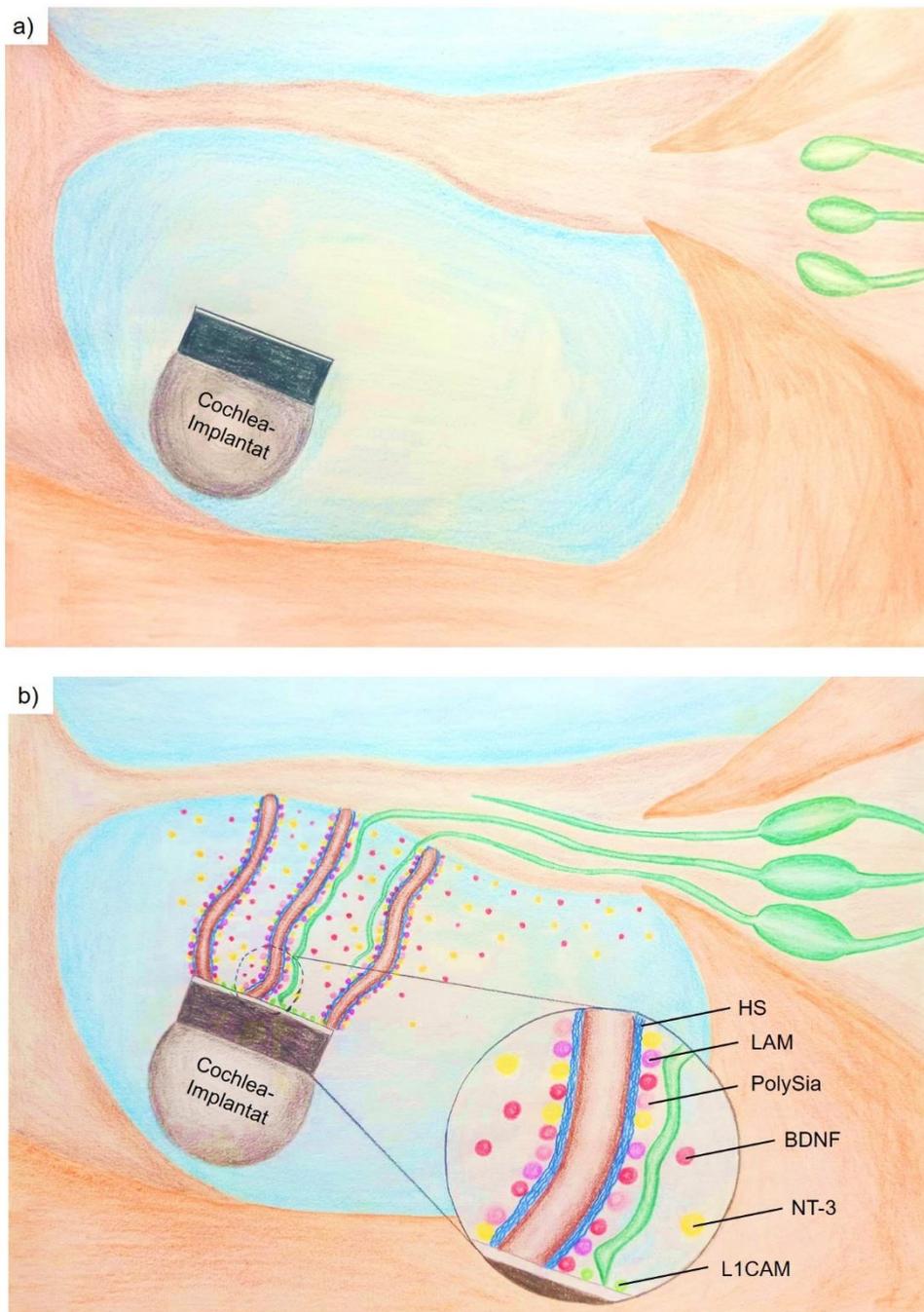


Abbildung 14: Querschnitt durch die Cochlea mit eingesetztem Implantat. Zu sehen ist die schematische Darstellung eines CIs ohne (a) bzw. mit (b) aufgebracht Polymerfasern (braun), welche zunächst mit einer fest anhaftenden Schicht an HS (blau) beschichtet wurden. Es dient als Modell für die extrazelluläre Matrix. Weiterhin sind die Wachstumsfaktoren BDNF (rot) sowie NT-3 (gelb) immobilisiert. Sie werden mit der Zeit von den Fasern freigesetzt, um die Überlebensrate der SGNs (grün) zu erhöhen und die Aussprossung der Neuriten (grün) in Richtung des Implantats zu fördern. Aufgrund dessen sind die Fasern zudem fest mit dem adhäsiven Molekül Laminin (LAM) (violett) benetzt, um den Neuriten Ankerpunkte auf ihrem Weg zur Oberfläche der Elektrode entlang der Fasern zu bieten. Damit keine dauerhafte Anbindung der Neuriten an die Fasern erfolgt, sind diese zudem fest mit dem antiadhäsiven PolySia (rosa) beschichtet. Die Elektrodenoberfläche ist wiederum mit dem neuronalen Adhäsionsmolekül L1CAM bedeckt, sodass die Neuriten letztendlich auf der CI-Oberfläche anwachsen können, um elektrisch stimuliert zu werden. Im Laufe der Zeit sollen die Polymerfasern vollständig abgebaut werden, sodass lediglich die angewachsenen Neuriten auf der Elektrode übrig bleiben.

2.4 Polymerfasern als neuronale Leitstruktur

Als neuronale Leitstruktur sollen im Rahmen dieser Arbeit Fasern aus biodegradierbaren Polymeren dienen. Diese sollen über einen längeren Zeitraum im Körper abgebaut werden, damit die Leitfunktion und die assoziierten Wirkstoffe hinreichend lange für die Regeneration der SGNs zur Verfügung stehen. Außerdem sollen sich die nachgewachsenen Neuriten entlang der Struktur orientieren. Nachdem diese die Elektrodenoberfläche erreicht haben, angewachsen sind und elektrisch stimuliert werden können,^[26,270] hat die neuronale Leitstruktur ihre Aufgabe erfüllt und wird nicht mehr benötigt. Als Modell werden im Rahmen dieser Arbeit monofile Fasern aus dem Copolymer PGA / PCL (Glycolon®) der Firma Resorba® verwendet. Dazu wird in den folgenden Kapiteln neben dem Aufbau und den Eigenschaften der Polymere ebenfalls auf ihren Einsatz als Biomaterialien eingegangen.

2.4.1 PCL und PGA als Basismaterialien

Sowohl PCL als auch PGA gehören zu den biodegradierbaren¹ Polymeren, welche in den letzten Jahrzehnten immer stärker in das Interesse der Biomedizin gerückt sind. Hier werden sie nicht nur in *Drug Delivery*-Systemen, sondern auch im Bereich der Nervenleitung,^[271,272] als chirurgisches Nahtmaterial und in Gerüsten (*Scaffolds*) für das sogenannte *Tissue Engineering* eingesetzt.^[273–276] Letzteres beschreibt die gerichtete Kultivierung von Zellen, um menschliches Gewebe künstlich wachsen zu lassen.^[277–283] Warum diese Polymere einen so großen Einsatz als Biomaterialien erfahren, wird durch ihre Eigenschaften deutlich, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

Poly- ϵ -Caprolacton. Poly- ϵ -Caprolacton verzeichnet einen Zuwachs in der Anzahl an herausgebrachten Publikationen im Bereich der Biomedizin in den Jahren 1988 bis 2010 von ungefähr 15 bis auf über 700 Artikel pro Jahr.^[80] Entdeckt wurde es schon in den 1930er Jahren von der Arbeitsgruppe um CAROTHERS.^[284] Hier gehörte es zu einem der ersten synthetisierten Polymere. Nachdem entdeckt wurde, dass es trotz seiner synthetischen Herstellung von organischen Mikroorganismen abgebaut werden kann, wurde es möglich, PCL kommerziell zu erwerben.^[285] Synthetisiert werden kann es auf zwei unterschiedlichen Wegen. Neben einer radikalischen ringöffnenden Polymerisation von 2-Methylen-1,3-Dioxepan dient auch eine

¹ Die beiden Polymere werden in der Literatur sowohl als bioresorbierbar als auch als biodegradierbar beschrieben. Der erste Begriff beschreibt Substanzen, die vom Körper abgebaut und anschließend von diesem aufgenommen und zum Aufbau des gewünschten Gewebes genutzt werden. Biodegradierbare Substanzen werden demgegenüber lediglich vom Körper abgebaut und anschließend ausgeschieden. Sowohl PGA als auch PCL werden vom Körper abgebaut. Die Abbauprodukte werden anschließend verstoffwechselt und nicht zum Gewebeaufbau genutzt.^[294] Daher wird im Rahmen dieser Arbeit der Begriff „biodegradierbar“ zur Beschreibung der PGA/PCL-Fasern verwendet.

ringöffnende Polymerisation von ϵ -Caprolacton unter Verwendung verschiedener kationischer, anionischer und koordinativer Katalysatoren der Herstellung des Polymers.^[286,287] Die zugehörige Reaktionsgleichung ist schematisch in Abbildung 15 zu sehen.

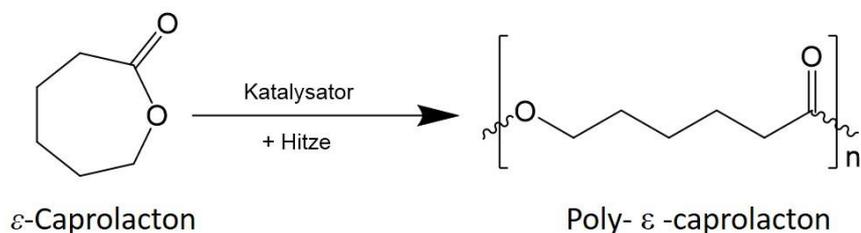


Abbildung 15: Schematische Darstellung der ringöffnenden Polymerisation von ϵ -Caprolacton zu Poly- ϵ -Caprolacton. Nach Lit.^[288]

Das Polymer weist nicht nur einen hydrophoben Charakter, sondern auch semikristalline Eigenschaften auf, welche mit steigendem Molekulargewicht zunehmen. Zusätzlich besitzt es einen geringen Schmelzpunkt (59-64 °C), eine Glasübergangstemperatur von 60 °C sowie allgemein gute Löslichkeitseigenschaften. Da es zudem geeignet ist, um zahlreiche *Blends* herzustellen, findet Poly- ϵ -Caprolacton eine große Anwendung in der Biomedizin.^[289-291] Seinen Einsatz im Bereich der *Drug Delivery*-Systeme fand PCL vorrangig ab den 1970er bzw. 1980er Jahren aufgrund des ansteigenden Interesses an biodegradierbaren Polymeren. Sowohl die Degradierungskinetik als auch die mechanischen Eigenschaften des PCLs konnten maßgeschneidert eingestellt werden. Zusätzlich war es möglich, das Polymer leicht in Form zu bringen, sodass kontrollierte Systeme etabliert werden konnten.^[80] Hinzu kommt, dass PCL sehr biokompatibel sowie durchlässig für eine Menge an verschiedenen Wirkstoffen ist.^[292] Beispielhaft konnten CHANDRA *et al.* die Eigenschaften des *Drug Release* von unterschiedlichen Poly- ϵ -Caprolacton-Blends einstellen. Durch Zugabe von hydrophileren Polymeren, wie Cellulosepropionat, Polylactid (PLA) und Polylactid-Co-Glycolid (PLGA), zu dem hydrophoben PCL konnte sowohl die Färbbarkeit als auch die Reißfestigkeit und die Adhäsion des Materials erhöht werden.^[293] Als eine weitere Eigenschaft des PCLs ist seine langsame Abbaurate von 3-4 Jahren zu nennen. So konnten nicht nur *Drug Delivery*-Systeme etabliert werden, die über ein Jahr aktiv waren, sondern auch langsam degradierbare Nahtmaterialien, wie Maxon™, entwickelt werden.^[80] Der Abbau des PCLs im Körper folgt nach WOODWARD *et al.* einem zwei-Stufen-Degradierungsmechanismus, bei dem zunächst die Estergruppen des Polymers in einem zufälligen Prozess hydrolytisch (nicht-enzymatisch) gespalten werden. Im zweiten Schritt wird PCL intrazellulär degradiert. Das verminderte Molekulargewicht sowie die erhöhte Kristallinität führen zur vollständigen Resorption des Materials.^[294] Dies geschieht durch Phagozytose in Makrophagen. Das Polymer wird in kleine Zellvesikel, den Phagosomen, eingeschlossen. Diese fusionieren mit Lysosomen, welche lysosomale Enzyme, wie Hydrolase, enthalten, um das PCL in einer sauren Hydrolyse abzubauen. Die entstandene Hydroxycapronsäure kann anschließend verstoffwechselt werden.^[294] Studien belegen, dass die

Degradation des Polymers im ersten Schritt einer Kinetik 1. Ordnung folgt und der *in vitro*-Hydrolyse bei 40 °C gleicht.^[288] Im Gegensatz zu anderen Polyestern, wie PLA, erzeugt PCL jedoch keine saure Umgebung, wenn es abgebaut wird. PÊGO *et al.* untersuchten die Degradierung von PCL-Copolymeren für ihren Einsatz als Nervenleiteinheiten im menschlichen Körper und fanden heraus, dass ein Implantat aus Poly(1,3-trimethylencarbonat) [poly(TMC)] mit 89mol % ϵ -Caprolacton nach einem Jahr vollständig vom Körper abgebaut und aufgenommen wurde.^[295]

Polyglykolsäure. Schon einige Jahre vor der Entdeckung des PCLs wurde die Polyglykolsäure das erste Mal erwähnt. 1893 beschrieben BISCHOFF und WALDEN die reversible Reaktion des Glykolsäure-Monomers zu dem entsprechenden Makromolekül. Ebenfalls die Arbeitsgruppe um CAROTHERS untersuchte die Polymerisationsreaktion des PGAs im Jahre 1932.^[296] Sowohl die Polykondensation als auch eine ringöffnende Polymerisation dienen dazu, dass PGA zu synthetisieren. Obwohl die erste Methode kostengünstiger ist, sind ihre Produkte von geringerem Molekulargewicht, welches zudem nicht kontrolliert eingestellt werden kann. Der eingesetzte Katalysator (Antimon-Trioxid) fördert möglicherweise nicht nur die Polymerisation, sondern auch die Depolymerisation. Somit können Glykolsäure und Milchsäure unter den herrschenden Bedingungen copolymerisieren. Folglich wird das Polymer vorzugsweise durch die ringöffnende Polymerisation des dimeren zyklischen Esters Glykolid hergestellt. Neben einem kationischen und anionischen Mechanismus gibt es zusätzlich den in der Industrie am häufigsten genutzten Insertionsmechanismus zur Synthese des PGAs. Hierfür wurden neben Metallalkoxiden auch $-carboxylate$ verwendet. Die zugehörige schematische Darstellung der ringöffnenden Polymerisation ist in Abbildung 16 illustriert.

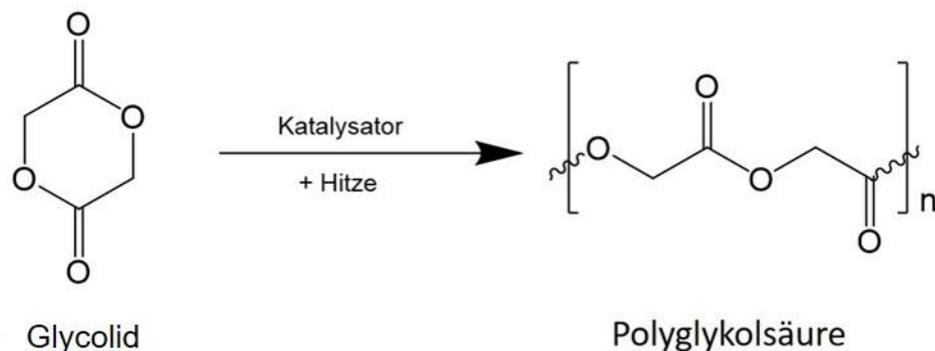


Abbildung 16: Schematische Darstellung der ringöffnenden Polymerisation der Glykolsäure zu Polyglykolsäure. Nach Lit.^[84]

Die Polyglykolsäure weist nicht nur eine hohe Kristallinität, sondern auch einen hohen Schmelzpunkt von 225 °C auf. Weiterhin zeichnet sie sich durch einen Glasübergangspunkt bei 36 °C aus. In organischen Lösemitteln lässt sie sich schlecht lösen.^[297] Das PGA wurde durch FRAZZA und SCHMITT bekannt,^[82] welche im Jahre 1971 resorbierbares Nahtmaterial aus dem Polymer herstellten. Dieses wurde u. a. zur Wundverschließung unter dem Namen

Dexon bekannt. Weiterhin war es möglich, verflochtene PGA-Fasern zu erzeugen, die nach der Implantation im Körper innerhalb von vier Wochen abgebaut werden konnten. Grund hierfür stellen die hydrophilen Eigenschaften des PGAs dar.^[297] Nach GOMBOTZ und PETIT degradieren die Fasern *in vitro* in einem bulk-Erosionsprozess.^[273] Demgegenüber konnten GINDE *et al.*^[298] eine Oberflächendegradation im Falle des PGA beobachten. Die Esterbindungen werden in einer einfachen Hydrolyse gespalten, sodass eine ungeordnete Kettenspaltung stattfindet. Die erzeugten, einzelnen Monomere diffundieren anschließend in das umgebende Milieu. Es konnte gezeigt werden, dass zunächst die amorphen Regionen eines PGA-Substrates und anschließend die kristallinen Regionen hydrolysiert werden.^[299] Weiterhin dienen Phosphate als Katalysatoren, um die Hydrolyse zu unterstützen.^[300] *In vivo* kann es zudem zu einem enzymatischen Abbau des PGAs kommen.^[297] Ähnlich zum PCL findet hier die Phagozytose unter Verwendung lysosomaler Enzyme statt.^[300] Die großen Mengen an relativ schnell freigesetzter Glykolsäure erzeugen eine saure Umgebung, was zu Nachteilen in einigen Regionen des Körpers führen kann.^[297] Des Weiteren können mit PGA Copolymere hergestellt werden. Mithilfe des PLAs war es Forschern bereits möglich, das PLGA zu synthetisieren, welches ebenfalls seinen Einsatz in unterschiedlichen *Drug Delivery*-Systemen gefunden hat. So konnte von CHANG *et al.*^[273] 1976 Insulin aus PLGA-Mikrokapseln freigesetzt werden. Außerdem kann die Oberfläche des PGAs modifiziert werden, sodass die Degradierungskinetik, die Freisetzungseigenschaften und der Einfluss auf Körperzellen verändert werden. LEE *et al.* waren somit in der Lage, Biotin auf die Oberfläche von Polyglykolsäure-Fasern aufzubringen, um später Medikamente zu immobilisieren.^[277]

PCL-PGA-Komposite. Wie bereits beschrieben, ist es möglich mithilfe der beiden Polymere Komposite herzustellen – so auch durch eine Vermischung untereinander. Auf diese Weise können gewünschte Eigenschaften der beiden Polymere vereint und im Endprodukt genutzt werden. So wird oftmals die langsame Abbaurate des PCLs sowie die hohe Festigkeit des PGAs gewünscht. Zu den Kompositen gehören sowohl Polymer-Blends als auch Copolymere. Zunächst wird auf die Blends eingegangen. Obwohl es sich bei PCL um ein hydrophobes und bei PGA um ein hydrophiles Polymer handelt, war es bereits möglich, verschiedene Blends mit unterschiedlicher Zusammensetzung herzustellen.^[301–304] Es war weder eine Phasenseparation noch die Entstehung von kovalenten Bindungen zu beobachten, was die erfolgreiche Synthese eines Polymerblends anzeigt. Die vermehrte Zugabe von PGA zu PCL erhöhte die Kristallinität des Produktes.^[301] Außerdem werden die Viskosität sowie das viskoelastische Verhalten und die Hydrophilie hierdurch gesteigert.^[302] Daneben wurden bereits monofile Fasern aus einem PGA-PCL-Blockcopolymer unter dem Namen Monocryl® hergestellt.^[83,84,305] Hierbei wird zunächst ein Präpolymer aus ϵ -Caprolacton und Glycolid hergestellt, wobei das molare Verhältnis des ersten zum zweitgenannten Polymer zwischen 60:40 und 40:60 liegt. Genutzt wird meist ein auf Zinn basierender Katalysator sowie ein Alkanol, ein Glykol, eine

Hydroxysäure oder ein Amin als Initiator. Die Umsetzung der Monomere zu dem gewünschten Präpolymer erfolgt zu 98 mol%. Die Kristallinität dieses Präpolymers liegt bei 2 bis 15 %. Der zugehörige Schmelzpunkt liegt unter 120 °C. Auf diese Weise kann es in einem zweiten Reaktionsschritt in geschmolzener Form mit dem ebenfalls geschmolzenen Glycolid polymerisieren. Hieraus entsteht ein kristallines Block-Copolymer. Die Menge an Präpolymer in der Mischung beläuft sich auf 60-80 mol%. Sie liegt gegenüber dem Glycolid-Homopolymer somit dominant vor. Neben „weichen“ Blöcken, bestehend aus dem Copolymer aus ϵ -Caprolacton und Glycolid, sind zudem relativ kurze „harte“ Blöcke aus dem Glycolid-Homopolymer zu finden. Erstere verleihen dem Produkt eine gewisse Nachgiebigkeit, um als Nahtmaterial gehandhabt zu werden. Dahingegen verbessern die harten Blöcke die physikalischen Eigenschaften sowie die Reißfestigkeit des Copolymers *in vivo*.^[305] Als weiteres Copolymer wurde bereits das Block-Co-Polymer Poly(Lactid-co-Glycolid-co-Caprolacton) hergestellt, bei dem neben PCL und PGA ebenfalls PLA verarbeitet wurde. Untersuchungen ergaben, dass eine Erhöhung des PCL-Gehaltes die Kristallinität der Probe verringert.^[306]

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fasern handelt es sich ebenfalls um ein PCL-PGA-Komposit. Die kommerziell erhältlichen Fasern der Firma Resorba sind unter dem Namen Glycolon® bekannt. Die beiden Materialbestandteile copolymerisieren hier in einem bestimmten Verhältnis. Die monofilen Fäden werden als abbaubares Nahtmaterial verkauft. Laut Herstellerangaben sinkt die Reißkraft von Glycolon® nach sieben Tagen auf 30 % ab.^[307] Aufgrund der kommerziellen Erwerbbarkeit der Fasern ist es kaum möglich, weitere Daten zur genauen Zusammensetzung sowie zu den physikochemischen Eigenschaften zu erhalten, sodass nicht weiter darauf eingegangen werden kann.

2.4.2 Verarbeitung der Polymere und Nutzung als Biomaterialien

Sowohl PCL als auch PGA können auf unterschiedliche Weise verarbeitet werden, um spezifisch als Biomaterialien Anwendung zu finden. Aufgrund der leichten Formgebung können neben Partikeln ebenfalls einzelne Fasern sowie Fasermatten hergestellt werden.

Partikuläre Systeme. Als Mikro- oder Nanopartikel werden die beiden Materialien schon vielfach in *Drug Delivery*-Systemen eingesetzt. Mikropartikel bieten hier die Möglichkeit der oralen Aufnahme sowie Injektion.^[308] Sie weisen zudem ein organspezifisches Freisetzungsprofil auf, sodass bspw. auf pH-sensitivem Weg Ellagsäure spezifisch durch Mikropartikel im Darm von Ratten freigesetzt wurde.^[308,309] JAMEELA *et al.* konnten von PCL-Mikrosphären genug Protein in PBS freisetzen, um das Material als Impfstoffträger zu nutzen, da eine Langzeitfreisetzung von Polypeptiden / Proteinen mithilfe von PCL möglich sei.^[310] Weiterhin konnte bei Patienten nach der oralen Aufnahme von Mikrosphären aus dem Copolymer PLGA, welche mit dem Impfstoff CS6 beladen waren, ein positives Ergebnis erzielt werden.^[311] Im Gegensatz

dazu können Nanopartikel in kolloidaler Form als *Drug Delivery*-System im Organismus eingesetzt werden.^[312] GOU *et al.* entdeckten, dass PCL-PEG-PCL-Nanopartikel nach acht Tagen 70 % des eingelagerten Wachstumsfaktors bFGF (*basic fibroblast growth factor*) freisetzen konnten.^[313] Nachdem derselbe Wirkstoff an Tetronic®-PCL-Heparin-Micellen angebunden wurde, konnte er innerhalb von zwei Monaten wieder abgegeben werden. Der verzögerte *Release* des bFGFs wurde auf die Wechselwirkung mit Heparin zurückgeführt.^[314] Daneben war es CHAPPELL *et al.* möglich, mithilfe von PLGA-Nanopartikeln die Arteriengefäße von Mäusen zu verbessern. Dazu beluden sie die Partikel mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*). Sowohl der Durchmesser als auch die Anzahl der kollateralen Blutgefäße erhöhte sich.^[315]

Faserige Systeme. Fasern aus PGA und PCL können auf den unterschiedlichsten Wegen produziert werden, um gezielt als Biomaterialien eingesetzt zu werden.^[288,299,316] Die verschiedenen Verfahren werden im Folgenden erläutert. Im Rahmen des *Melt Spinnings* werden die Polymere in einem ersten Schritt geschmolzen, um danach gefiltert und durch eine Spinndüse gespritzt zu werden. Anschließend werden sie unterhalb ihrer Erstarrungs- bzw. Glastemperatur abgekühlt und aufgerollt.^[317–322] Somit war es der Arbeitsgruppe um CHARUNDA *et al.* möglich, PCL-Fasern mit Durchmessern von 490-910 µm herzustellen. Sie variierten hier die Parameter Temperatur, Extrusionsrate, Aufrollrate sowie das Ziehverhältnis.^[320] Mithilfe des *Melt Spinnings* wurden zudem die ersten synthetisch hergestellten, absorbierbaren Nahtmaterialien aus PGA generiert. Neben einer hohen Festigkeit wiesen sie eine passende Absorptionsrate auf und riefen in der Anwendung minimale Gewebereaktionen hervor.^[82] Als Monocryl®^[84] wurden so Fasern aus einem PGA-PCL-Blockcopolymer von BEZWADA *et al.*^[83] hergestellt. Neben einer reduzierten Degradationsdauer *in vivo* in Ratten von 91 bis 119 Tagen weisen die Fasern ebenfalls eine minimale Gewebereaktion auf. Um Polymere zu verarbeiten, die sich nicht schmelzen lassen, wird im Gegensatz dazu das *Wet Spinning / Dry Spinning* angewendet. Die Polymere müssen dazu in einem ersten Schritt in einem passenden Lösungsmittel gelöst werden. Nach dem anschließenden Filtern und Entlüften wird die Lösung in beiden Fällen durch eine Spinndüse gespritzt. Beim *Wet Spinning* flocken die Fasern nun in einem anderen Lösungsmittel aus. Im Gegensatz dazu verdampft das ursprüngliche Lösemittel beim *Dry Spinning* lediglich.^[323] Auf diese Weise konnten schon PCL-Fasern von TUZLAKOGHU *et al.*^[324] mit Durchmessern um 100 µm, von WILLIAMS *et al.*^[325–327] um 150 µm und von PUPPI *et al.* um 200-250 µm generiert werden. Anwendung fanden diese sowohl im Bereich des *Tissue Engineering* als auch in *Drug Delivery*-Systemen. Auch aus dem Copolymer PLGA konnten von NELSON *et al.*^[328] erfolgreich monofile Fasern mit Durchmessern <30 µm erzeugt werden. Die dritte Möglichkeit, um Polymerfasern herzustellen, bietet das *Electrospinning*. Auch in diesem Fall wird eine Polymerschmelze bzw. -lösung zunächst durch eine Spinndüse gespritzt, um anschließend jedoch in einem elektrischen Feld zu Fäden gesponnen zu werden.

Auf diese Weise stellten ZHU *et al.*^[329] PCL-Fasern mit Durchmessern von 100 nm bis 10 µm her. Sie variierten hierzu spezifische Parameter, wie die angelegte Spannung oder die Fließgeschwindigkeit. Daneben war es YOU *et al.*^[299] möglich, mittels *Electrospinning* PGA-Fasern mit einem Durchmesser um 300 nm herzustellen. Diese Fasern wiesen eine geringe Größenverteilung auf. Ein Anwendungsbereich dieser Fasern umfasst absorbierbare Nahtmaterialien zur Wundverschließung. Weiterhin konnten schon zahlreiche *Drug Delivery*-Systeme etabliert werden, die auf PGA / PCL-Fasern basieren. Versponnen zu einzelnen Netzen können die Fasern als *Scaffolds* im *Tissue Engineering* eingesetzt werden.^[277–283] SIRI *et al.*^[276] erzeugten auf diese Weise PCL-*Scaffolds*, welche beschichtet mit Laminin die Zellanbindung verbesserten.

Die Einarbeitung von Wirkstoffen kann jedoch auch schon während der Herstellung erfolgen. Dazu werden im Folgenden verschiedene Möglichkeiten vorgestellt. Eine Variante der Wirkstoffearbeitung stellt dabei das *Blend Electrospinning* dar, bei der die freizusetzende Substanz zunächst mit der Polymerlösung vermischt wird. Anschließend wird das Gemisch zu Fasern versponnen.^[85] Der Wirkstoff lagert sich vornehmlich am äußeren Rand der entstandenen Fasern an.^[330] Im Gegensatz dazu werden beim *Emulsion Electrospinning* die organische Polymerlösung und die wässrige Wirkstofflösung gleichzeitig miteinander versponnen.^[331] Auch beim *Co-axial Electrospinning* wird mit zwei Lösungen gearbeitet, welche mithilfe von zwei konzentrisch angeordneten Spindüsen in einem elektrischen Feld die gewünschten Fasern generieren. Hierbei lagert sich der Wirkstoff jedoch in der Mitte der Fasern an.^[332,333] Mithilfe der erläuterten Methoden ergaben sich schon zahlreiche Anwendungen. So konnten PUPPI *et al.*^[334] *Scaffolds*, bestehend aus PCL-Fasern, mit Enrofloxacin (EF) und Levofloxacin (LF) beladen und CHANG *et al.*^[335] Gentamicinsulfat (GS) in PCL Fasern einarbeiten, um anschließend deren Freisetzung zu testen. Daneben integrierten MERRELL *et al.*^[336] Curcumin und LUONG-VAN *et al.*^[337] Heparin in Fasern aus PCL, sodass eine verbesserte Wundheilung erzielt wird. Die beiden Substanzen konnten über einen Zeitraum von einigen Tagen bis zu fünf Wochen von den Fasern freigesetzt werden. Außerdem konnte Heparin auch in PLGA-Fasern integriert werden.^[86] Zudem arbeiteten BUSCEMI *et al.*^[338] an biodegradierbaren Stents aus PGA-Fasern, in welche zuvor Wirkstoffe zur Wundheilung, wie Aspirin oder Heparin, eingearbeitet werden sollen.

Anwendung in der neuronalen Regeneration. Weitere Anwendungen der beiden Materialien in unterschiedlicher Verarbeitung lassen sich im Bereich der Regeneration von Nerven finden. So konnten PGA und PCL sowohl in poröser als auch dichter Form sowie versponnen zu Fasern bei der Nervenleitung etabliert werden. DELLON *et al.*^[271] setzten PGA erfolgreich ein, um periphere Nerven zu regenerieren. Sie erzeugten dazu einerseits Nervenleitröhren aus dichtem PGA und andererseits Netze aus verwobenen PGA-Fasern. Weiterhin konnten DEN DUNNEN *et al.*^[272] ein PCL / PLLA-Copolymer nutzen, um eine Langzeitregeneration von Nerven

zu erreichen. Hierfür synthetisierten sie Röhren, die aus einer dichten gefolgt von einer porösen Schicht des Copolymers aufgebaut sind.

2.5 Funktionalisierung der verwendeten Polymerfasern für biomedizinische Anwendungen

Die Oberfläche von Polymerfasern kann nach deren Herstellung auf vielfältige Weise funktionalisiert werden, um anschließend biologisch aktive Moleküle physikalisch sowie chemisch anzubinden. Folglich können die Fasern spezifische Anwendung in der Biomedizin, wie im Rahmen des CIs, finden.

2.5.1 Oberflächenfunktionalisierung

Die Einführung von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern verändert nicht nur die Anbindungsmöglichkeiten für spätere Wirkstoffe, sondern verbessert zudem die Adhäsions- sowie Benetzungseigenschaften der Oberfläche. Folglich werden nicht nur die Biokompatibilität, sondern auch die Zelladhäsion und -vermehrung optimiert. Das wird im Folgenden für die hier verwendeten Fasern gezeigt.

Mithilfe der Plasmabehandlung ist es möglich, sowohl Carboxyl- als auch Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern zu erzeugen. Erstere entstehen unter Nutzung von Sauerstoff bzw. Luft als Plasmagas, wohingegen letztere durch Ammoniak-Gas generiert werden.^[339–343] Sowohl an PCL- als auch an PGA-Fasern wurde dieses Verfahren schon vielfach untersucht.^[283,344–347] Dahingegen ist die Methode des nasschemischen Ätzens von Vorteil, wenn auch weiter innenliegende Polymerstränge einer Fasermatte modifiziert werden sollen. Im sauren sowie im basischen Milieu können die Estergruppen an der Oberfläche der Fasern hydrolysiert werden, um Carboxyl- und Hydroxylgruppen zu generieren.^[348–351] So wurden schon PCL- und PGA-Fasern erfolgreich mit dieser Methode unter Nutzung einer basischen NaOH-Lösung behandelt.^[277,352] Wenn positive Ladungen bzw. Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern etabliert werden sollen, bietet sich im Rahmen der Aminolyse die Verwendung von Diaminen an. Hierbei bindet eine Aminogruppe kovalent an die Estergruppe der Polymerfasern, wohingegen die zweite Aminogruppe für weitere Zwecke zur Verfügung steht. Somit konnte an die aminolysierten Fasern aus dem Poly- ϵ -Caprolacton Copolymer PLLC (Poly(L-Lactid-Co-Caprolacton)) Fibronectin als zelladhäsives Protein angelagert werden.^[353]

2.5.2 Anbindung und Freisetzung der Wirkstoffe

Um die biologisch aktiven Moleküle, wie HS, BDNF oder Laminin, auf die Polymerfasern aufzubringen, gibt es zwei zu unterscheidende Möglichkeiten. Einerseits können die Wirkstoffe an die Oberfläche der Fasern chemisch angebunden werden, andererseits ist auch eine physikalische Adsorption der Substanzen möglich.

Physikalische Adsorption. Die Wirkstoffanbindung durch eine physikalische Adsorption ermöglicht die Etablierung eines lokalen *Drug Delivery*-Systems, da die zumeist geladenen Biomoleküle auf diese Weise ihre biologische Aktivität behalten.^[86] Eine Adsorption ist hier möglich sowohl über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie über hydrophobe Wechselwirkungen.^[354] So können zum Beispiel an mit Heparin oder HS beschichteten Fasern über intermolekulare Wechselwirkungen verschiedene Wachstumsfaktoren adsorbieren.^[355–359] Zudem ist eine Adsorption von Nanopartikeln, welche zuvor mit dem gewünschten Wirkstoff beladen wurden, an die Fasern möglich. So konnte eine stabile Anhaftung von Polystyrol-Nanopartikeln (PSNPs) auf Polymethylmethacrylat (PMMA) Fasern mithilfe *des Electrospraying*s erreicht werden.^[360] Eine weitere Möglichkeit stellt das *Layer-by-Layer* (LbL) Verfahren dar. Die Faseroberfläche wird dabei alternierend mit kationischen und anionischen Schichten belegt, welche über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren und mit den Wirkstoffen bestückt werden.^[361–365] Beispielhaft konnte so ein *Drug Delivery*-System aus alternierenden Schichten von Polystyrolsulfonat (PSS) und Polyallylaminhydrochlorid (PAH), in welche Goldnanopartikel eingearbeitet wurden, auf PS-Fasern etabliert werden.^[366]

Chemische Anbindung. Um eine stabile Anbindung der Biomoleküle auf der Faseroberfläche zu erreichen, müssen diese mithilfe der zuvor generierten funktionellen Gruppen (Carboxyl-, Hydroxyl-, Aminogruppen) chemisch immobilisiert werden. Es ist jedoch möglich, dass die nun kovalent angebondenen Wirkstoffe hierdurch einen Teil ihrer biologischen Aktivität verlieren. Einen besonderen Stellenwert haben in diesem Zusammenhang das Kupplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und der Stabilisator *N*-Hydroxysuccinimid (NHS). Sie dienen in der Vergangenheit schon oftmals der Aktivierung von Carboxylgruppen auf Polymerfaseroberflächen, um anschließend primäre Amine anzubinden. Auf diese Weise konnte Kollagen bereits erfolgreich immobilisiert werden.^[343,367] Außerdem dienen hydrophile Polymerlinker als Abstandhalter zwischen den Biomolekülen und der Oberfläche der Fasern, sodass nicht nur eine verbesserte Wechselwirkung mit den Zellen ermöglicht wird. Die anhaftenden Substanzen können sich zudem nicht mehr gegenseitig sterisch behindern. Ein weiterer Vorteil liegt in der Vermeidung von Kopplungen zwischen den einzelnen Biomolekülen, deren funktionelle Gruppen ansonsten ihre Aktivität verlieren können. Zum Beispiel konnte auf diese Weise mithilfe des Abstandhalters Polyethylenglykol (PEG) der Wachstumsfaktor rhEGF (*recombinant human epidermal growth factor*) auf der Oberfläche von PCL-Fasern angebonden werden.^[87]

2.5.2.1 Heparansulfat

Um das Glykosaminoglykan HS für eine spätere biomedizinische Anwendung auf Substratoberflächen zu immobilisieren, wurden schon vielfach Studien durchgeführt. In diesem Rahmen spielen die zuvor genannten Methoden der physikalischen Adsorption sowie chemischen Anbindung des Wirkstoffes eine entscheidende Rolle. Diese werden im Folgenden in Bezug auf das HS genauer erläutert.

Physikalische Adsorption. Eine Möglichkeit der physikalischen Adsorption stellt die Modifizierung der Substratoberfläche mit positiv geladenen Gruppen dar, sodass die negativ geladenen Glykosaminoglykane, wie HS oder das strukturell ähnliche Heparin, ionisch angebonden werden können. Hierfür wurden schon quartäre Ammoniumsalze sowie Polymere mit tertiären / quartären Aminogruppen genutzt, welche dauerhaft positiv geladen vorliegen.^[368] Polymeroberflächen konnten bereits mit Tridodecyl-methylammoniumchlorid (TDMCA) modifiziert werden, um Heparin erfolgreich ionisch anzubinden.^[369] Zusätzlich konnten unterschiedliche Materialien, wie Glas oder Polyurethan, von der Arbeitsgruppe um BARBUCCI einer Heparinisierung unterzogen werden, nachdem diese mit positiv geladenen Poly(amido)aminen beschichtet wurden.^[370] Obwohl die Oberflächen auf diese Weise dauerhaft positiv geladen vorliegen und so das negativ geladene Glykosaminoglykan ionisch anbinden können, ist diesen Methoden gemein, dass die Moleküle nur über einen kurzen Zeitraum stabil angebonden bleiben (3 h – 100 h). Aus verschiedenen Gründen werden die Moleküle mit der Zeit von der Oberfläche freigesetzt.^[368,369] Forscher fanden heraus, dass eine vorherige Behandlung der Substratoberflächen mit dem basischen Guadinin dem entgegenwirken kann. Genau wie die quartären Aminogruppen bildet auch das Guadinin ionische Bindungen zu den Glykosaminoglykanen aus, da es über einen großen pH-Wert-Bereich protoniert und damit positiv geladen vorliegt. Zusätzlich wechselwirkt es über Wasserstoffbrückenbindungen mit den GAGs, was schlussendlich die Anbindung der negativ geladenen Biomoleküle stabilisiert.^[368] Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um VOLPI^[371] HS über elektrostatische Wechselwirkungen an Korallenpartikel adsorbieren, sodass Implantate besser in den Knochen einheilen können. Auch in der Parodontosetherapie finden die Glykosaminoglykane weitere Anwendung. So war es LUONG-VAN *et al.*^[372] möglich, mithilfe des *Electrospinnings* HS in PCL-Scaffolds einzuarbeiten. Nachdem anschließend der Wachstumsfaktor rhBMP-2 angebonden wurde, konnte nach der Implantation in Ratten die Zellausbreitung sowie osteogene Differenzierung gefördert werden. Zudem konnte die Arbeitsgruppe Heparin aus PCL-Fasermatten über einen Zeitraum von 14 Tagen zur Hälfte freisetzen, um in der Anwendung als *Drug Delivery*-System für Gefäßkrankheiten die Ausbreitung von vaskulären glatten Muskelzellen zu verhindern.^[337] WOODRUFF *et al.*^[373] ermöglichten dagegen die gleichbleibende Freisetzung von HS über mehrere Tage aus Fibrinkleber-*Scaffolds*, um sowohl die Knochenregeneration als auch die Wundheilung zu stimulieren.

Chemische Anbindung. Die kovalente Anbindung von Glykosaminoglykanen an Substratoberflächen wurde auch schon vielfach erforscht. Untersuchungen von PIEPER *et al.*^[89] zur festen Anbindung verschiedener GAGs an Kollagenmatrizen im Laufe ihrer Vernetzungen mit den Kupplungsreagenzien EDC / NHS ergaben, dass die einzelnen Stränge der GAGs nicht nur in der Matrix, sondern auch an ihrer Oberfläche zu finden waren. Hierdurch konnten nach einer Implantation im Körper neben dem Wachstum von Blutgefäßen auch die Gewebereaktion und Biokompatibilität verbessert werden.^[90] Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe den Wachstumsfaktor bFGF mithilfe des HS über einen längeren Zeitraum stabil anbinden, um eine vermehrte Gewebekonstruktion in Ratten zu erzeugen.^[101] In einer weiteren Studie wurden Kollagen-GAG-Membranen mittels Glutaraldehyd bzw. Hochtemperatur-Hydratisierung vernetzt, sodass eine wundheilende und gewebeanregende „künstliche Haut“ erschaffen werden konnte.^[374] Des Weiteren ließen sich HS-Endothelzellen photochemisch an Cellulosemembranen (mittels 4-Azido-1-fluoro-2-nitrobenzol (AFNB)) anbinden, welche an der Oberfläche Aminogruppen enthalten.^[375] ROHMAN *et al.*^[376] konnten daneben Heparin an die terminalen Aminogruppen der mit Polyethylenglykol modifizierten PLGA-Substrate immobilisieren, indem ebenfalls EDC verwendet wurde.

Um sowohl das Einwachsen des CI nach der Insertion als auch die Regeneration der SGNs zu fördern, soll das HS im Rahmen dieser Arbeit kovalent an die Polymerfasern angebunden werden. Hierfür wurde die Nutzung von EDC und NHS nach Verfahren von PIEPER *et al.*^[90] sowie SCHMIDT *et al.*^[377] gewählt. Ergänzend zu der schon beschriebenen Methode von PIEPER *et al.*^[90] fand nach dem zweiten Verfahren eine Anbindung des Wirkstoffes Heparin an die Aminogruppen ein mit APMS funktionalisierten Titandioxidoberfläche statt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll eine stabile Amidbindung zwischen der Polymerfaser und dem HS entstehen. Hierzu illustriert Abbildung 17 den zugehörigen Mechanismus.

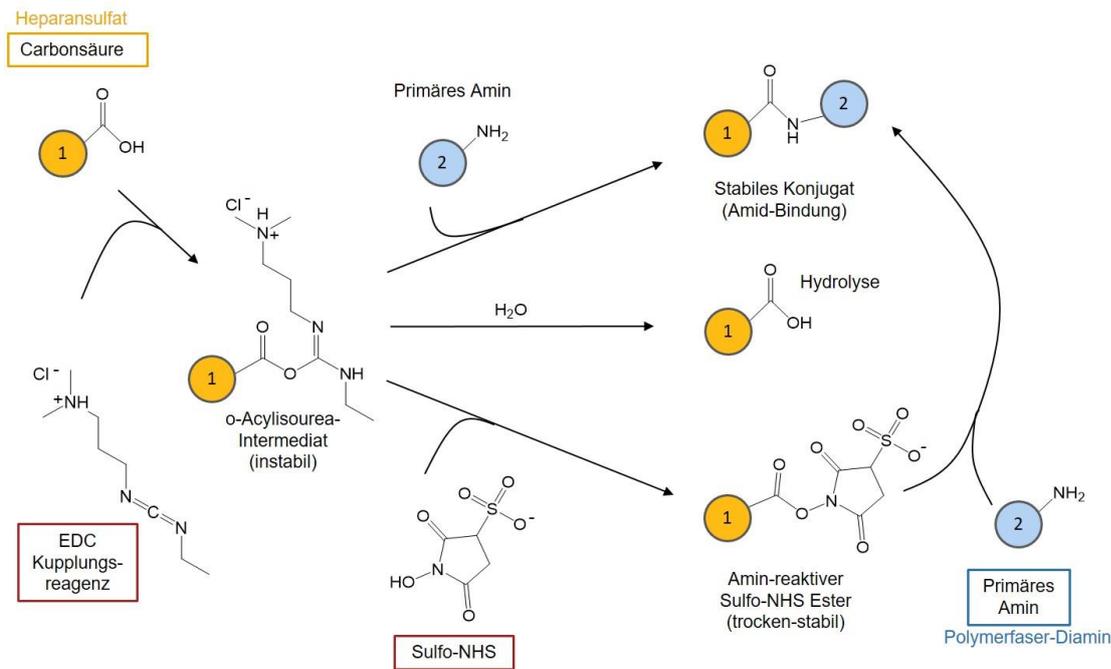


Abbildung 17: Mechanismus der Anbindung von HS an die aminolysierten Polymerfasern unter Nutzung des Kupplungsreagenz EDC und des Stabilisators NHS (hier als wasserlösliches Sulfo-NHS). Nach Lit.^[378]

Zu Anfang reagiert die reaktive Gruppe des HS, die Carboxylgruppe, mit dem Kupplungsreagenz EDC zu dem Zwischenprodukt o-Acylisourea. Dieses kann jedoch leicht durch den nucleophilen Angriff einer primären Aminogruppe, welche sich in diesem Fall auf der Oberfläche der modifizierten Polymerfaser befindet, zerstört werden. Wenn diese Aminogruppe mit der ursprünglichen Carboxylgruppe des Wirkstoffes eine Reaktion eingeht, wird eine stabile Amidbindung ausgebildet. Zeitgleich entsteht als EDC-Nebenprodukt ein wasserlösliches Harnstoff-Derivat (oberer Pfad). Das Zwischenprodukt o-Acylisourea wird in wässriger Lösung jedoch leicht hydrolysiert, sodass es zur ursprünglichen Carboxylgruppe und dem N-unsubstituierten Harnstoffderivat zurück reagiert (mittlerer Pfad). Dem entgegen wirkt die Stabilisation des Zwischenproduktes durch NHS, welches einen stabilen NHS-Ester hervorbringt. Zudem fördert dies eine effizientere Kupplung an das primäre Amin. Letztendlich bildet sich die gewünschte Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des HS und der Aminogruppe der Polymerfaser (unterer Pfad). Alternativ läuft diese Reaktion ebenfalls zwischen den durch EDC / NHS aktivierten Carboxylgruppen auf der Polymerfaseroberfläche und den basischen Gruppen des HS ab.^[379–383] Der zugehörige Mechanismus ist in Abbildung 18 dargestellt.

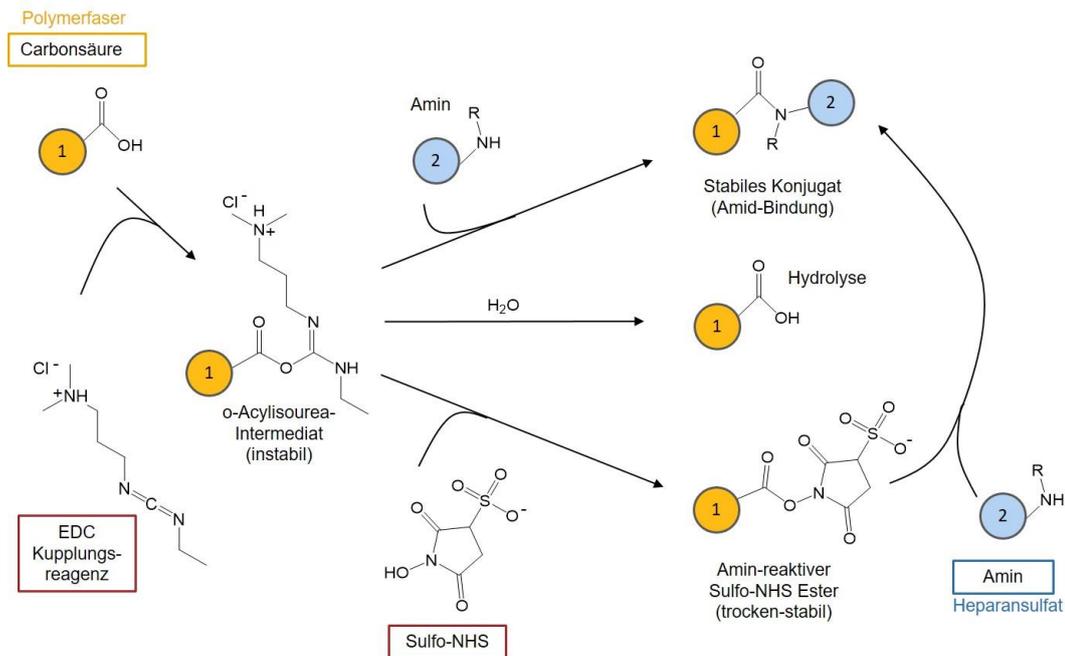


Abbildung 18: Mechanismus der Anbindung von HS an die unmodifizierten Polymerfasern unter Nutzung des Kupplungsreagenz EDC und des Stabilisators NHS (hier als wasserlösliches Sulfo-NHS) (R = Rest). Nach Lit.^[378]

Da die Reaktion am besten im leicht sauren Milieu stattfindet und keine externen Amino- oder Carboxylgruppen enthalten sein dürfen, wird der Puffer MES für die Kupplung verwendet.^[378,384]

2.5.2.2 BDNF

BDNF als Wachstumsfaktor für biomedizinische Anwendungen wurde schon vielfach untersucht. Die biologische Wirkung von BDNF für die Nutzung in der Cochlea sowie die verschiedenen Möglichkeiten zur Immobilisation des Wachstumsfaktors für weitere biomedizinische Anwendungen werden im Folgenden genauer erläutert.

Biologische Wirkung von BDNF. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen zeigen den wirksamen Effekt des Wachstumsfaktors an. BDNF-freisetzende Nanopartikel erhöhten bereits die Überlebensrate von SGNs *in vitro*. Der neuroprotektive Effekt des freigesetzten BDNFs konnte hier sogar nach einer Freisetzungsdauer von 39 d beobachtet werden. Die Nanopartikel können in das CI integriert werden, um dort ihre Wirkung zu entfalten.^[59] Nach KRANZ *et al.*^[43] hat die simultane Behandlung der SGNs *in vitro* mit BDNF und Rolipram eine erhöhte Überlebensrate der Neuronen zur Folge. Zudem erhöht diese Behandlung die Menge des endogenen BDNFs *in vitro*. Außerdem zeigten SCHEPER *et al.*, dass BDNF-exprimierende humane mesenchymale Stammzellen die Überlebensrate der SGNs *in vitro* erhöhen.^[385] Daneben fanden MILLER *et al.* *in vivo* heraus, dass die Überlebensrate der SGNs in den Ohren ertaubter Meerschweinchen durch die externe Zugabe von BDNF erhöht werden konnte.^[244] Angrenzend hierzu zeigten SHEPHERD *et al.*,^[26] dass eine kontinuierliche Freisetzung von BDNF mit gleichzeitiger elektrischer Reizung über vier Wochen den Gehalt an SGNs steigert.

Es sei jedoch nicht nötig, den Wachstumsfaktor dauerhaft bereitzustellen, um das Überleben der SGNs zu sichern. Weiterhin erzeugte die Zugabe von BDNF in die ertaubten Ohren von Meerschweinchen nach fünf bzw. 33 Tagen der Ertaubung einen Erhalt der bestehenden auditiven Neuronen. Hinzu kommt, dass sich neue Nervenenden über die gesamte Cochlea ausbildeten.^[46] Neben Meerschweinchen konnten MCGUINNESS *et al.*^[386] auch ertaubte Ratten erfolgreich mit BDNF behandeln. Im Gegensatz zu SHEPHERD *et al.*^[26] fand die Arbeitsgruppe um GILLESPIE *et al.*^[47] heraus, dass sich in ertaubten Meerschweinchen bereits regenerierte Neurone zurückbildeten, wenn sie nicht mehr mit BDNF stimuliert werden. Somit wird der Ansatz in der Hörforschung weiterverfolgt, um mithilfe von BDNF den Erhalt der SGNs zu erhöhen und das Hörvermögen zu verbessern.

Immobilisierung von BDNF für verschiedene biomedizinische Anwendungen. Darüber hinaus entdeckten YANG *et al.*^[387] sowie SEILER *et al.*,^[388] dass BDNF die Funktion von Netzhautimplantaten optimiert, sodass die visuelle Reaktion von Ratten verbessert werden konnte. Dazu wurde das Implantat zuvor mit PLGA-Mikrosphären, in denen BDNF enthalten ist, beschichtet. Weiterhin konnte BDNF an Aminogruppen von zuvor aminolysierten PCL-*Scaffolds* angebunden werden.^[389] HORNE *et al.* erreichten hierdurch eine Vermehrung sowie Differenzierung von kortikalen neuronalen Stammzellen. Das Protein konnte über eine zusätzliche Zwischenbindung mit SMCC (Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) verstärkt angebunden werden.^[389] FON *et al.*^[390] fokussierten sich in ihrer Studie darauf, BDNF-mimetische Moleküle im Rahmen des *Electrospinnings* in PCL-*Scaffolds* einzuarbeiten. Nachdem der Wirkstoff zunächst in einem *Burst Release* freigesetzt wurde, konnten nach 21 Tagen 65-90 % der Substanz abgegeben werden. Hierdurch konnte einerseits das Überleben von Neuroblasten und deren Migration in Richtung des Implantats verbessert werden. Andererseits wurde das Wachstum von Neuriten gefördert. Zudem konnte BDNF auch in biodegradierbare Hydrogele eingearbeitet werden.^[77] In der Cochlea von ertaubten Meerschweinchen erzeugte die Freisetzung des BDNFs eine erhöhte Überlebensrate der SGN. Dies konnte ebenfalls erreicht werden, indem BDNF von porösen Silica-Partikeln freigesetzt wurde.^[59,64] Dafür wurde der Wirkstoff sowohl an die sauren Gruppen der mesoporösen Silica-Suprapartikel^[162,391] als auch an die un- sowie aminofunktionalisierten nanoporösen Silica-Nanopartikel angelagert.^[59] Eine Freisetzung von bis zu 150 Tagen konnte beobachtet werden.^[391] Eine verlängerte Freisetzung der Wachstumsfaktoren von Substratoberflächen wird zudem, wie schon in den vorherigen Abschnitten erwähnt, durch Glykosaminoglykane gesteuert. Diesen ist es möglich, die Wachstumsfaktoren anzubinden. So zeigten TAN *et al.*^[27] die Immobilisierung von BDNF auf nanoporösen Peptid-Partikeln, welche zuvor mit dem HS-ähnlichen Heparin beschichtet wurden. Hier konnte eine Langzeitfreisetzung (70 Tage) des Wirkstoffs beobachtet werden, um das Überleben von Neuronen in ertaubten Meerschwein-

chen zu erhöhen. In Anlehnung daran konnte BDNF auf den mit Heparin beschichteten Fibrinmatrizen immobilisiert werden. Die Wirkstoffkombination resultierte in einer verlangsamten Freisetzung des BDNFs sowie in einem verbesserten Wachstum von Neuriten, sodass Anwendungen im Bereich der Nervenregeneration mithilfe von Nervenleitschienen denkbar sind.^[97]

Das BDNF soll im Rahmen dieser Arbeit nach Methoden von PIEPER *et al.*^[101] sowie HORNE *et al.*^[389] an die zuvor mit HS beschichteten Polymerfasern angebunden werden, um durch die anschließende verlängerte Freisetzung den Elektroden-Nerven-Kontakt zu verbessern.

2.5.2.3. Laminin

Neben den zuvor beschriebenen Wirkstoffen konnte auch Laminin schon vielfach auf Substratoberflächen immobilisiert werden. Hierdurch wurde sowohl die Zellanbindung als auch die Regeneration von Nerven gefördert. *In vivo* Versuche mit Laminin-beschichteten CI-Elektroden zeigten in diesem Rahmen eine erhöhte Überlebensrate der SGNs sowie einen verstärkten Auswuchs der Neuriten.^[105] In der aktuellen Forschung wird neben der Einarbeitung des Wirkstoffes in das Material auch an der kovalenten Anbindung und physikalischen Adsorption von Laminin auf den Substratoberflächen gearbeitet. Auf die verschiedenen Methoden wird im Folgenden genauer eingegangen.

Einarbeitung von Laminin sowie chemische Anbindung. Den Ansatz, Laminin in eine Polymermatrix einzuarbeiten, verfolgten SONG *et al.*,^[255] indem sie Laminin während der Herstellung in Polydioxanon / Kollagenfasern integrierten. Diese liegen parallel nebeneinander vor und fördern unter Freisetzung des Laminins das gerichtete Auswachsen von Neuriten entlang der Struktur. Eine Anwendung im Bereich der Neurogenese ist angedacht. Auch KOH *et al.*^[257] arbeiteten Laminin erfolgreich während des *Blend-Electrospinnings* in Fasern aus Polylactidsäure ein, welche anschließend das neuronale Wachstum förderten. Daneben konnten sie den Wirkstoff mithilfe der Carbodiimid-Chemie kovalent anbinden und erreichten dasselbe Ergebnis. Der zugehörige Mechanismus wurde bereits im Kapitel 2.5.2.1 genauer erläutert. Vergleichend hierzu konnten HUANG *et al.*^[256] Laminin an Filme aus PLGA erfolgreich mit Carbodiimiden kovalent anbinden. Die Versuche resultierten in einer erhöhten Zellanbindung, sodass Anwendungen im Bereich der Nervenregeneration denkbar sind. Auch an amino-modifizierte Substrate aus PCL konnte mittels EDC eine spezifische Laminin-Peptid-Sequenz kovalent angebunden werden, sodass Zellen besser anwachsen können.^[275] Alternativ banden YU *et al.*^[392] Laminin kovalent über ein Imidazol an Agarose an, sodass das Neuritenwachstum gefördert wurde. Weiterhin konnten MATSUDA *et al.*^[393] Chitosan mit Thiolgruppen beschichten. Diese reagierten in einem zweiten Schritt mit derselben endständigen Gruppe in Laminin-Peptiden. Über S-S-Bindungen konnte der Wirkstoff nun kovalent an das Substrat angebunden werden, um im Bereich der Nervenleitschienen seinen Einsatz zu finden.

Physikalische Adsorption. Es ist zudem möglich, Laminin adsorptiv auf Oberflächen mit u. a. sauren Gruppen aufzubringen. Die Arbeitsgruppe um KOH^[257] konnte neben den bereits beschriebenen Methoden Laminin ebenfalls an die Fasern aus Polylactidsäure adsorbieren, um neuronales Wachstum zu fördern. Auch zeigten HUANG *et al.*^[256], dass sie Laminin adsorptiv auf die Oberfläche von PLGA-Filmen aufbringen konnten. Die durch eine Plasmabehandlung erzeugten hydrophilen Gruppen erhöhten den Gehalt an angelagertem Laminin, sodass eine erhöhte Zellanbindung für Anwendungen in der Nervenregeneration erreicht wurde. In diesem Rahmen wurde Laminin ebenfalls erfolgreich auf Glasoberflächen adsorbiert, um das Anwachsen von Zellen zu fördern.^[239] Laminin konnte auf diese Weise ebenfalls auf Glas bzw. Plastiksubstraten adsorbieren, um zusammen mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF das Neuritenwachstum von menschlichen sensorischen Neuronen zu verbessern.^[70] Auch BÉDUEUR *et al.*^[106] lagerten Laminin adsorptiv an die sauren Gruppen der *Polymerscaffolds* aus Alginat / Carboxymethylcellulose an. Hierdurch wurde sowohl die neuronale Adhäsion als auch die Regeneration von Neuriten gefördert. Auch bei *Scaffolds* aus PCL-Nanofasern fand eine Beschichtung mit Laminin statt. SIRI *et al.*^[276] zeigten, dass eine Plasmabehandlung sowie eine anschließende Beschichtung mit Acrylsäure zu einer hydrophileren Oberfläche und damit zu einem höheren Gehalt an Laminin führt. Hierdurch wurde die Zellanbindung verbessert. Weiterhin war es FRANCIS *et al.*^[394] möglich, poröse *Scaffolds* mit longitudinal orientierten Kanälen mit Laminin zu beschichten. Die *Scaffolds* bestanden sowohl aus Alginat, welches lediglich saure Gruppen mit sich bringt, als auch aus Chitosan, welches zusätzlich basische Gruppen aufweist. Neuronale Explantate konnten erfolgreich anwachsen und bildeten Neuriten entlang der Kanäle aus, welche durch den Zusatz von Laminin signifikant höhere Längen aufwiesen. Somit kommt das Material für eine mögliche Anwendung im Bereich des gerichteten Wachstums von Neuriten infrage. Auch LENZA *et al.*^[395] konnten Laminin auf die mit NH₂-Gruppen modifizierten bzw. unmodifizierten bioaktiven SiO₂-Schäumen adsorbieren lassen. Lediglich indem sich die Schäume mit der Zeit auflösten, wurde der Wirkstoff freigesetzt, um im Bereich der Geweberegeneration eingesetzt zu werden.

Ähnlich wie dies die beschriebenen Versuche zeigen, ist es ein Ziel dieser Arbeit Laminin adsorptiv auf die un- bzw. amino-modifizierten Fasern aufzubringen. Genutzt wird hierfür ein Protokoll der AG WARNECKE der Medizinischen Hochschule Hannover.^[102] Auf diese Weise soll das immer noch biologisch aktive Laminin die Entwicklung der Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur zur Oberfläche des CIs unterstützen.

3 Materialien und Methoden

Das folgende Kapitel beschreibt zunächst die durchgeführten Synthesen und vollzogenen Zellkulturexperimente, um anschließend auf die physiko- sowie biochemischen Charakterisierungsmethoden einzugehen.

3.1 Synthesen und Zellkulturexperimente

In diesem Kapitel sind die Synthesevorschriften für die Funktionalisierung der Polymerfasern mit Aminogruppen sowie für die Immobilisierungs- und Freisetzungsexperimente mit den Fasern dargestellt. Es folgen Beschreibungen zur Durchführung von Degradationsversuchen mit den Fasern. Zudem wird auf den Nachweis der Oberflächenfunktionalisierung und der immobilisierten Wirkstoffe eingegangen. Im letzten Abschnitt wird die Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen erläutert. Für die Experimente wurde einzig Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$ verwendet. Gewonnen wurde dieses entweder über eine Anlage vom Typ *MicroPure* der Firma THERMO ELECTRON LED GMBH oder über eine Anlage vom Typ *Milli-Q® Integral System* der Firma MERCK MILLIPORE. Als Basismaterial dienten biodegradierbare Polymerfasern aus PGA / PCL vom Typ *Glycolon®* der Firma RESORBA. Ein Probenansatz bestand aus fünf Fasern, welche jeweils auf eine Länge von 3 cm zugeschnitten waren. Wenn nicht anders erwähnt, fanden die Versuche in einem Thermoschüttler der Firma BIOZYM SCIENTIFIC statt.

3.1.1 Amino-Modifizierung

Aminolyse

Um NH_2 -Gruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern zu generieren, wurden diese unter Nutzung einer organischen Diamin-Lösung der Aminolyse nach ZHU *et al.*^[353] unterzogen (Faser- NH_2). Als Reagenz wurde Ethylendiamin verwendet, dessen Struktur im Folgenden abgebildet ist.

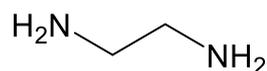


Abbildung 19: Struktur von Ethylendiamin.

Um die Estergruppen auf der Oberfläche der Fasern zu aktivieren und eine kovalente Anbindung der Diamine zu generieren, wurden die Fasern nach Ansätzen von SUN *et al.*^[350] sowie GHASEMI-MOBARAKEH *et al.*^[396] zunächst mit einem Carbodiimid als Kupplungsreagenz und NHS als Stabilisator behandelt.

Zu Anfang erfolgte die Vorbehandlung der Fasern für 10 min in einem 2 mL Eppendorf-Tube mit dem zugehörigen Volumen an Reaktionslösung bei RT und 1500 rpm. Bei der Reaktionslösung handelte sich um gelöstes *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und NHS in Dichlormethan (DCM). Die zugehörige Ansatzberechnung für einen Versuch ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Ansatzberechnung für einen Versuch zur Behandlung der Fasern mit DCC / NHS in DCM.

Chemikalie	$M / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$c / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	V / mL	n / mmol	m / mg
DCC	206.33	0.04	-	0.08	16.27
NHS	115.09	0.01	-	0.02	2.30
DCM	-	-	2	-	-

Hiernach wurden die Fasern für 2 min in 2 mL DCM gewaschen, bevor sie zum Milieu-Wechsel für 2 min in 2 mL Isopropanol behandelt wurden. Im nächsten Schritt wurde Ethylendiamin angebunden, indem die Fasern für 1 h in 2 mL einer 1.3 M Ethylendiaminlösung in Isopropanol behandelt wurden. Im Anschluss daran wurden die Fasern zunächst für 10 min mit 2 mL Isopropanol und danach zweimal mit 2 mL Reinstwasser gewaschen. Alle Reaktionsschritte erfolgten unter den zu Anfang angegebenen Reaktionsbedingungen. Abschließend wurden die Fasern unter Vakuum getrocknet. Abbildung 20 stellt schematisch die Anbindung von Ethylendiamin an die Polymerfaser dar.

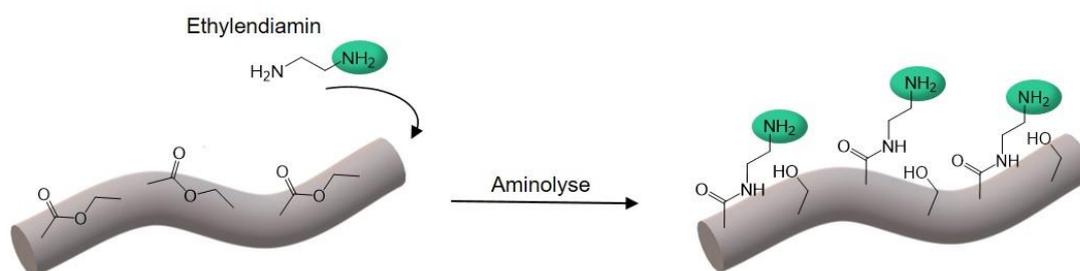


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Aminolyse. Ethylendiamin wird kovalent über die Estergruppen an die Polymerfaser (Faser, grau) angebunden, um Aminogruppen (grün markiert) auf der Oberfläche zu generieren (Faser-NH₂).

Nachweis der Aminogruppen mit FITC / RITC

Die Anwesenheit der Aminogruppen, generiert durch die erfolgreiche Anbindung der Diamine an die Polymerfasern, sollte mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe FITC / RITC nachgewiesen werden. Somit wurden nach LIN *et al.*^[397] jeweils fünf aminolysierte Fasern für 24 h unter Lichtausschluss bei RT in 2 mL einer 1 mM ethanolischen FITC / RITC Lösung bei 1500 rpm

behandelt. Als Referenz wurden zusätzlich Fasern verwendet, die zuvor keine Aminolyse durchlaufen haben. Nach der Behandlung wurden die Fasern zunächst zweimal mit jeweils 2 mL Ethanol für 2 min gewaschen. Im Anschluss wiederholte sich dieser Schritt mit Reinstwasser, bevor die Fasern unter Vakuum getrocknet wurden. Die Fasern wurden hiernach mithilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht.

3.1.2 Degradation der Polymerfasern

Die Fasern sollen in der Cochlea nach ihrer Funktionserfüllung abgebaut werden. Folglich wird in dieser Arbeit die Degradation der Fasern (un- sowie amino-modifiziert) untersucht. Dazu werden die Versuche den Bedingungen im Körper angepasst. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde pro Versuch eine kommerziell erworbene Faser in 3 cm lange Stücke geschnitten. Hiervon wurde jeweils ein Stück in 2 mL einer PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung bei 37 °C gelagert. Hierdurch sollten sowohl das physiologische Medium als auch die Körpertemperatur simuliert werden. Nach bestimmten Zeitabständen (direkt sowie nach 1, 2, 4, 6, 10, 14 Wochen Freisetzung) wurde die Faser aus der Lösung genommen, mit Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Sowohl die Faser als auch die PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung wurden im Hinblick auf die Degradation analysiert. Neben Massebestimmungen sowie REM- und IR-Aufnahmen dienten pH-Wert Messungen den Untersuchungen. Da dieses Vorgehen den späteren Freisetzungsexperimenten der Fasern mit den verschiedenen Biomolekülen (siehe Kapitel 3.1.6) ähnelt, können die vorliegenden Versuche auch einen Hinweis auf die Degradation der Fasern unter Freisetzungsbedingungen geben. Ergänzend hierzu wurden zudem die pH-Werte der *Release*-Lösungen aus den Freisetzungsexperimenten mit BDNF und HS bestimmt.

3.1.3 Immobilisierung von Heparansulfat

HS-Natriumchlorid aus der Rinderniere wurde kommerziell bei SIGMA-ALDRICH erworben. Zusätzlich diente fluoreszenzmarkiertes HS als Wirkstoff zur Immobilisierung, um die späteren Analysen zu unterstützen. Hierbei handelt es sich um lyophilisiertes Fluoresceinamin-gelabeltes HS aus der Schweineniere ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$), welches bei COSMO BIO CO., LTD. erworben wurde. Es weist einen Substituierungsgrad von 1.07 % auf. Die zugehörigen Versuche fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Hierfür wurden die verwendeten Fasern zunächst sterilisiert, indem sie mit Ethanol besprüht und anschließend 2 h mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Um HS kovalent an die Polymerfasern anzubinden, wurde eine Arbeitsweise nach PIEPER *et al.*^[90] sowie SCHMIDT *et al.*^[377] gewählt. In einem ersten Schritt wurden jeweils fünf Fasern (\cong ein Probenansatz) in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube für 30 min bei 4 °C und 300 rpm mit 0.5 mL des Lösungsmittels vorbehandelt. Im Falle des reinen HS handelte es sich

hierbei um eine wässrig / ethanolische (EtOH 40 % V / V) 50 mM MES-Puffer-Lösung (pH 5). Um die Fluoreszenzeigenschaften des gelabelten HS nicht zu stören, wurde bei diesen Inkubationsversuchen lediglich Wasser als Immobilisierungsmedium verwendet.

Im Anschluss an die Vorbehandlung wurden die Fasern für 24 h bei 4 °C mit 0.5 mL der Reaktionslösung in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube bei 300 rpm behandelt. Die Lösung beinhaltete neben dem Wirkstoff HS ($c_{\text{HS}} = 127 \mu\text{g mL}^{-1} \cong 200 \mu\text{M}$ für reines HS, $c_{\text{Fl.HS}} = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ für fluoreszentes HS²) zusätzlich geringe Mengen des Kupplungsreagenz EDC ($c_{\text{EDC}} = 18 \cdot 10^3 \mu\text{M}$) sowie des Stabilisators NHS ($c_{\text{NHS}} = 3600 \mu\text{M}$) im jeweiligen Medium, um das HS kovalent an die Fasern anzubinden (Faser-HS_(fl)(kov.) / Faser-NH₂-HS_(fl)(kov.))³. Weiterhin wurde untersucht, ob sich das HS auch ohne Kupplungsreagenzien ausreichend an die Fasern anlagert. Hierzu fanden dieselben Experimente statt, lediglich ohne EDC / NHS (Faser-HS_(fl) / Faser-NH₂-HS_(fl)). Nach der Reaktion wurden die Fasern zunächst für 10 min mit 2 mL des Lösungsmittels gewaschen und im Anschluss daran für jeweils 2 min mit einer 0.1 M Na₂HPO₄-Lösung sowie einer 1 M HCl-Lösung und Reinstwasser gewaschen. Diese Waschschriffe fanden jeweils unter den oben angegebenen Reaktionsbedingungen statt. Als Vergleich diente die bloße Behandlung der Fasern ohne den Wirkstoff HS.

Alle Inkubations- sowie Waschlösungen der Syntheseroute mit dem fluoreszenzmarkierten HS wurden bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Zudem wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des fl. HS ermittelt.

² Die leicht geringere Konzentration an fl. HS im Gegensatz zum reinen HS liegt zum einen an den erhöhten Kosten. Zum anderen haben Untersuchungen gezeigt, dass in den Inkubationslösungen ein genügender Überschuss an fl. HS vorliegt (siehe Anhang Abbildung 80).

³ Hier steht „fl“ für fluoreszenzmarkiert. Die Klammern „()“ zeigen an, dass es sich hierbei um Proben sowohl mit fluoreszenzmarkiertem als auch mit reinem HS ohne Farbstoff handelt.

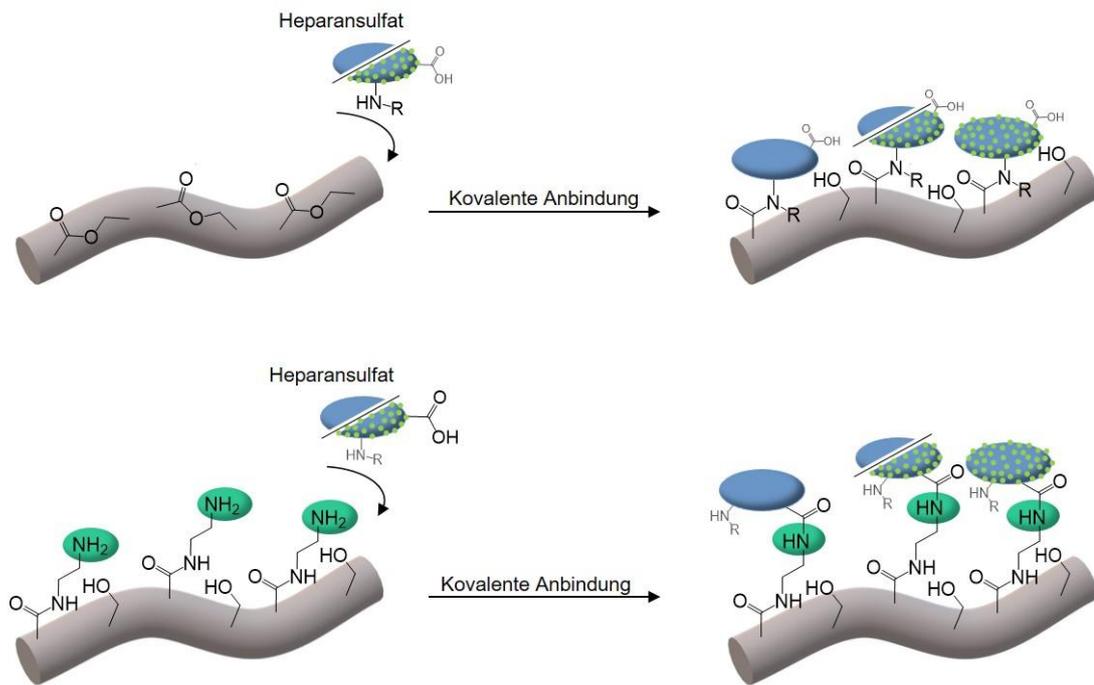


Abbildung 21: Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung von HS (blau) bzw. fluoreszenzmarkiertem HS (blau mit grünen Punkten) auf die unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten Fasern (grün markiert). Die zwei verschiedenen Typen an verwendetem HS sind optisch durch einen Strich voneinander getrennt. Die markierten funktionellen Gruppen am HS gehören sowohl zum reinen als auch zum fluoreszenzmarkierten Biomolekül. Die jeweils hervorgehobene funktionelle Gruppe geht unter Zuhilfenahme der Kupplungs- sowie Stabilisierungsreagenzien EDC / NHS eine Amidbindung mit der Faseroberfläche ein, um das HS kovalent anzubinden.

3.1.4 Immobilisierung von BDNF

Der rekombinante Wachstumsfaktor BDNF wurde in steril filtrierter und lyophilisierter Form kommerziell erworben (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Er wurde aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen und hatte eine Reinheit von 98 %. Als Immobilisierungsmedium wurde PBS verwendet, dem 0.1 % BSA als Stabilisator zugesetzt waren.^[398] Die zugehörigen Versuche fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Hierfür wurden die verwendeten Fasern zunächst sterilisiert, indem sie mit Ethanol besprüht und anschließend 2 h mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Die Immobilisierung des Wachstumsfaktors BDNF wurde in Anlehnung an die Arbeiten von SCHMIDT^[165] sowie von HORNE *et al.*^[389] und PIEPER *et al.*^[101] durchgeführt. Letzterer beschreibt die Anbindung von Wachstumsfaktoren an HS, was auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wird. Dazu wurden die zuvor mit HS behandelten Fasern nach der Synthese (3.1.2) sogleich weiterverarbeitet. Es wurde sich hierbei auf diese Sorte an Fasern beschränkt, an welche reines, nicht fluoreszenzmarkiertes HS kovalent angebunden wurde (Faser-HS (*kov.*) / Faser-NH₂-HS (*kov.*)). Die Fasern wurden zunächst für 10 min im reinen Lösungsmittel (PBS (+ 0.1 % BSA)) bei 4 °C und 300 rpm behandelt. Die anschließende Inkubation in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube in 0.5 mL einer 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BDNF Lösung erfolgte für 24 h unter gleichen Reaktionsbedingungen und lieferte die Proben Faser-HS (*kov.*)-BDNF bzw. Faser-NH₂-HS

(*kov.*) -BDNF. Als Referenz wurden sowohl die unmodifizierten als auch die mit Aminogruppen modifizierten Fasern lediglich mit der Pufferlösung ohne den Wirkstoff behandelt. Anschließend wurden die Fasern zum Waschen für 10 min unter gleichen Reaktionsbedingungen in 1 mL frischer PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung geschüttelt.

In einer Variation des Experiments wird untersucht, inwieweit sich die vorherige Behandlung mit HS auf die Immobilisierung des BDNFs auswirkte. Somit wurden zusätzlich Fasern der Syntheseroute unterzogen, die noch nicht mit HS in Kontakt gekommen waren (Faser / Faser-NH₂). Diese wurden lediglich mit BDNF beschichtet (Faser-BDNF / Faser-NH₂-BDNF). Sowohl die Reaktionslösungen als auch die Waschlösungen wurden für die anschließende Quantifizierung des BDNFs bei -20 °C eingefroren, um einen Verlust der biologischen Aktivität durch die Lagerung zu umgehen.

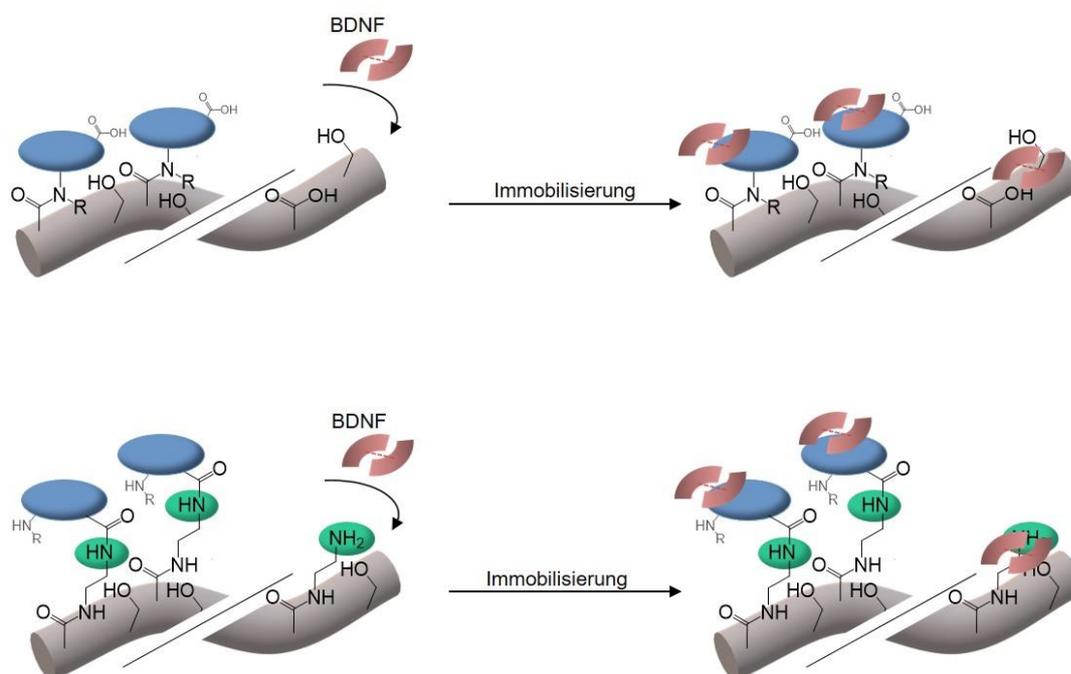


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Immobilisierung von BDNF (rot) auf die unmodifizierten (grau) bzw. amino-modifizierten Fasern (grün markiert) mit bzw. ohne HS (blau). Die verschiedenen Fasertypen sind durch einen Strich optisch voneinander getrennt.

Es war zudem von Interesse, die Menge an HS zu bestimmen, die während der Inkubation der Fasern in der BDNF-Lösung von den Proben freigesetzt und somit der späteren Anwendung nicht mehr zur Verfügung stehen würde. Aus Kostengründen konnte jedoch lediglich eine Inkubation im Medium, ohne BDNF, stattfinden. Für eine simple Analyse der freigesetzten Mengen dienten Fasern, die mit dem fluoreszenzmarkierten HS behandelt wurden (Faser-HS_{fl} (*kov.*) / Faser-NH₂-HS_{fl} (*kov.*); Faser-HS_{fl} / Faser-NH₂-HS_{fl} - Probenamen nach diesem Reaktionsschritt mit „-BDNF“ endend). Während die Fasern selbst für spätere Freisetzungversuche weiterverwendet wurden, konnten die jeweiligen Inkubationslösungen im Anschluss auf

den Gehalt an fluoreszentelem HS untersucht werden. Dazu wurden diese bis zur fluoreszenzspektroskopischen Messung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.1.5 Immobilisierung von Laminin

In diesem Kapitel wird die Immobilisierung des Laminins an die verschiedenen Fasertypen beschrieben. Zum einen wurde das Glykoprotein Laminin, entnommen aus der Maus, für die Anbindung an die Fasern verwendet. Es wurde steril filtriert in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) mit 0.15 M NaCl von INVITROGEN kommerziell erworben. Für weitere Analysen wurde zum anderen fluoreszenzmarkiertes Laminin für die Immobilisierungsversuche genutzt. Hierbei handelt es sich um Laminin aus der Maus, welches kovalent an Rhodamin gekoppelt wurde ($\lambda_{\text{ex}} = 535\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585\text{ nm}$). Es wurde steril und lyophilisiert erworben bei CYTOSKELETON, INC. Es weist eine Reinheit von $>90\%$ sowie eine Anbindung des Farbstoffes von $>85\%$ auf. Als Immobilisierungsmedium wurde eine sterile und phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verwendet, welcher 0.1 % bovines Serum-Albumin (BSA) zugesetzt wurden, um die Stabilität des Laminins zu erhöhen.^[398] Die zugehörigen Versuche fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Hierfür wurden die verwendeten Fasern zunächst sterilisiert, indem sie mit Ethanol besprüht und anschließend 2 h mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Die Anbindung von Laminin an die Fasern erfolgte nach einer Vorschrift der AG WARNECKE (HNO, MHH Hannover).^[102] Dazu wurden fünf Fasern ($\hat{=}$ ein Probenansatz) in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube mit 500 μL einer $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Lamininlösung überschichtet und für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 300 rpm geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Fasern für 10 min unter gleichen Reaktionsbedingungen mit Wasser gewaschen (Faser-LAM_(fl), Faser-NH₂-LAM_(fl))⁴. Als Vergleich diente die bloße Behandlung der Fasern im Immobilisierungsmedium ohne Laminin. Alle Inkubations- sowie Waschlösungen der Syntheseroute mit dem fluoreszenzmarkierten Laminin wurden bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zudem wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des fl. Laminins ermittelt.

⁴ Hierbei steht „fl“ für fluoreszenzmarkiertes Laminin. Die Klammern „()“ zeigen an, dass es sich hierbei um Proben sowohl mit fluoreszenzmarkiertem als auch mit reinem Laminin ohne Farbstoff handelt.

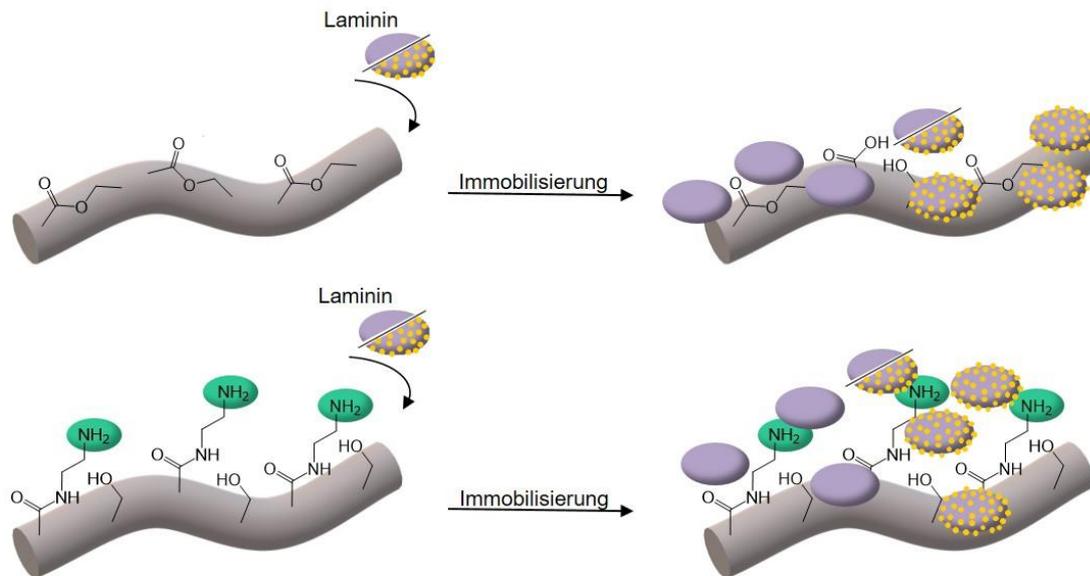


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Laminin (violett) bzw. fluoreszenzmarkiertem Laminin (violett mit gelben Punkten) auf die unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten Fasern (grün markiert). Die beiden Sorten an verwendetem Laminin sind optisch durch einen Strich getrennt. Das Laminin lagert sich um die Faser, wobei auf der unmodifizierten Faser während der Reaktion Carboxylgruppen generiert werden können.

3.1.6 Freisetzungsexperimente mit beladenen Fasern

Nach der Beladung der Fasern mit den Biomolekülen wurde untersucht, inwieweit diese wiederum von der Oberfläche freigesetzt werden. Die entsprechenden Versuche fanden ebenfalls unter aseptischen Bedingungen statt. Neben der Freisetzung des Wachstumsfaktors BDNF wurde die Abgabe von HS bzw. Laminin erforscht. Die verwendeten Proben für die Freisetzungsexperimente sind in Tabelle 2 dargestellt. Zusätzlich ist zu sehen, ob eine Analyse mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie oder dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) stattgefunden hat.

Tabelle 2: Proben für die Freisetzungsexperimente mit den dazugehörigen Detektionsmethoden.

Zu detektierendes Biomolekül	Probenname	Detektionsmethode	
		Fluoreszenz- spektroskopie	ELISA
Laminin	Faser-(NH ₂ -) ⁵ LAM _(fl)	x	
	Faser-(NH ₂ -)HS _{fl} (<i>kov.</i>)	x	
	Faser-(NH ₂ -)HS _{fl}	x	
Heparansulfat	Faser-(NH ₂ -)HS _{fl} (<i>kov.</i>)-,BDNF“	x	
	Faser-(NH ₂ -)HS _{fl} -,BDNF“	x	
	Faser-(NH ₂ -)HS (<i>kov.</i>) ⁶		
BDNF	Faser-(NH ₂ -)HS (<i>kov.</i>)-BDNF		x
	Faser-(NH ₂ -)BDNF		x

Die Proben wurden nach der Inkubation und den Waschschrinen direkt für die Freisetzungsexperimente weiterverwendet. Wenn zuletzt eine Beschichtung mit HS stattgefunden hat, wurden die Proben vor den *Release*-Versuchen einem Medienwechsel unterzogen, indem sie für 10 min bei 300 rpm und 37 °C in PBS (+ 0.1 % BSA) behandelt wurden. PBS stellt in diesem Fall ein Standardmedium zur Simulation der physiologischen Bedingungen im Körper dar. BSA wurde wiederum zur Stabilisierung der Biomoleküle hinzugefügt. Weiterhin wurde die menschliche Körpertemperatur simuliert, sodass die Versuche bei 37 °C abliefen. Für die Freisetzungsexperimente wurden die Fasern zunächst in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube in 1 mL der frischen PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung bei 37 °C eingelagert. Nach bestimmten Zeitabständen (1 d, 2 d, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d, 35 d, 70 d, 105 d) wurde der Überstand abgenommen, sodass wieder neue PBS(+ 0.1 % BSA)-Lösung hinzugefügt werden konnte. Die Überstände wurden ebenfalls für eine spätere Quantifizierung sowie *in vitro* Versuche bei -20 °C aufbewahrt. Limitiert wurde der *Release*-Zeitraum auf 105 Tage, in denen neun Überstände abgenommen

⁵ Die Klammern dienen der Tatsache, dass es sich bei den Proben sowohl um unmodifizierte als auch um amino-modifizierte Fasern handelt.

⁶ In diesem Fall wurden die Fasern nach 21 Tagen mittels pH-abhängiger Zetapotentialmessungen sowie durch Anlagerung verschiedener Sorten an Nanopartikeln untersucht

wurden. Für die Proben „Faser-(NH₂)-HS (*kov.*)“ wurde lediglich ein Zeitraum von 21 Tagen gewählt. Hier erfolgte die anschließende Analyse durch pH-abhängigen Zetapotentialmessungen sowie Anlagerung von NPs. Zur Veranschaulichung ist der *Release* schematisch in Abbildung 24 zu sehen.

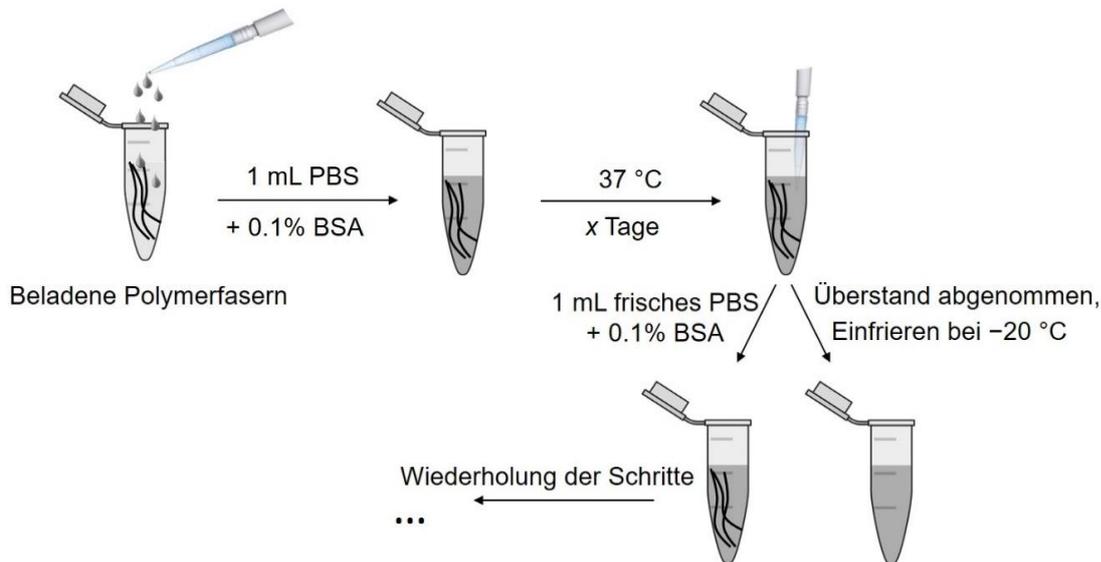


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Drug Release von den beladenen Fasern.

3.1.7 Qualitativer Nachweis der Anbindung von HS

Toluidinblau-Nachweis von HS

Um das an den Fasern zu immobilisierende HS nachzuweisen, wurde zunächst eine wässrige, leicht saure (1 mM HCl) Stammlösung des Farbstoffs (18.5 μ M) hergestellt, welche zusätzlich 0.2 % NaCl enthielt.

Für eine direkte Bestimmung wurden die zuvor mit dem HS behandelten Fasern (Faser-(NH₂)-HS / Faser-(NH₂)-HS(*kov.*)) sowie die Kontrollproben in einem 2 mL Eppendorf-Tube in 1 mL der Farbstofflösung eingelegt und für 30 s im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde diese Lösung mit 1 mL Hexan überschichtet, um erneut für 30 s im Ultraschallbad zu reagieren. Sogleich wurden 800 μ L der Toluidinblaulösung für die spätere UV / Vis-Messung abgenommen. Die Proben sowie die reine Toluidinblaulösung bzw. HCl / NaCl-Lösung wurden bei $\lambda = 631$ nm spektroskopisch vermessen, wobei jedes Mal ein Volumen von 200 μ L verwendet wurde.

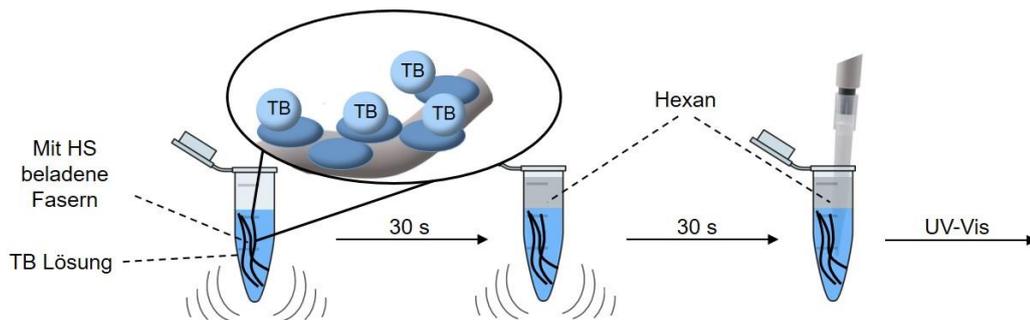


Abbildung 25: Schematische Darstellung des qualitativen Nachweises von HS (dunkelblau) auf den Fasern mithilfe von TB (hellblau). Der Farbstoff lagert sich an das auf den Fasern vorhandene HS an und wird so der Ursprungslösung entzogen. Nach dem Ausschütteln mit Hexan wird die restliche Farbstofflösung spektroskopisch vermessen. Der Übersicht halber wurden sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern in grau dargestellt.

Nachweis von HS auf den Fasern durch Anlagerung von Nanopartikeln

Eine weitere Möglichkeit, das angebundene HS auf den Polymerfasern nachzuweisen, ist es, die Oberflächenladung der Fasern zu nutzen. Aufgrund des stark sauren Charakters des HS^[88] wird davon ausgegangen, dass dieses die Ladung der Faseroberfläche beeinflusst. Durch Adsorption verschiedener Mengen an oberflächenmodifizierten Nanopartikeln an die Fasern soll die Immobilisierung des HS qualitativ nachgewiesen werden. Hier wurde ein großer Fokus auf die elektrostatischen Wechselwirkungen gelegt. Außerdem wird dadurch untersucht, ob sich auch nach 21 Tagen *Release* HS auf der Faser befindet. Hierzu wurden einerseits un- sowie amino-modifizierte nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNPs / NPSNPs-NH₂) ($d = 50$ nm) verwendet, welche im Arbeitskreis selbst hergestellt und seit Jahren etabliert sind.^[165,399] Zusätzlich wurden sowohl sulfat- als auch amino-modifizierte Polystyrol-Latexbeads (PSLBs-OSO₃⁻ / PSLBs-NH₂) ($d = 100$ nm) kommerziell erworben (SIGMA-ALDRICH). In allen Fällen wurde zunächst eine wässrige Suspension der NPs hergestellt ($V = 1$ mL, $c = 1$ mg mL⁻¹). Anschließend wurde jeweils eine Faser (Faser-(NH₂)-HS(*kov.*) sowie die zugehörige Kontrolle, vor bzw. nach 21 d *Release* bei 800 rpm über Nacht bei RT in einem 1.5 mL Eppendorf-Tube in der Lösung behandelt. Danach wurden die Fasern zweimal in Reinstwasser getaucht, um sie zu waschen und zuletzt unter Vakuum getrocknet. Die Proben wurden mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Zudem wurden von allen vier Sorten der NPs pH-abhängige Zetapotentialmessungen angefertigt.

3.1.8 Qualitativer Nachweis der Anbindung von Laminin und BDNF

Ein qualitativer Nachweis der Immobilisierung von Laminin und BDNF an die Faseroberfläche erfolgte über eine Abwandlung des *Sandwich*-ELISAs. Es konnte der jeweilige proteinspezifische *Sandwich*-ELISA der Firma BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY mit einem Ar-

beitsbereich von $31.2 - 2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ für BDNF und $156 - 10000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ für Laminin verwendet werden. Hierbei musste die Durchführung jedoch leicht modifiziert werden, da der ELISA auf den Fasern selbst und nicht in einer Wellplatte durchgeführt wurde. Somit haftete der zu untersuchende Antikörper schon auf einer Oberfläche (den Fasern) und musste lediglich weiter untersucht werden. Hierzu wurden die Fasern nach der Anbindung der Biomoleküle (siehe Kapitel 3.1.4 / 3.1.5) in ein neues 1.5 mL Eppendorf-Tube gegeben und an den Boden gedrückt, damit sie möglichst wenig Volumen einnehmen. Anschließend wurde die *Anti-human BDNF / Laminin antibody*-Lösung vorbereitet, um jeweils $100 \mu\text{L}$ der Lösung zu den Fasern zu pipettieren. Die Proben wurden anschließend für 60 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Währenddessen wurde die *Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex*- (ABC) Arbeitslösung angesetzt, wobei diese nicht eher als 1 h vor Nutzung erstellt werden sollte. Eine halbe Stunde vor ihrer Verwendung wurde sie auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach der Inkubation wurde die *antibody*-Lösung verworfen und die Proben dreimal mit $200 \mu\text{L}$ PBS-Puffer (0.01 M) für jeweils 1 min gewaschen. Anschließend wurden jeweils $100 \mu\text{L}$ der ABC-Arbeitslösung zu den Proben gegeben und diese für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Gleichzeitig wurde die *TMB color developing*-Lösung für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt. Nachdem die Inkubationslösung erneut verworfen und die Proben nun fünfmal für 1 min mit PBS-Puffer gewaschen wurden, konnten jeweils $90 \mu\text{L}$ der *TMB-color-developing*-Lösung in die Eppendorf-Tubes pipettiert werden. Nach 5-15 min Inkubationszeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sollte eine enzyminduzierte Blaufärbung erkennbar werden, wenn das jeweilige Protein vorhanden war. Anschließend wurden Fotos der Proben sowie der Kontrollen gemacht.

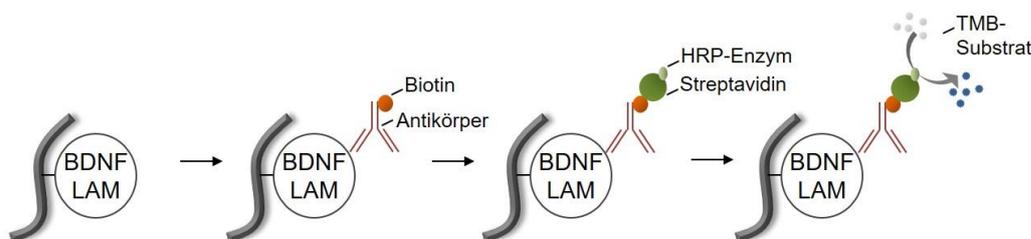


Abbildung 26: Schematische Darstellung des qualitativen Nachweises von BDNF bzw. Laminin auf den Fasern mithilfe des ELISAs.

3.1.9 Quantifizierung der freigesetzten Mengen an HS und Laminin durch Fluoreszenz

Die Quantifizierung der freigesetzten Mengen an HS sowie Laminin von den Fasern unter physiologischen Bedingungen wurde mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Hierzu wurden die Proben mit den fluoreszenzmarkierten Biomolekülen verwendet.

Zunächst wurde eine Kalibrationsreihe aus dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten HS sowie Laminin mit einem Bestimmungsbereich von $1000 - 0.975 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ erstellt ($1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $63 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $31 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $16 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,

4 ng·mL⁻¹, 2 ng·mL⁻¹, 1 ng·mL⁻¹). Nun wurden jeweils 200 µL sowohl der Kalibrationskonzentrationen als auch von PBS (+0.1 % BSA) als Blindprobe sowie der unverdünnten Proben in Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. Die spektroskopische Vermessung der Platte erfolgte sogleich bei den spezifischen Wellenlängen (HS: $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$, LAM: $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$).

Zusätzlich wurden die jeweiligen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der fluoreszenzmarkierten Stoffe bestimmt. Hierzu wurde neben der Kalibrationsreihe auch zehn Mal der Blindwert gemessen. Aus der Einordnung des Blindwertes in die Kalibrationsreihe konnte somit über die Leerwertmethode die Nachweisgrenze errechnet werden.^[400] Die Bestimmungsgrenze wurde durch die Verdreifachung der erhaltenen Konzentration der Nachweisgrenze abgeschätzt.

3.1.10 Quantifizierung der angebundenen sowie freigesetzten Mengen an BDNF über ELISA

Auch die Quantifizierung der angebundenen und freigesetzten Mengen an BDNF erfolgte mit dem ELISA Verfahren. Hierfür wurde derselbe *Sandwich*-ELISA Kit des Herstellers BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY verwendet, welcher auch dem qualitativen Nachweis der Biomoleküle auf den Fasern diene (siehe Kapitel 3.1.8). Die Bestimmung der immobilisierten BDNF Mengen fand dabei indirekt statt, indem die Konzentrationen in den verbleibenden Inkubations- und Waschlösungen bestimmt und diese von der bekannten Ausgangsmenge subtrahiert wurden. Hierbei fand die Durchführung nach den Vorgaben des Herstellers statt und wird im Folgenden für BDNF im Einzelnen beschrieben.

Um den jeweiligen Bestimmungsbereich zu erreichen (31.3 – 2000 pg·mL⁻¹), wurden die Proben nach den Richtlinien des Herstellers verdünnt. Anschließend wurde der Standard hergestellt (10000 pg·mL⁻¹) und aus diesem die Kalibrationsreihe bestehend aus sieben Konzentrationen erzeugt (2000 pg·mL⁻¹, 1000 pg·mL⁻¹, 500 pg·mL⁻¹, 250 pg·mL⁻¹, 125 pg·mL⁻¹, 62.5 pg·mL⁻¹, 31.3 pg·mL⁻¹). Danach wurden von jeder Probe und von jeder Kalibrationskonzentration 100 µL auf die Wellplatte gegeben, wobei alle Proben mindestens als Duplikate vermessen wurden. Die Wells waren hierbei schon mit monoklonalen Antikörpern speziell für BDNF vorbeschichtet. Zudem wurde der Probenverdünnungspuffer als Blindwert in zwei Wells pipettiert. Die Platte wurde nach dem Auftragen abgedeckt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Platteninhalt verworfen und die Platte ausgeklopft. Die weitere Durchführung entsprach derjenigen aus Kapitel 3.1.8. Die einzelnen Schritte wurden lediglich in den Wells durchgeführt und die Platte wurde nach den Waschrufen nicht nur von der Lösung getrennt, sondern auch zu genüge ausgeklopft, um etwaige Reste zu entfernen. Im letzten Schritt, der Farbreaktion, wurde die Inkubationszeit nach der Blaufärbung der ersten vier Kalibrationskonzentrationen gestoppt, indem 100 µL der sauren

Stopplösung in die Wells gegeben wurde. Dadurch fand ein Farbumschlag von blau nach gelb statt. Innerhalb der nächsten 30 min erfolgte die spektroskopische Vermessung der Wellplatte bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

3.1.11 Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen

Die Probenpräparation für die *in vitro*-Untersuchungen, welche in den Kapiteln 3.3.2. und 3.3.3 beschrieben werden, sind unter aseptischen Bedingungen durchgeführt worden, sodass die jeweiligen un- sowie amino-modifizierten Fasern zunächst unter UV-Licht sterilisiert und anschließend nur sterile Lösungen verwendet wurden. Alle Schritte fanden unter der sterilen Werkbank statt.

Zellkulturuntersuchungen mit einzelnen Spiralganglienneuronen. Neben den mit den Biomolekülen beladenen Fasern sowie Release-Überständen wurde auch ein Hauptbestandteil der Fasern, die Glykolsäure, auf ihre Kompatibilität hinsichtlich der SGNs untersucht.

Die Fasern wurden nach dem beschriebenen Immobilisierungsprozess (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) mit HS bzw. BDNF beladen. Dabei erfolgten die Versuche immer direkt vor der Durchführung der Zelltests, damit keine Lagerung der Fasern notwendig war. Diese wurden anschließend in kleine Stücke mit einer Länge von 5 mm geschnitten, um sogleich im Zelltest verwendet zu werden. Es wurden die unmodifizierten und amino-modifizierten Fasern jeweils mit bzw. ohne HS / BDNF-Beladung getestet.

Die Release-Überstände wurden bis zu den Zellkulturuntersuchungen, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und erst kurz vor der Zugabe auf die Spiralganglienneuronen aufgetaut. Sie wurden in einem 1:1-Verhältnis mit dem SGN-Medium zu den Zellen gegeben. In den Zellkulturuntersuchungen wurden sechs *Release*-Überstände bis zum 70. Freisetzungstag der un- sowie amino-modifizierten Fasern mit bzw. ohne HS / BDNF-Beladung getestet.

Die Glykolsäure wurde in fester Form in 1 mL Wasser gelöst, sodass eine Konzentration von $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\cong 131 \text{ mM}$) erreicht wurde. Anschließend wurde daraus eine 1 mM Lösung hergestellt, indem $7.6 \text{ }\mu\text{L}$ der Ausgangslösung mit $992.4 \text{ }\mu\text{L}$ Wasser verdünnt wurden. Die für den Zelltest benötigten Konzentrationen an Glykolsäure ($100 \text{ }\mu\text{M}$, $10 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$, $0.1 \text{ }\mu\text{M}$) wurden mit dem Zellkulturmedium verdünnt.

Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienstrangstücken. Um neben den neuroprotektiven sowie –regenerativen auch die richtungsweisenden Eigenschaften des BDNFs auf die Neuritenausprossung zu untersuchen, wurden Zellkulturuntersuchungen mit beladenen Fasern und Spiralganglienstrangstücken durchgeführt.

Hierbei wurden die Fasern nach dem beschriebenen Immobilisierungsprozess (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) mit HS bzw. BDNF beladen. Die Versuche erfolgten ebenfalls immer direkt vor der

Durchführung der Zelltests, damit keine Lagerung der Fasern notwendig war. Für die ersten Zelltests mit zwei gegenüberliegenden Fasern wurden unmodifizierte Fasern eingesetzt, welche einerseits mit HS und BDNF gemeinsam und andererseits nur mit HS beschichtet wurden, um ein neurotrophin-gerichtetes Auswachsen der Neuriten zu untersuchen. Als Proben für die letzten beiden Zellkulturuntersuchungen wurden sowohl un- als auch amino-modifizierte Fasern verwendet, die entweder mit keinem Biomolekül oder aber mit HS und BDNF einzeln bzw. gemeinsam beschichtet wurden.

3.2 Physikochemische Charakterisierungsmethoden

3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist eine elektronenoptische Methode, um die Morphologie von Oberflächen in sehr hohen Vergrößerungen zu untersuchen. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie wird hierbei ein Elektronenstrahl verwendet. Durch die hohe Beschleunigung der Elektronen kann ihnen eine viel kleinere Wellenlänge (DE-BROGLIE) als den Photonen zugeordnet werden, sodass Strukturen im nm-Bereich sichtbar werden.

Der Primärelektronenstrahl wird durch das Erhitzen eines Wolframdrahtes (Kathode) erzeugt und mithilfe von elektromagnetischen Feldern gebündelt sowie beschleunigt. Mit einem X-Y-Ablenkensystem kann nun jeder Punkt auf der Proben-Oberfläche von dem fokussierten Primärelektronenstrahl rasterförmig abgetastet werden. Bei diesem Vorgang werden durch die Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe verschiedene Signale erzeugt, die gemessen werden können. Neben den von dem Primärstrahl zurück gestreuten Elektronen (Rückstreuungselektronen) tragen auch weitere freigesetzte Elektronen (Sekundärelektronen) zur Bildgebung bei. Diese werden durch ein Szintillator-Photomultiplier-System sichtbar gemacht. Die Elektronen erzeugen zunächst Lichtblitze im Szintillator, welche anschließend zum Photomultiplier weitergeleitet, in Elektronen-Impulse umgewandelt und verstärkt werden.^[401]

Um die Oberfläche der (un)behandelten Polymerfasern zu charakterisieren, wurden Messungen am REM des Typs *JSM-6610LV* der Firma JEOL (Eigentum des Instituts für Anorganische Chemie) durchgeführt. Weitere Messungen wurden von DR. KAREN BESECKE am Feldemissions-REM des Typs *JSM-6700F* der Firma JEOL angefertigt (Eigentum des Instituts für Physikalische Chemie und Elektrochemie). Dabei wurden die Polymerfasern zuvor auf Graphitfolien geklebt und mit Gold besputtert, um eine bessere Leitfähigkeit zu erhalten. Hierbei wurde der *High Vacuum Sputter Coating* des Typs *EM SCD500* der Firma LEICA (Eigentum des Instituts für Physikalische Chemie und Elektrochemie) verwendet. Es wurde eine Stromstärke von 40 mA sowie eine Zeitdauer von 2 min eingestellt.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Hierbei handelt es sich um eine spezielle Variante der Lichtmikroskopie, welche auf dem physikalischen Prinzip der Fluoreszenz basiert. Nach Bestrahlung der zu messenden Probe mit monochromatischem Licht wird dieses von dem vorliegenden Fluoreszenzfarbstoff absorbiert, sodass es zu einer Anhebung der Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand kommt. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird nun Licht emittiert, welches charakteristisch für den jeweiligen Stoff ist. Mithilfe eines dichroitischen Spiegels kann das starke Beleuchtungslicht von dem schwächeren Fluoreszenzlicht getrennt werden, um eine selektive Detektion der Fluoreszenz zu ermöglichen.^[402]

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit dem FITC / RITC markierten Polymerfasern wurden mit einem BX51 Auflicht-Fluoreszenzmikroskop von der Firma OLYMPUS angefertigt. Es wurden neben einem FITC / RITC-Filter Okulare mit 4-40-facher Vergrößerung verwendet. Hierbei wurden sowohl die Belichtung als auch der Kontrast automatisch eingestellt. Die Auswertung der erhaltenen Daten fand mit dem Programm *ImageJ* statt.

3.2.3 Infrarotspektroskopie

Bei der Infrarotspektroskopie werden Molekülschwingungen bzw. -rotationen durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich abhängig von den funktionellen Gruppen in einem Molekül angeregt. Hierdurch können sowohl anorganische als auch organische Substanzen identifiziert werden. Die Absorption und Emission elektromagnetischer Strahlung ist jedoch nur bei Änderung des Dipolmoments des Moleküls möglich. Wird nun die Lichtdurchlässigkeit (Transmission) gegen die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in cm^{-1} aufgetragen, erhält man ein IR-Spektrum mit charakteristischen Absorptionsbanden. Dabei verhält die Intensität einer IR-Bande proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung während der Schwingung. Während bei höheren Wellenzahlen die Valenzschwingungen in einem Molekül angeregt werden, wird bei niedrigeren Wellenzahlen die Deformationsschwingung aktiviert. Im Fingerprintbereich ($\tilde{\nu} < 1600 \text{ cm}^{-1}$) befindet sich eine sehr große Anzahl von Banden. Dieser ist charakteristisch für jeden Stoff.^[403]

Zur Untersuchung der Oberflächenmodifikation und des Degradationsverhaltens der Polymerfasern wurden IR-Messungen an den Polymerfasern an der ATR-Einheit des Fourier-Transformations-IR-Spektrometers vom Typ *Tensor 27* der Firma BRUKER OPTIK GMBH durchgeführt. Als Vergleich wurde zusätzlich eine Ethylendiamin-Lösung vermessen. Das IR-Spektrum wurde in einem Bereich von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} gemessen. Ausgewertet wurden die Daten mit der Software *OPUS 5.0* der Firma BRUKER OPTIK GMBH sowie mit *OriginPro 8G*.

3.2.4 UV / Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Sowohl die UV / Vis- als auch die Fluoreszenz-Spektroskopie werden genutzt, um die Konzentrationen von Lösungen quantitativ zu bestimmen. Hierbei wird elektromagnetische Strahlung aus dem ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV / Vis) durch die zu untersuchende Probe gestrahlt. Bei der UV / Vis-Spektroskopie wird das Licht in seiner Strahlungsintensität durch Absorption, Beugung, Streuung und Reflektion abgeschwächt. Detektiert wird dies als sogenannte Extinktion. Im Falle der Fluoreszenzspektroskopie regt das durchstrahlende Licht den Fluoreszenzfarbstoff energetisch an. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird nun Licht emittiert, welches charakteristisch für den jeweiligen Stoff detektiert werden kann.^[403]

Um die Konzentrationen von Farbstoffmolekülen zu bestimmen, die entweder UV / Vis- oder fluoreszenzaktiv sind, wurden Messungen am Plattenreader des Typs *Spark 10* der Firma TECAN mit der dazugehörigen Software durchgeführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur in 96-Well Platten vermessen, welche für 10^s vor dem Messen geschüttelt wurden. Aufgenommen wurde entweder die Extinktion der Stoffe am jeweiligen Absorptionsmaximum (UV / Vis) oder die Emission am dazugehörigen Maximum (Fluoreszenz).

3.2.5 Stickstoff-Elementaranalyse

Für die Bestimmung des Stickstoffgehalts der modifizierten Fasern diente eine C / N-Elementaranalyse. Hierzu wurden die Proben im Sauerstoffstrom bei hohen Temperaturen verbrannt und als N₂ sowie CO₂ nach der chromatographischen Gastrennung mit einem Infrarot-Detektor detektiert.^[404]

Für die Messungen wurden ca. 8 mg an Fasern kleingeschnitten und in ein Zinnschiffchen eingewogen. Diese wurden anschließend an einem Gerät des Typs *Elementar Vario EL* der Firma ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME GMBH in Dreifachbestimmung von ANNE HERWIG (Institut für Bodenkunde, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt.

3.2.6 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) können mithilfe des Streulichts eines Lasers sowohl Molekulargewichte als auch Polymer-Lösungsmittelwechselwirkungen, Diffusionskoeffizienten, hydrodynamische Radien sowie Größenverteilungen bestimmt werden.^[405]

Wenn nun das Licht eines Lasers auf eine Partikeldispersion trifft, wird es winkelabhängig gestreut. Da die Partikel der BROWNSCHEN Molekularbewegung unterliegen, fluktuiert bei einem ausreichend kleinen Streuvolumen ebenfalls die Intensität des Streulichts. Dabei erfolgt diese Fluktuation in der gleichen zeitlichen Größenordnung der Partikelbewegung. Aus der Schwankung des Streulichts kann durch eine Autokorrelationsfunktion sowie der Stokes-Ein-

stein-Beziehung $6r\pi\eta D = k_B T$ der hydrodynamische Radius r bestimmt werden. Hierbei beschreibt η die Viskosität der Lösung, D den Diffusionskoeffizienten, k_B stellt die Boltzmannkonstante dar und T bestimmt die vorliegende Temperatur.^[405–407]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die hydrodynamischen Radien von gelöstem HS in Wasser ($c_{HS} = 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten und Raumtemperatur bestimmt. Es wurde ein Brechungsindex von 1.64 gewählt.

Durchgeführt wurden die Messungen an einem Gerät des Typs *Zetasizer Nano ZSP* der Firma MALVERN PANALYTICAL (ehemals MALVERN INSTRUMENTS). Um die Daten anschließend zu verarbeiten, wurde die entsprechende *Zetasizer Software* von MALVERN INSTRUMENTS verwendet.

3.2.7 Zetapotential-Messung

Das Zetapotential (ZP, ζ) beschreibt das elektrische Verhalten an Fest-Flüssig-Grenzflächen und kann mit dem Modell der elektrochemischen Doppelschicht erklärt werden. Taucht ein Festkörper in eine Lösung, so besitzt er augenblicklich eine gewisse Oberflächenladung. An dieser Oberfläche adsorbieren zunächst Gegenionen oder Dipole aus der umgebenden Lösung (stationäre Phase), sodass eine als starr angesehene Schicht entsteht. Umhüllt wird diese Schicht von einer diffusen, beweglichen Ionenschicht (diffuse Schicht). Das Potential, was durch die Ladung der Oberfläche aufgebaut wird, ändert sich über die feste Schicht linear und über die diffuse Schicht exponentiell. Hieran schließt sich das elektrisch neutrale Lösungsmittelmedium an, dessen elektrisches Potential den Wert Null annimmt. Die Scherebene beschreibt die Grenzfläche zwischen der stationären und der diffusen Schicht. Bei dem gemessenen Potential an dieser Stelle handelt es sich um das ZP. Dieses wird einerseits durch Säure-Base Reaktionen zwischen den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Festkörpers und der wässrigen Lösung generiert. Im Falle von hydrophoben Oberflächen bildet sich die Oberflächenladung andererseits durch Adsorption von Wasserionen aus. Da Hydroxidionen vornehmlicher adsorbiert werden, weist das zu messende ZP einen negativen Wert auf. In beiden Fällen hängt die Oberflächenladung sehr stark von dem pH-Wert des umgebenden Lösungsmittelmediums ab.

Um das ZP einer Probe zu bestimmen, wird sich des elektrokinetischen Effekts bedient. Im Falle von Partikeln wird ein elektrisches Feld angelegt und die daraus resultierende Diffusionsbewegung der einzelnen Partikel beobachtet. Hierbei wird aufgrund der Reibungskräfte ein Teil der diffusen Doppelschicht der Partikel abgestreift und es entsteht eine Abreibungsebene, die hydrodynamische Gleitebene genannt wird. Das Potential an dieser Stelle bezeichnet man als ZP. Dieses kann näherungsweise aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld (Elektrophorese) über dynamische Lichtstreuung bestimmt werden. Das ZP von makroskopischen Festkörperoberflächen wird über das Strömungspotential bestimmt. Wird

der Festkörper von einer wässrigen Lösung überströmt, so wird eine elektrische Antwort in Form eines zu messenden Potentials generiert. Modellhaft kann dies mithilfe einer durchströmten Kapillare erklärt werden (siehe Abbildung 27). Wie zuvor erläutert, bildet sich sogleich eine Oberflächenladung aus, welche durch eine bewegliche Schicht an Gegenionen kompensiert wird. Wenn nun eine wässrige Lösung tangential entlang der Festkörperoberfläche strömt, wirken Scherkräfte auf die Gegenionen und verschieben diese in Fließrichtung. Die Ladungstrennung resultiert in einer elektrischen Potentialdifferenz, welche als Strömungspotential zwischen zwei Elektroden, platziert an den Enden der Kapillare, gemessen werden kann. Dieses ist abhängig sowohl vom Volumenstrom als auch der Ionenstärke des Elektrolyten. Als zuverlässig hat sich herausgestellt, das Strömungspotential bei ansteigenden Druckdifferenzen (geht einher mit der Veränderung des Volumenstroms) zu messen. Für feste Materialien mit einer planaren Oberfläche wird zur Berechnung des ZPs die Helmholtz-Smoluchowski Gleichung (1) verwendet.^[408,409]

$$\zeta = \frac{dU_{\text{str}}}{d\Delta p} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A} \times \frac{1}{R} \quad (1)$$

ζ = Zetapotential, U_{str} = Strömungspotential, Δp = Druckdifferenz, η = Viskosität, $\varepsilon \times \varepsilon_0$ = Dielektrische konstante der Elektrolytlösung, L = Länge des Spalts, A = Durchmesser des Spalts, R = Widerstand

Um das ZP der NPs zu bestimmen, wurden Messungen an einem Gerät des Typs *Zetasizer Nano ZSP* der Firma MALVERN PANALYTICAL (ehemals MALVERN INSTRUMENTS) durchgeführt. PH-abhängige Messungen wurden mithilfe des Autotitrators *MPT-2* der Firma MALVERN PANALYTICAL realisiert. Zur Datenverarbeitung wurde die entsprechende *Zetasizer Software* von MALVERN INSTRUMENTS verwendet.

Das ZP der makroskopischen Faseroberfläche wurde an einem Gerät des Typs *SurPassTM 3* der Firma ANTON PAAR in einer Spaltmesszelle mit zwei Stempeln (20 x 10 mm) durchgeführt. Hierbei wurde für jede Messung eine Fläche von 10 x 10 mm mit den Fasern bedeckt. Dazu wurden die Fasern parallel zueinander und senkrecht zur Fließrichtung des Elektrolyten aufgeklebt. Abbildung 27 zeigt zum einen die während der Messung verwendeten Stempel. Zum anderen ist ein genügend großes Stück an doppelseitigem Klebeband zu sehen, welches mit den zu untersuchenden Fasern (vorher unter Vakuum getrocknet) beklebt und später auf der einen Stempelseite fixiert wurde. Um Probenmaterial zu sparen, wurde der zweite Stempel mit einem Glasplättchen (10 x 10 mm) bedeckt. Mithilfe der zugehörigen *Software SurPASS 3 Version 2.10.260.5099* wurden pH-abhängige Messungen durchgeführt und ausgewertet.

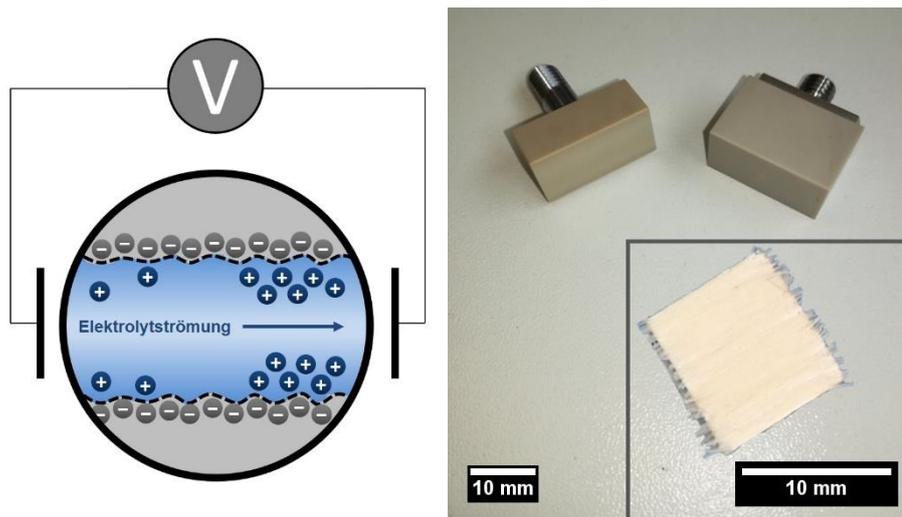


Abbildung 27: Links: Schematische Darstellung zur Bestimmung des ZPs über die Strömungspotential-Methode. Es wird der Fluss des Elektrolyten durch eine Kapillare mit der resultierenden Ladungstrennung illustriert. Nach^[409] Rechts: Stempel für die SurPass Messungen (großes Bild) sowie eine für die Messung vorbereitete Probe (kleines Bild). Hierbei handelt es sich um doppelseitiges Klebeband mit den zu untersuchenden, parallel zueinander angeordneten Fasern.

3.2.8 Nachweis freier Aminogruppen unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen

Die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein- sowie Rhodaminisothiocyanat (FITC / RITC) wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Existenz der Aminogruppen und damit die Anbindung der Diamine an die Polymerfasern nachzuweisen. Durch eine Behandlung der funktionalisierten Fasern mit den Farbstoffen sollten diese an die NH_2 -Gruppen anbinden, sodass mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ein Farbeindruck zu beobachten ist. Die Farbstoffmoleküle werden mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 495 \text{ nm} / 543 \text{ nm}$ (FITC / RITC) angeregt und emittieren Licht bei $\lambda = 519 \text{ nm} / 580 \text{ nm}$ (FITC / RITC). Während der Anbindung reagiert die Isothiocyanat-Gruppe (SCN) des Farbstoffes mit den primären Aminogruppe auf der Oberfläche der Polymerfasern.^[397,410,411] Schematisch ist dies in Abbildung 28 dargestellt.

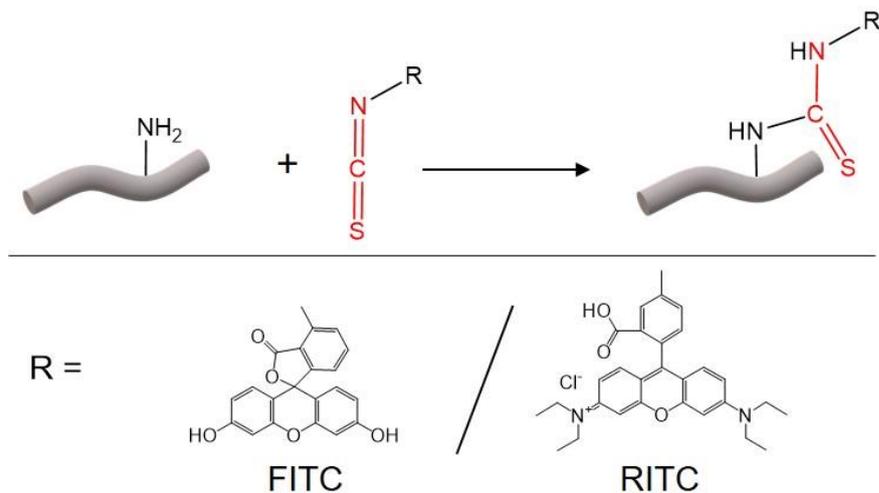


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Anbindung der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein- bzw. Rhodaminisothiocyanat über die SCN-Gruppe (rot) an die mit freien Aminogruppen bedeckten Polymerfasern (grau).

3.2.9 Kolorimetrischer Nachweis des angebundenen Heparansulfats unter Verwendung von Toluidinblau

Die Anbindung von HS an die Fasern wurde qualitativ mithilfe des Farbstoffes Toluidinblau ($\lambda_{em} = 631 \text{ nm}$) nachgewiesen. Die zugehörige Strukturformel des Farbstoffmoleküls ist in Abbildung 29 zu sehen.

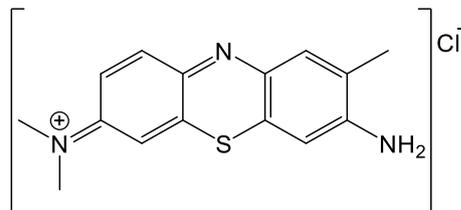


Abbildung 29: Strukturformel des Farbstoffmoleküls Toluidinblau.

Dieser Test wurde ursprünglich 1941 von MACINTOSH^[412] entwickelt, um die Menge an Heparin zu erfassen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Glykosaminoglykane wurde der Nachweis auf den Wirkstoff HS übertragen und wird daher im Folgenden näher erläutert.^[413,414]

Es wird in der Histologie von der sogenannten „Metachromasie“ gesprochen, wenn bestimmte Farbstoffe durch das Zusammenwirken mit Gewebe ihre Farbe ändern. In diesem Fall ist allen Gewebesubstanzen gemein, sowohl organisch gebundene Schwefelsäuren (verestert) als auch gerinnungshemmende Eigenschaften zu besitzen. Grund für die Farbänderung ist neben der Bildung einer tautomeren Imino-Base ein erhöhter Grad an aggregierten Molekülen. Werden gleiche Volumina einer wässrigen Toluidinblaulösung und einer 0.01 %igen Wirkstofflösung

vermischt, so ist eine Farbänderung von blau zu rot-violett zu beobachten. Geringere Mengen an Heparin / HS erzeugen purpurfarbene intermediäre Töne. Der gebildete Wirkstoff-Toluidinblau-Komplex wird der Lösung entzogen, indem diese mit einer organischen Substanz ausgeschüttelt wird. Der Komplex adsorbiert nun an der Phasengrenzfläche, währenddessen der ungebundene Farbstoff in der wässrigen Phase verbleibt und seinen normalen Farbton behält. Wird anschließend das Extinktionsspektrum der wässrigen TB-Phase aufgenommen, so kann herausgefunden werden, ob die Menge an ursprünglichem TB durch die Komplexbildung mit dem HS abgenommen hat. Auf diese Weise kann die Anwesenheit des HS verifiziert werden. Weiterhin ist zu beachten, dass die Menge an Toluidinblau mit zunehmender Temperatur, Azidität oder Konzentration anderer gelöster Stoffe abnimmt. Kontrolliert werden können diese Faktoren durch eine genügend starke Verdünnung wie auch durch das Anfertigen einer Standardprobe.^[412]

3.3 Biochemische Charakterisierungsmethoden

3.3.1 ELISA

Bei einem ELISA handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren zur Detektion sowie Quantifizierung von Antigenen und Antikörpern. Deren Wechselwirkung wird mithilfe einer enzymvermittelten Reaktion sichtbar gemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst qualitative Nachweise der Immobilisierung von Laminin sowie BDNF an die Faser-oberfläche über den ELISA durchgeführt. Anschließend wurden hiermit die angebondenen sowie freigesetzten Mengen an BDNF quantifiziert.

Die drei häufigsten ELISA-Typen stellen der direkte, der indirekte sowie der *Sandwich*-ELISA dar. Die Methode des direkten ELISAs beinhaltet zunächst die Beschichtung von Mikrowellplatten mit dem Probenmaterial, welches das gesuchte Antigen enthält. Im Anschluss daran wird der Antikörper zur Detektion zugegeben und formt einen Komplex mit dem Antigen. Da dieser Antikörper mit einem Enzym konjugiert ist, erlaubt er die Umsetzung eines Substrates in ein detektierbares Signal aufgrund einer anschließenden Farbreaktion. Als Vorteil dieser Methode stellt sich die schnelle Durchführung heraus, da nur ein Antikörper angewendet werden muss. Die mögliche niedrige Signalstärke ist jedoch nachteilig. Im Gegensatz zur ersten Methode beinhaltet der indirekte ELISA zwei Schritte. Zunächst bindet ein primärer Antikörper an das Antigen, wonach ein Enzym-markierter, sekundärer Antikörper den ersten Antikörper erkennt und an diesen bindet. Zuletzt schließt sich auch hier eine Farbreaktion an. Die resultierende Signalverstärkung durch Anbindung mehrerer Antikörper kann hier als vorteilhaft angesehen werden, es kann jedoch zu starken unspezifischen Hintergrundsignalen kommen. Die dritte Methode des *Sandwich*-ELISAs misst die Menge an Antigenen zwischen zwei

Lagen von Antikörpern. Hierbei ergibt sich jedoch die Einschränkung, dass das Antigen mindestens zwei Antigenbindungsstellen besitzen muss, um die zwei verschiedenen Antikörper anzubinden. Wenn nur geringe Konzentrationen des Antigens vorhanden sind, ist diese Methode jedoch nützlich. In der Durchführung wird zunächst ein sogenannter Fangantikörper (*capture antibody*) an den Untergrund angebunden. Anschließend wird das Antigen hinzugefügt, welches an den Fangantikörper bindet. Nun erfolgen dieselben Schritte wie beim indirekten ELISA.^[415] Im Allgemeinen beinhaltet der sekundäre Antikörper eine Biotin-Einheit, an welche im nächsten Schritt die Anbindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes folgt. Dieser katalysiert schließlich die enzymatische Farbreaktion des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (TMB). Der *Sandwich*-ELISA ist schematisch in Abbildung 30 dargestellt.

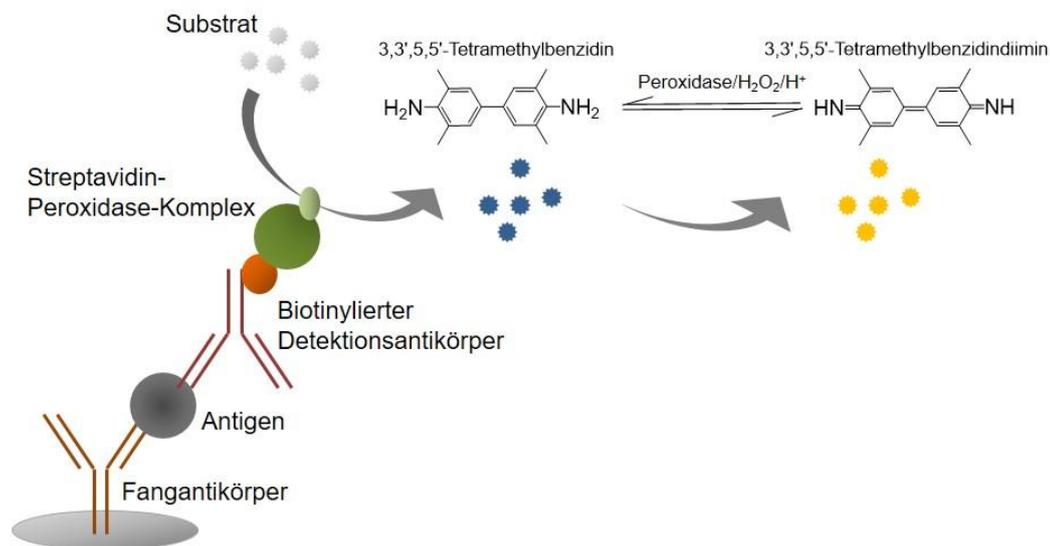


Abbildung 30: Schematische Darstellung eines *Sandwich*-ELISAs zur Quantifizierung von BDNF.

3.3.2 *In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und –regenerativen Effekt von BDNF mit Spiralganglienzellen

Um sowohl den neuroprotektiven als auch den regenerativen Effekt von BDNF-beladenen Fasern und freigesetzten Wirkstoffmengen zu untersuchen, wurden Zelltests mit Spiralganglienzellen durchgeführt.

Gewinnung der Spiralganglienzellen. Die Spiralganglienzellen (SGZs) wurden aus den Cochleae von neonatalen Sprague Dawley-Ratten (postnatale Tage 3-5) nach einem bereits beschriebenen Protokoll von Wefstaedt *et al.*^[416] isoliert. Hierbei wurde zunächst die Cochlea heraus präpariert und anschließend das Spiralganglion von der Stria vascularis und dem Corti-Organ abgetrennt. Die Spiralganglionstränge wurden dann sowohl enzymatisch als auch mechanisch dissoziiert. Hierzu wurde die HBSS-Lösung (*Hanks' Balanced Salt Solution*), in der

sich die SGZs befanden, abgenommen, um anschließend 2 mL erwärmte Verdauungslösung zuzugeben. Diese besteht aus HBSS mit 0.1 % Trypsin und 0.01 % DNase (Desoxyribonuklease), Es folgte eine 16-minütige Inkubation bei 37 °C unter intermittierendem Schütteln mit einer darauffolgenden Entfernung der Verdauungslösung. Die Zellen wurden nun mit 200 µL warmen FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) versetzt, um den Verdau zu stoppen. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 1 mL serumfreiem Medium gewaschen, indem dieses zunächst hinzugegeben und gleich darauf wieder abgezogen wurde. Hiernach wurde 1 mL serumfreies Medium hinzugegeben, welches zum mechanischen Verdau ca. 60 x auf- und abgezogen wurde. Es handelte sich hierbei um das SGZ-Standardmedium bestehend aus Panzerin 401, HEPES (25 mM, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Glucose (6 mg·mL⁻¹), Penicillin (30 U·mL⁻¹), N-2-Zusatz (3 µg·mL⁻¹) und Insulin (5 µg·mL⁻¹). Die Anzahl an lebenden Zellen wurde nun mithilfe der Neubauer-Zählkammer und des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt. Hierzu wurden 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau verdünnt, um 10 µL des Gemisches in die Neubauer-Zählkammer zu geben. Pro Well (96-Wellplatte) wurden letztendlich 10000 Zellen in 50 µL Medium hinzugegeben.

Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen. Die verwendeten 96-Wellplatten wurden zunächst mit Poly-D / L-Ornithin (0.1 mg·mL⁻¹) und Laminin (0.01 mg·mL⁻¹) beschichtet, um das Anwachsen der Zellen zu erleichtern. Anschließend wurden in die beschichteten Wells 50 µL Zellsuspension sowie 50 µL der zu untersuchenden Probe gegeben. Bei den Proben handelte es sich zum einen um die *Release*-Überstände. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen an reiner Glykolsäure, einem Bestandteil der verwendeten Polymerfasern, in ihrer Wirkung auf die Überlebensrate der SGNs getestet. Zum anderen wurden (beschichtete) Fasern verwendet, wobei hier jeweils 1 Stück der Faser (Länge: 7 mm, entspricht Durchmesser des Wells) an den Boden der 96-Wellplatte gelegt wurde. Da es sich hierbei um einen Feststoff handelte, wurden zusätzlich 50 µL des Zellkulturmediums hinzugegeben. Die detaillierte Beschreibung der Probenpräparation erfolgte in Kapitel 3.1.11. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C wurden die Zellen mithilfe einer 1:1 Mischung aus Aceton und Methanol für 10 min fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und in 150 µL PBS bei 4 °C bis zur Färbung aufbewahrt. Neben den zu untersuchenden Proben befanden sich zusätzlich Kontrollen auf der Zellkulturplatte. Hierbei handelte es sich neben der Einsaatkontrolle, bei der die Fixierung schon nach 4 h erfolgte, um eine Negativkontrolle (SGZ-Standardmedium), eine Positivkontrolle (SGZ-Standardmedium mit einem BDNF-Zusatz von 50 ng·mL⁻¹) und eine weitere Kontrolle bestehend aus einem 1:1-Gemisch aus PBS (+0.1 % BSA) und serumfreiem Medium. Letztere diente neben den Standardkontrollen (Positiv- und Negativkontrolle) als zusätzliche Kontrolle, da alle zu untersuchenden Proben auf einer PBS (+0.1 % BSA)-Lösung basierten.

Bestimmung der Überlebensrate und der Neuritenlänge der Spiralganglienneurone. Um sowohl die Überlebensrate als auch die Neuritenlänge der Neurone zu bestimmen, mussten

diese zunächst aus der Mischkultur von Neuronen, Gliazellen und Fibroblasten identifiziert werden. Dazu wurden sie mithilfe des Vectastain Elite ABC Kits nach einem bereits beschriebenen Protokoll angefärbt.^[416] Zunächst erfolgte die Anbindung des primären Neurofilament-Maus-Antikörpers (monoklonal, 200 kDa) und anschließend die des sekundären, biotinylierten Antikörpers und eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes. Die Antikörperkomplexe wurden letztendlich durch die Zugabe von Diaminobenzidin angefärbt. Es wurden lediglich überlebende Neurone als Neurofilament-positiv bezeichnet, wenn sie eine Neuritenlänge von mindestens dreimal jener des Zellkörperdurchmessers (Soma) aufwiesen.^[417] Die Visualisierung der Neurone erfolgte mit dem inversen Mikroskop des Typs *CKX41* der Firma OLYMPUS. Um den neuroprotektiven Effekt des BDNFs zu bestimmen, wurde die Überlebensrate der SGNs bestimmt, indem die Anzahl der überlebenden SGNs nach 48 h zur Anzahl der Neurone in der Einsaatkontrolle ins Verhältnis gesetzt wurde. Der neuroregenerative Effekt wurde ermittelt, indem die fünf längsten Neurone eines Wells (ein Neuron im Zentrum und vier Neurone im Umkreis) ausgewählt und mit der Software *CellP* vermessen wurden.

Durchgeführt wurden die Zellkulturuntersuchungen mit den Spiralganglienzellen im Rahmen einer Kooperation des Exzellenzclusters Hearing4all von DR. JENNIFER HARRE, die der Arbeitsgruppe von PROF. ATHANASIA WARNECKE (Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) angehört.

Statistische Analyse. Die Daten der *in vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven sowie –regenerativen Effekt von BDNF auf SGNs wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 hinsichtlich der Statistik analysiert. Zunächst wurde eine Einweganalyse der Varianz (*one-way analysis of variance*; ANOVA) und anschließend ein Bonferroni's Mehrfachvergleichstest (*multiple comparison test*) durchgeführt. Hierbei wurden p-Werte von weniger als 0.05 als statistisch signifikant angesehen. Es wurde mindestens zwischen zwei unabhängigen Ansätzen (*N*) und mindestens einer Dreifachbestimmung (Triplets) jeder Probe (*n*) gemittelt. Die entsprechenden Fehlerbalken in den Ergebnissen zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben: n.s. = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3.3 *In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven und –regenerativen sowie richtungsweisenden Effekt von BDNF mit Spiralganglionstrangstücken

Um zu untersuchen, welchen Effekt die mit BDNF und HS beladenen Fasern auf die Neuritenaussprossung von Spiralganglionstrangstücken haben, wurden entsprechende Zellkulturuntersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere untersucht, ob BDNF richtungsweisende Eigenschaften für die Neuritenaussprossung aufweist.

Gewinnung der Spiralganglionstrangstücke. Die Gewinnung der Spiralganglionstrangstücke aus neonatalen Ratten (*Sprague Dawley*) erfolgte analog zu der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode zur Gewinnung der einzelnen SGN. Der Unterschied bestand jedoch darin, dass für die Stränge keine Vereinzelnung / Verdauung durchgeführt wurde. Jedes Spiralganglion wurde in 4-5 kleine Stücke mit einer Länge von 0.2 – 0.4 mm zerteilt.

Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglionstrangstücken. Es wurden verschiedene Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglionstrangstücken durchgeführt. Die ersten Tests erfolgten in einzelnen Petrischalen mit einem Durchmesser von 34 mm. Diese wurden zunächst in der Mitte mit Poly D / L-Ornithin ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sowie Laminin ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) beschichtet, um das spätere Anwachsen der Zellen zu erleichtern. Anschließend wurden gegenüberliegend an den Rand der Petrischale zwei beschichtete Fasern geklebt. Hierfür wurde medizinisches Wachs verwendet. Nachdem 1 mL des Zellkulturmediums hinzugegeben wurde, konnten jeweils 4-5 Spiralganglienstrangstücke in die vorbeschichtete Mitte der Petrischale gegeben werden. Der Aufbau des Experiments ist in Abbildung 31 zu sehen.

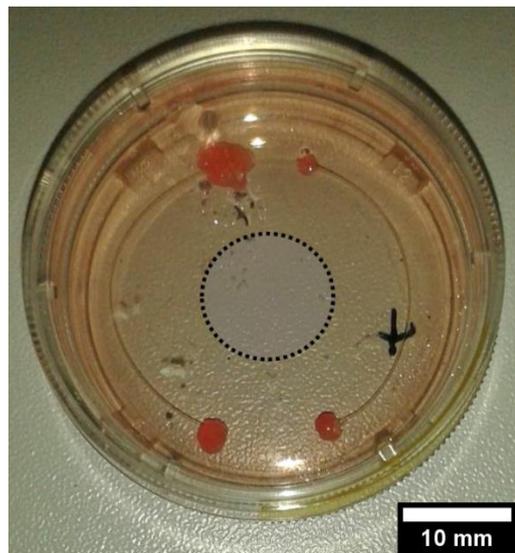


Abbildung 31: Aufbau des Zellkulturexperiments mit zwei beschichteten Fasern. Das „x“ gibt an, welche Faser mit BDNF beladen ist. Der markierte Bereich in der Mitte wurde vorbeschichtet. Hier wurden die Spiralganglionstrangstücke positioniert.

Um das richtungsabhängige Aussprossen der Neuriten noch gezielter zu untersuchen, wurde ein modifizierter Zelltest angeschlossen. Hierbei wurde lediglich eine Faser in eine dafür vorgesehene Teflonhalterung (siehe Abbildung 32) gespannt, sodass sie später in der Petrischale (Durchmesser von 60 mm) an der Seite platziert war. Die Petrischale wurde ebenfalls in der Mitte vorbeschichtet, sodass nach Zugabe des Zellkulturmediums (3 mL) jeweils 4-5 Spiralganglionstrangstücke anwachsen konnten.

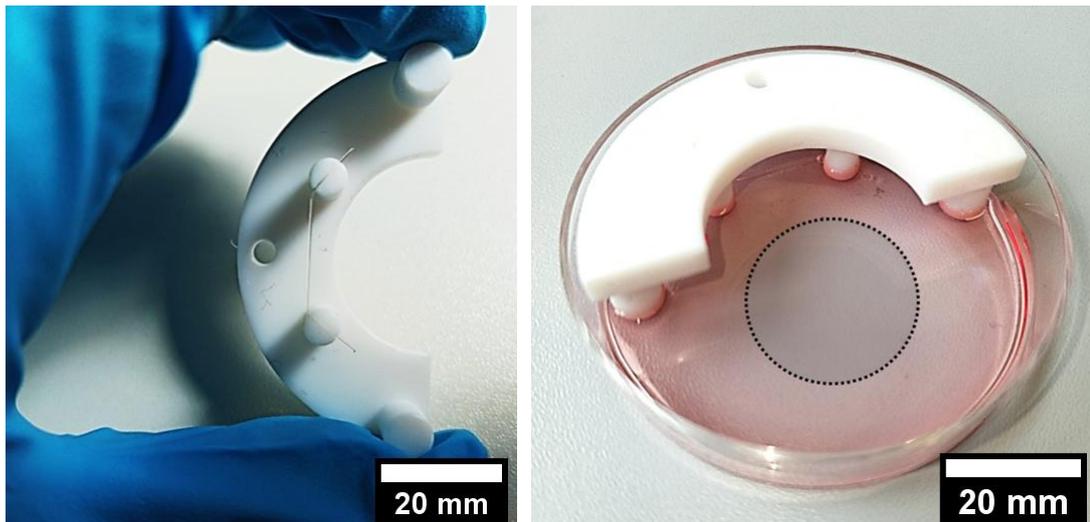


Abbildung 32: Aufbau des Zellkulturexperiments mit einer beschichteten Faser. Links ist die eingespannte Faser in einer dafür vorgesehenen Teflonhalterung zu sehen. Das rechte Bild zeigt den Aufbau eingebettet in eine Zellschale, befüllt mit Medium. Die Spiralganglionstrangstücke werden auf die vorbeschichtete, markierte Stelle gegeben.

In einem dritten Ansatz wurde getestet, ob eine höhere, lokale Konzentration der Biomoleküle einen stärkeren Effekt auf die Spiralganglienneuronen ausübt. Hierzu wurden die Experimente in 6-Wellplatten mit einem Durchmesser von 35 mm durchgeführt. In diesem Fall wurde die eine Hälfte der Schale wieder auf die gleiche Weise mit Poly D / L-Ornithin sowie Laminin vorbeschichtet. Es wurden anschließend jeweils fünf Fasern in eine zugehörige Teflonhalterung (siehe Abbildung 33) eingespannt und nach Zugabe von 1 mL Zellkulturmedium in die Petrischale gegeben. Die Fasern befanden sich allesamt auf der unbeschichteten Seite der Petrischale. Anschließend wurden auf die beschichtete Seite 4-5 Spiralganglionstrangstücke gegeben. Die detaillierte Beschreibung der Probenpräparation erfolgte in Kapitel 3.1.11.

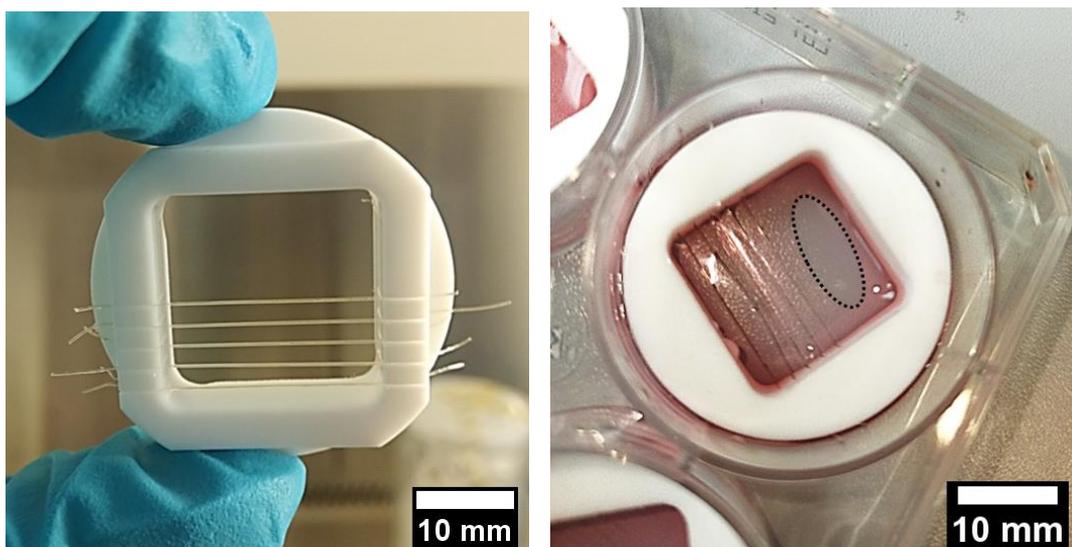


Abbildung 33: Aufbau des Zellkulturexperiments mit fünf beschichteten Fasern. Links sind die eingespannten Fasern in einer dafür vorgesehenen Teflonhalterung zu sehen. Das rechte Foto zeigt den Aufbau eingebettet in einer 6-Well-Platte. Die Spiralganglionstrangstücke werden auf der vorbeschichteten, markierten Stelle positioniert.

Analog zu den Zellkulturuntersuchungen mit einzelnen Spiralganglienzellen wurden die Proben der ersten beiden Zelltests für 48 h und die des dritten Zelltests für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Stränge ebenfalls mit einem Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1) fixiert. Die Neurofilamente wurden mit Diaminobenzidin bräunlich angefärbt und schließlich mit dem Lichtmikroskop (CKX41, OLYMPUS) untersucht. Die detaillierte Beschreibung der Fixierung sowie Färbung ist dem Kapitel 3.3.2 zu entnehmen. Jede Kondition wurde als Duplikat angefertigt.

Zusätzlich wurden die Versuche des dritten Ansatzes wiederholt, wobei die Strangstücke sowie die ausgewachsenen Neurofilamente nunmehr mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden. Hierdurch sollte eine bessere Abhebung vom Hintergrund stattfinden, um die Neurone anschließend mittels Sholl-Analyse auswerten zu können. Zudem wurde eine Kalibrationsreihe angefertigt, bei der verschiedene Mengen an BDNF (0 ng·mL⁻¹, 5 ng·mL⁻¹, 25 ng·mL⁻¹, 50 ng·mL⁻¹) zu den Strangstücken hinzugegeben wurden. Auch diese Versuche wurden mittels Fluoreszenzfärbung sowie Sholl-Analyse ausgewertet. Hierdurch soll die Wirkung des freigesetzten BDNFs von den Fasern auf die SGN-Strangstücke quantitativ eingeordnet werden. Am Ende der Kultivierung wurden die Zellen zunächst mit einer 4 %igen, basischen Paraformaldehyd-Lösung fixiert sowie anschließend dreimal mit jeweils 500 µl PBS gewaschen. Hiernach erfolgte eine Permeabilisierung mithilfe von jeweils 400 µL an 0.25 %iger PBT-Lösung pro Well für 10 Minuten. Die Lösung wird hergestellt, indem 1.25 mL Triton X-100 (10 %ige Octoxinol-9-Lösung) in 500 mL PBS gelöst werden. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils 5 Minuten mit 500 µL einer 0.1 %igen PBT-Lösung gewaschen. Nun wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert, indem jeweils 400 µL einer Lösung mit 5 % FCS sowie 0.1 % PBT zu jedem Well hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden für 1 h bei RT inkubiert und danach dreimal für 5 Minuten mit 500 µL einer 0.1 %igen PBT-Lösung gewaschen. Anschließend wurde ein primärer Antikörper angebunden, indem 350 µL *der Mouse anti neurofilament*-Lösung (200 kDa, Verdünnung 1:500) hinzugegeben wurden. Die Antikörperverdünnungslösung besteht aus 500 µL FCS und 358 µL BSA (0.7 g BSA in 2 mL destilliertem Wasser lösen) in 25 mL 0.1 %iger PBT-Lösung. Es fand eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur statt. Hiernach wurden die Zellen wiederum dreimal für jeweils 5 Minuten mit 500 µL einer 0.1 %igen PBT-Lösung gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper angebunden wurde. Hierzu wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit 350 µL einer Lösung überschichtet, welche neben *goat anti mouse alexa 488* (Jackson, Verdünnung 1:500) ebenfalls DAPI (Verdünnung 1:250) enthielt. Auch nach diesem Schritt wurden die Zellen nach dem zuvor beschriebenen Protokoll gewaschen sowie letztendlich in 500 µL PBS pro Well gelagert, um anschließend unter dem Mikroskop untersucht zu werden. Alle Versuche fanden nach dem zuvor beschriebenen Protokoll in Duplikaten statt.

Durchgeführt wurden die Zellkulturuntersuchungen mit den Spiralganglionstrangstücken im Rahmen einer Kooperation des Exzellenzclusters Hearing4all von Dr. JENNIFER HARRE, die der Arbeitsgruppe von PD Dr. ATHANASIA WARNECKE (Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) angehört.

Quantifizierung mittels Sholl-Analyse. Bei der Sholl-Analyse handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Analyse, die üblicherweise in neuronalen Studien zur Charakterisierung der morphologischen Eigenschaften eines abgebildeten Neurons verwendet wird. Sie wurde ursprünglich 1953 zur Beschreibung der Unterschiede im visuellen und motorischen Kortex von Ratten entwickelt.^[418] Ihr Erfinder, D. SHOLL, war daran interessiert, die Morphologie verschiedener Arten von Neuronen, also einzelnen Zellen, zu vergleichen. Dabei werden im Wesentlichen die Anzahl der Dendriten, ihre Länge und ihr Verzweigungstyp charakterisiert. Hierzu wird eine vorbestimmte Anzahl von konzentrischen Kreisen mit steigendem Durchmesser um den Mittelpunkt des Zellkörpers gelegt. Anschließend wird die Anzahl der Schnittpunkte von Neuriten pro konzentrischer Schale berechnet. Hieraus bestimmt sich die Anzahl der Auswüchse bei verschiedenen dendritischen Längen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Methode genutzt, um zu quantifizieren, welchen Effekt BDNF sowie HS auf den Neuritenauswuchs der Spiralganglionstrangstücke ausüben. Dazu wurde das *Plugin „Sholl Analysis“* des Bildbearbeitungsprogramms IMAGEJ genutzt.^[419,420]

Diesbezüglich wurde in Zusammenarbeit mit der Firma BIOVOXXEL ein Makro erstellt, welches die Fluoreszenzzellbilder zunächst in Schwarz-Weiß-Bilder umwandelt. Hierbei wurde die Intensität der Bilder so verändert, dass sich die SGN-Strangstücke besser vom Hintergrund abheben und somit vom Programm erkannt werden. Ziel bei der Bildbearbeitung war es, neben dem Strangstück die gesamte Anzahl der ausgewachsenen Neuriten abzubilden. Hierbei kann jedoch nicht garantiert werden, dass alle Neuriten von dem Programm erkannt wurden. Zusätzlich sollte vorhandenes Untergrundrauschen, der sog. Debris, aus den Bildern entfernt werden, da hierdurch die spätere Sholl-Analyse gestört wird. Es können sich allerdings noch verbleibende Reste in dem jeweiligen Zellbild befinden, ebenso wie möglicherweise auch Neuriten(teile) unbeabsichtigt entfernt wurden. Es wurde festgelegt, dass Zell-Cluster mit einer Größe unterhalb 500 Pixeln nicht abgebildet werden.

Im zweiten Schritt führt das Makro die Sholl-Analyse durch, indem konzentrische Kreise um den Mittelpunkt den Strangstückes gelegt werden (Abbildung 34). Diese besitzen einen Abstand von 5 Pixeln. Anschließend werden die Schnittpunkte der Kreise mit den Neuriten ermittelt. Weiterhin werden in jedem Bild drei spezifische Kreise ausgewählt, um die jeweiligen Daten der verschiedenen Bilder miteinander in Beziehung zu setzen. Neben einem Kreis direkt außerhalb des Strangstückes (10 Pixel Offset) werden zwei weitere Kreise ausgewählt. Der äußerste Kreis entspricht der maximalen Neuritenlänge, der mittlere Kreis befindet sich in

jeweils gleichem Abstand zum inneren und zum äußeren Kreis. So soll bei jeder Probe herausgefunden werden, wie viele Neuriten direkt aus dem Strangstück herauswachsen und wie sich diese Zahl bei steigendem Abstand verändert. Die tatsächlichen Durchmesser dieser Kreise variieren von Experiment zu Experiment, da auch die maximale Neuritenlänge variiert.

Als einfache quantitative Daten werden

- die Anzahl der Schnittpunkte des inneren Kreises
- die Anzahl der Schnittpunkte des mittleren Kreises
- der Radius des äußeren Kreises (entspricht der maximalen Neuritenlänge)

sowie

- das Produkt aus der Anzahl der Schnittpunkte des mittleren Kreises mit dem Radius dieses Kreises

verwendet. Letztere Größe bezeichnen wir hier als „mittlere Neuritenaktivität“. Hiermit wird eine Gesamtaussage erhalten, welche die Aktivität der Neuriten eines SGN-Strangstückes beschreibt und einen Vergleich der Regenerationsleistung zwischen verschiedenen Strangstücken erlaubt. Zur Ermittlung wurde der mittlere Kreis gewählt, um unabhängiger von äußeren Faktoren agieren zu können. Während der innere Kreis von der Größe des Strangstückes abhängt, ist die Lage des äußeren Kreises sowohl vom Ausschnitt des aufgenommenen Zellkulturbildes sowie vom Auge des Betrachters abhängig. Obwohl sich der mittlere Kreis aus den Größen der anderen beiden Kreise ableitet, stellt dieser immer noch ein unabhängigeres Maß dar. Neben der mittleren Neuritenaktivität wird probenhalber auch eine leicht abgewandelte Form benutzt, bei der die Anzahl der Schnittpunkte der Neuriten mit der Abstandsdifferenz zwischen mittlerem und innerem Kreis multipliziert wird. Diese Größe wird als „mittlere normierte Neuritenaktivität“ bezeichnet.

Ausgegeben von dem Programm werden neben den bearbeiteten Bildern auch ein Plot der Anzahl der Schnittpunkte für alle Kreise (Abbildung 34) sowie weitere Daten zur späteren Verarbeitung.

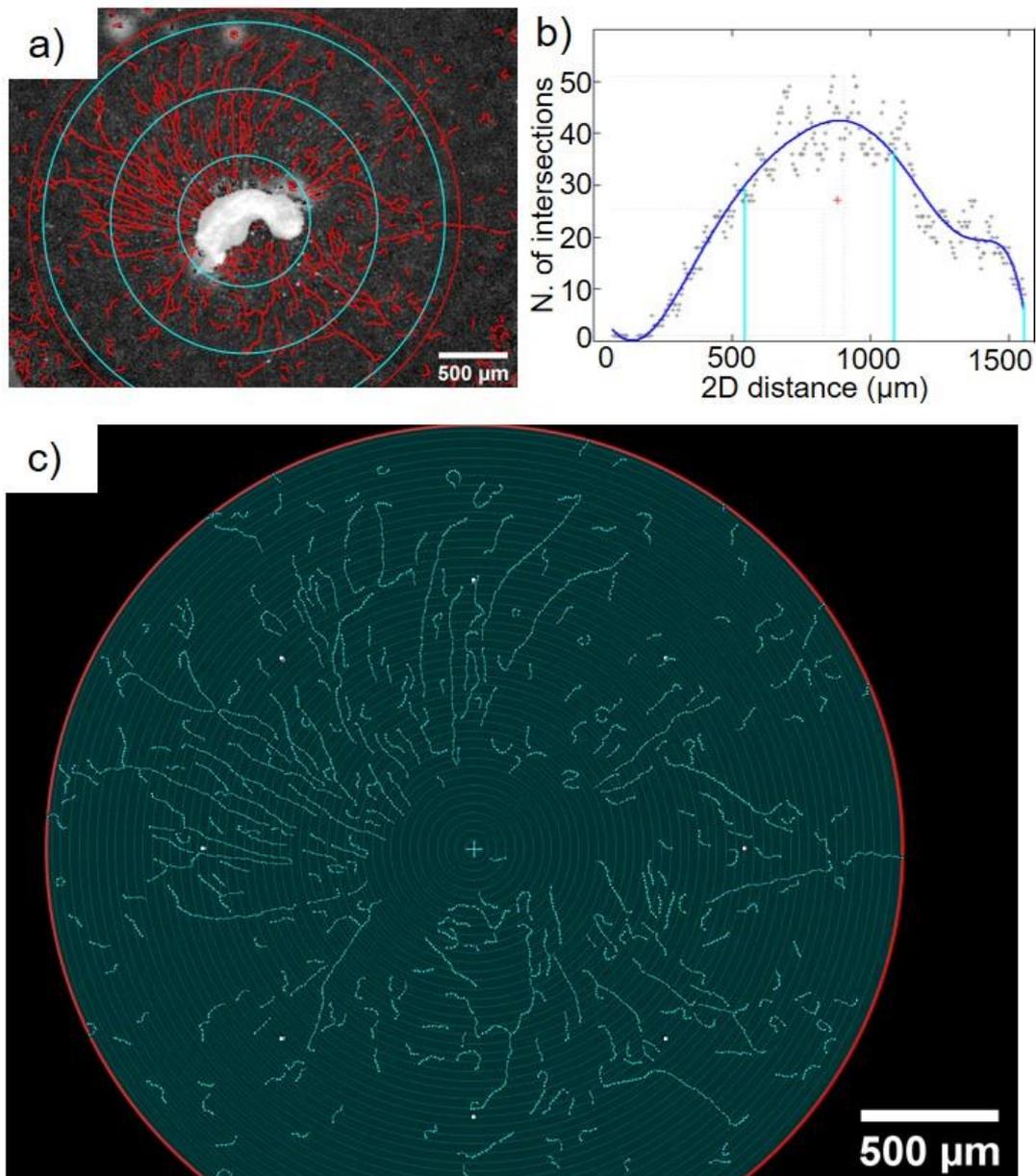


Abbildung 34: Ergebnisse der Bildbearbeitung durch das generierte Makro der Firma BIOVOXXEL, welches das Plugin „Sholl Analysis“ des Programms IMAGEJ verwendet. a) Schwarz-Weiß-Bild des Strangstückes mit markierten Neuriten(rot), nachdem es mittels IMAGEJ die Sholl-Analyse durchlaufen hat. Es sind zudem der äußere Kreis der Analyse (rot) sowie drei hervorgehobene konzentrische Kreise (hellblau) abgebildet. b) Graphische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt der Analyse mit polynomialen Fit. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. c) Bearbeitetes Bild des SGN-Strangstückes mit allen konzentrischen Kreisen (hellblau) der Sholl-Analyse sowie äußerer Grenze (rot). Es sind die Schnittpunkte der einzelnen Kreise mit den zuvor detektierten Neuriten markiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel befasst sich mit der Auswertung der durchgeführten Experimente und diskutiert die erhaltenen Ergebnisse. Zunächst werden die un- sowie amino-modifizierten Polymerfasern als Basismaterialien für die Anbindung sowie Freisetzung der Biomoleküle HS, BDNF und Laminin charakterisiert. Auch die Degradation der Fasern wird betrachtet. Anschließend liegt der Fokus auf den verschiedenen Polymerfaser-Wirkstoff-Systemen. Außerdem werden die Systeme auf ihre Fähigkeit im Hinblick auf ihre Anwendung in der neuronalen Regeneration diskutiert.

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in der referierten Fachzeitschrift „Frontiers in Bioengineering and Biotechnology“ veröffentlicht.^[421]

4.1 Polymerfasern

Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl un- als auch amino-modifizierte Polymerfasern verwendet, um die Biomoleküle anzubinden bzw. wieder freizusetzen. Die folgenden zwei Unterkapitel dienen dazu, die Fasern zu charakterisieren und die Einführung der Aminogruppen zu präsentieren. Außerdem wird auf die Degradation der Fasern, welche in ihrer Anwendung im Körper als biodegradierbare Leitstruktur dienen sollen, eingegangen.

4.1.1 Charakterisierung der unmodifizierten und amino-modifizierten Polymerfasern

Als Plattform für die Anbindung sowie Freisetzung der Biomoleküle fiel die Wahl in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Fasertypen. Zunächst wurden Polymerfasern mit dem Namen Glycolon® der Firma RESORBA verwendet, welche aus Polyglykolsäure und Poly- ϵ -Caprolacton bestehen. Um die Oberfläche der Fasern für spätere chemische Reaktionen zu aktivieren, wurden die Fasern in einer Variation der Aminolyse nach ZHU *et al.*^[353] unterzogen. Dazu wurden sie für eine Stunde in einer Ethylendiamin-Lösung in Isopropanol inkubiert, nachdem sie mit dem Kupplungsreagenz DCC sowie Stabilisator NHS behandelt wurden, um das Diamin kovalent an die Oberfläche der Fasern anzubinden. Somit sollten freie Aminogruppen auf den Polymerfasern generiert werden (siehe Kapitel 3.1.1). Die beiden Fasertypen werden im Folgenden als unmodifiziert („Faser“) sowie amino-modifiziert („Faser-NH₂“) bezeichnet.

Optische Charakterisierung

Zur optischen Charakterisierung der beiden Fasertypen wurden fotografische sowie raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, welche in Abbildung 35 zu sehen sind.

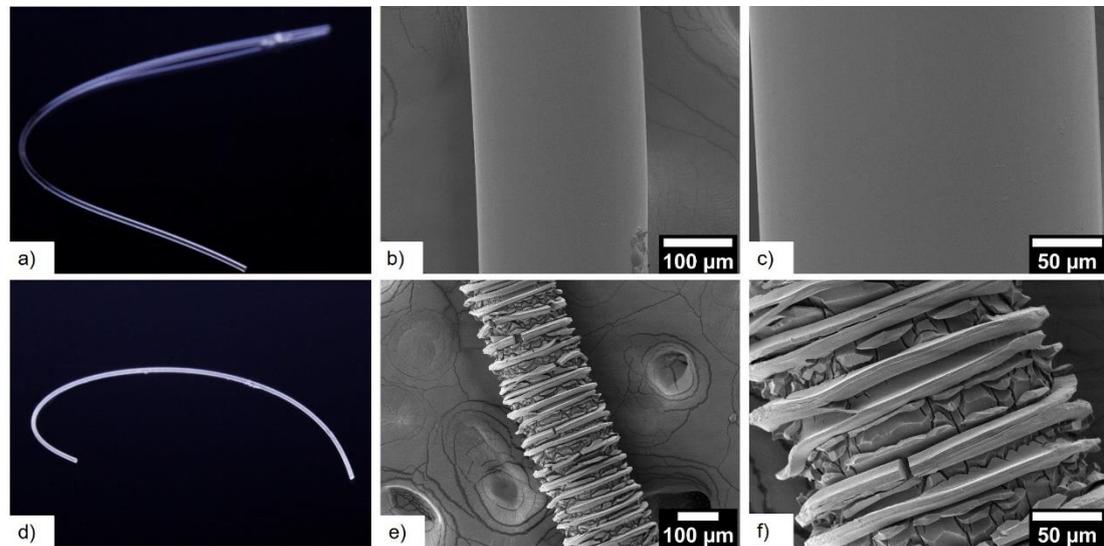


Abbildung 35: Optische Charakterisierung der Oberfläche der zwei verschiedenen Fasertypen. Zu sehen sind Fotografien der unmodifizierten (a) sowie amino-modifizierten (d) Faser. Weiterhin sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Fasern in zwei Vergrößerungen dargestellt: (b) und (c) unmodifizierte Fasern, (e) und (f) amino-modifizierte Fasern. Die amino-modifizierten Fasern weisen im Gegensatz zu den unmodifizierten Fasern eine aufgeraute Oberfläche auf.

Die Fotografie der unmodifizierten Faser zeigt eine farblose sowie transparente und monofile Polymerfaser. Die letzte Beobachtung wird durch die beiden REM Aufnahmen gestützt, welche eine Bestimmung des Durchmessers ermöglichen ($245.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$). Im Gegensatz dazu zeigt die Fotografie der aminolysierten Faser eine leicht eingerollte sowie weiß erscheinende Polymerfaser. Die Oberflächenveränderung der behandelten Faser verdeutlicht sich anhand der REM-Aufnahmen. Die Oberfläche wurde aufgrund der Aminolyse teilweise zerstört, so dass eine bloße Betrachtung mit dem Auge zu einer weiß erscheinenden Faser führt, da das sichtbare Licht an der rauen Oberfläche stärker gestreut wird. Unterstützend hierzu hat sich auch der zu beobachtende Durchmesser auf $209 \pm 14 \mu\text{m}$ verringert. Die auf der Oberfläche gleichmäßig verteilten Risse können auf den Produktionsprozess der Fasern zurückzuführen sein. Der Grund der teilweisen Zerstörung der Faseroberfläche liegt in der starken Basizität der verwendeten Diamin-Lösung.^[422] Aus dem Vergleich der REM-Aufnahmen kann geschlossen werden, dass die aminolysierten Fasern eine vergrößerte Oberfläche aufweisen. Dies kann die Anhaftung größerer Mengen an Biomolekülen nach sich ziehen. Zudem kann die erhöhte Oberflächenrauigkeit die Zellanbindung in biomedizinischen Anwendungen verbessern.^[56,423]

Infrarotspektroskopie

Für eine chemische Charakterisierung der beiden Fasertypen wurden ATR-FITR Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 36). Als Vergleich dient ein aufgenommenes IR-Spektrum der reinen Ethylendiamin-Lösung.

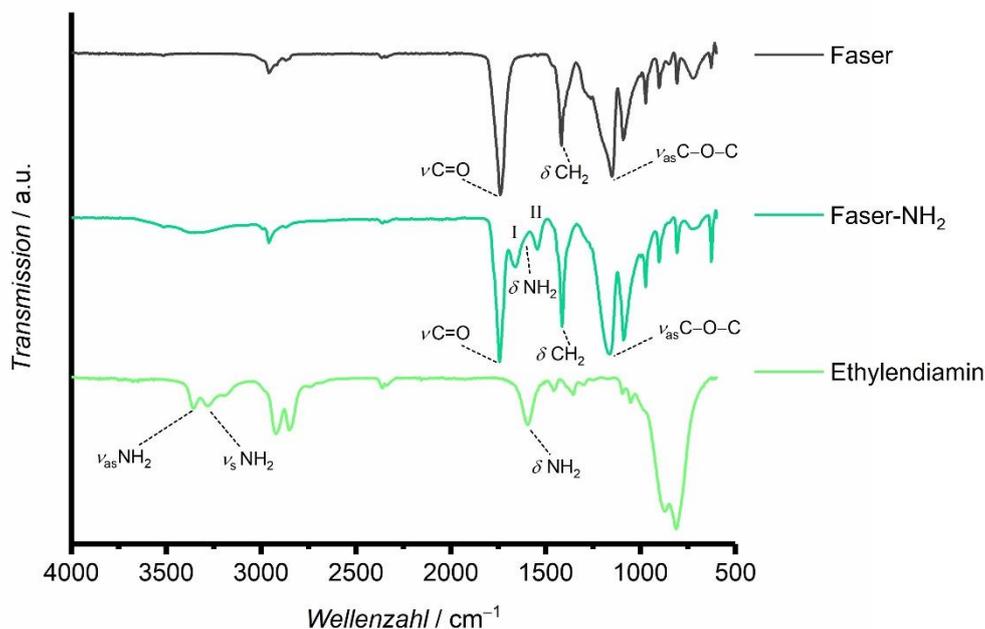


Abbildung 36: Infrarotspektrum der unmodifizierten und amino-modifizierten Fasern sowie von reinem Ethylendiamin. In den Spektren der beiden Fasertypen sind charakteristische Banden von Polyestern markiert. Zudem sind in dem Spektrum der aminolysierten Fasern sowie von Ethylendiamin die Banden der Aminogruppen gekennzeichnet. Auch die Amid I und II Schwingung sind in dem Spektrum der amino-modifizierten Fasern hervorgehoben.

Die Spektren der beiden Fasern zeigen typische Schwingungsbanden für Polyester, wie es auch Polyglykolsäure und Poly- ϵ -Caprolacton sind.^[301,403,424] So erscheint in den jeweiligen Spektren eine intensive C=O-Streckschwingung bei 1739 cm^{-1} für die unmodifizierten und bei 1743 cm^{-1} für die amino-modifizierten Fasern. Weiterhin weisen beide Spektren eine CH₂-Deformationsschwingung (bei 1417 cm^{-1} für die unmodifizierten und bei 1413 cm^{-1} für die amino-modifizierten Fasern) sowie Banden für asymmetrische C-O-C-Streckschwingungen auf (bei 1151 cm^{-1} für die unmodifizierten und bei 1163 cm^{-1} für die amino-modifizierten Fasern). Symmetrische C-O-C-Streckschwingungen (bei 1091 cm^{-1} für die unmodifizierten und bei 1089 cm^{-1} für die amino-modifizierten Fasern) sind ebenfalls zu finden. Zudem kann die Schwingung bei 974 cm^{-1} der asymmetrischen C-O-C-Deformationsschwingung der Estergruppen der beiden Fasertypen zugeordnet werden. Auch die C-H-Deformationsschwingung bei einer Wellenzahl von 902 cm^{-1} kann sowohl den un- als auch den amino-modifizierten Fasern zugeordnet werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit, dass die Fasern, wie erwartet, aus Kohlenwasserstoffen mit Estergruppen bestehen. Bei einem Vergleich mit den Infrarotspektren aus der Literatur deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass PGA

der Hauptbestandteil dieser Polymerfasern ist.^[425] Zugehörige IR-Spektren von PCL weisen vor allem im Bereich von 1250 cm^{-1} bis 1450 cm^{-1} zusätzliche Schwingungsbanden auf,^[302] welche weiteren C-H-Schwingungen zugeordnet werden können.^[403] Weiterhin wird durch die Ergebnisse bestätigt, dass sich die chemische Zusammensetzung der aminolysierten Fasern nach der Behandlung mit Ethylendiamin nicht signifikant geändert hat. Nichtsdestotrotz erscheinen im Spektrum dieser Fasern einige zusätzliche Banden, welche die erfolgreiche Aminomodifizierung bestätigen. Zunächst ist hier eine breite IR Bande mit geringer Intensität zwischen 3700 cm^{-1} und 3100 cm^{-1} zu sehen, welche symmetrischen und asymmetrischen NH_2 -Streckschwingungen zugeordnet werden kann. Das Spektrum der aminolysierten Fasern zeigt zusätzlich eine intensive Bande bei 1660 cm^{-1} , welche der C=O-Streckschwingung der Amidgruppe angehört (Amid-I-Bande). Hier kann eine leichte Schulter zu kleineren Wellenzahlen identifiziert werden, welche der NH_2 -Deformationsschwingung der primären Aminogruppe des oberflächengebundenen Ethylendiamins zugeschrieben werden kann. Weiterhin kann die intensive Bande bei 1545 cm^{-1} sowohl der C-N-H-Deformationsschwingung als auch der C-H-Streckschwingung der Amidgruppe zugeordnet werden (Amid-II-Bande).^[403,424] Somit belegen die vorliegenden Ergebnisse die kovalente Anbindung des Ethylendiamins an die Polymerfasern. Da diese Reaktion hauptsächlich an der Oberfläche der Fasern stattgefunden hat, ist diese nun mit freien Aminogruppen bestückt. Alle Banden sind einer ausführlichen Tabelle im Anhang zu entnehmen (siehe Tabelle 9).

Fluoreszenzmarkierung

Um die primären Aminogruppen, welche einen Einfluss auf die spätere Anbindung der Biomoleküle haben, auf der Oberfläche der Fasern zu visualisieren, wurden sie sowohl mit Fluorescein- als auch mit Rhodaminisothiocyanat markiert. In beiden Fällen sollen die Farbstoffe kovalent angebunden werden, indem die Isothiocyanatgruppe mit den primären Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern reagiert. Im Gegensatz dazu können die Estergruppen auf der Polymerfaseroberfläche mit den Farbstoffen FITC/RITC unter den gegebenen Bedingungen keine Bindung eingehen.^[397,410,411] Visualisiert wurden die Ergebnisse sowohl mit fotografischen als auch mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Sie sind in Abbildung 37 dargestellt.

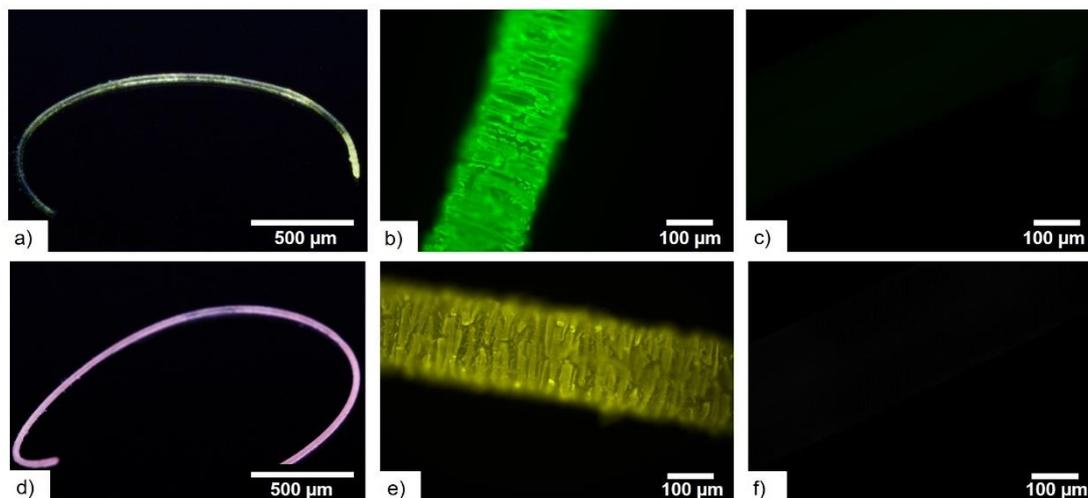


Abbildung 37: Visualisierung der freien Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern. Zu sehen sind fotografische Aufnahmen der mit FITC (a) bzw. RITC (d) behandelten amino-modifizierten Fasern. Zudem sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Fasern dargestellt: (b) amino-modifizierte Faser behandelt mit FITC, (c) unmodifizierte Faser behandelt mit FITC, (e) amino-modifizierte Faser behandelt mit RITC, (f) unmodifizierte Faser behandelt mit RITC.

Schon die Fotografien weisen auf eine erfolgreiche Anbindung der beiden Farbstoffe hin, da sie die Fasern in den charakteristischen Farben von FITC bzw. RITC zeigen. Während die mit FITC modifizierten Fasern gelb erscheinen, weisen die mit RITC behandelten Fasern eine rötliche Färbung auf. Das Absorptionsmaximum des ersten Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 490 nm, weswegen die Fasern gelb erscheinen. Dahingegen liegt das Absorptionsmaximum des zweiten Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 533 nm. Folglich erscheinen die Fasern rot. Weiterhin zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der aminolysierten und anschließend mit den Farbstoffen behandelten Fasern die erwartete grüne bzw. gelbe Fluoreszenz für FITC (λ_{Em} : 525 nm) bzw. RITC (λ_{Em} : 627 nm). Auch hier ist die aufgeraute Oberfläche der Fasern zu sehen, welche schon in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu beobachten war (siehe Abbildung 35). Im Gegensatz dazu erscheinen die Aufnahmen der unmodifizierten Fasern schwarz. Sie fluoreszieren folglich nicht, da hier kein Fluoreszenzfarbstoff angebinden werden konnte. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass lediglich an die aminolysierten Fasern ein Fluoreszenzfarbstoff angebinden werden konnte. Die Visualisierung der freien Aminogruppen dient somit als ein weiterer Nachweis für die erfolgreich durchgeführte Aminolyse.

Zetapotentialmessungen

Darüber hinaus konnten Zetapotentialmessungen die erfolgreiche Aminolyse bestätigen. Sie weisen auf die veränderten Oberflächeneigenschaften der Fasern nach deren Behandlung hin, welche für die spätere Anbindung bzw. Freisetzung von Biomolekülen entscheidend sind. Die Messungen wurden bei verschiedenen pH-Werten im physiologischen Bereich, in welchem die Fasern später im Rahmen des CIs ihre Anwendung finden sollen, durchgeführt und sind graphisch in Abbildung 38 dargestellt.

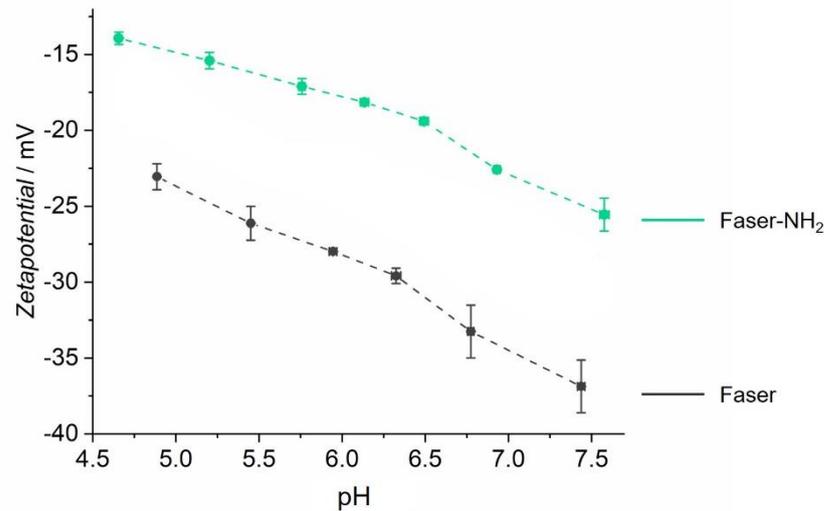


Abbildung 38: Graphische Darstellung des Zetapotentials der unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten (grün) Polymerfasern im physiologischen pH-Bereich. Letztere weisen ein deutlich positiveres Zetapotential auf.

In dem vorliegenden pH-Bereich unterscheiden sich die Kurven der amino- sowie unmodifizierten Fasern stark voneinander. So weisen die unmodifizierten Fasern ein sehr negatives Zetapotential auf, welches von -23.5 ± 0.9 mV bei $\text{pH} \approx 5$ auf -36.9 ± 1.7 mV bei $\text{pH} \approx 7.5$ sinkt. Dies kann möglicherweise auf die Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern zurückzuführen sein. Sie können entweder durch die Spaltung der Estergruppen entstanden oder während des Herstellungsprozesses nicht polymerisiert worden sein.^[299,426] Im Gegensatz dazu zeigen die amino-modifizierten Fasern weitaus weniger negative Werte für das Zetapotential im vorliegenden pH-Bereich. Bei einem leicht sauren pH-Wert von ≈ 5 weisen sie ein Zetapotential von -14.0 ± 0.4 mV auf, welches auf -25.6 ± 1.1 mV bei $\text{pH} \approx 7.5$ absinkt. Als Grund hierfür kann die erfolgreich durchgeführte Aminolyse angesehen werden, da die zusätzlichen Aminogruppen einen basischen Charakter aufweisen und somit protoniert werden können. Dies führt zu einer stärker positiv geladenen Oberfläche.^[59]

Stickstoff Elementaranalyse

Um nicht nur qualitativ nachweisen zu können, dass die Aminolyse erfolgreich Aminogruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern generiert hat, sondern ebenfalls quantitativ den Gehalt an eingeführten NH_2 -Gruppen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine C/N-Elementaranalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Ergebnisse der C/N-Elementaranalyse sowie die sich daraus ergebenden Mengen an eingeführten Aminogruppen pro cm² Faser. Als Vergleich aus der Literatur dienen Ergebnisse einer aminolysierten PCL Membran.

	N-Gehalt / %	Aminogruppen / $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$
Faser	0	0
Faser-NH ₂	0.6 ± 0.1	0.6
Literaturvergleich: Aminolysierte PCL Membran ^[422]	Keine Angaben	0.2

Während die unmodifizierten Polymerfasern, wie erwartet, keinen Stickstoff aufweisen, liegt der N-Gehalt der amino-modifizierten Fasern bei 0.6 ± 0.1 %. Hieraus konnte die Menge an verfügbaren Aminogruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern pro cm² abgeschätzt werden. Sie beläuft sich auf $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Größe der Oberfläche aufgrund der hohen Rauigkeit (siehe REM Aufnahmen) nur unzureichend bestimmt werden konnte. Trotz alledem stellt der errechnete Wert eine erste Einschätzung dar. Schon die Arbeitsgruppe um ZHU *et al.*^[422] konnte einen Gehalt an verfügbaren Aminogruppen auf aminolysierten PCL Membranen von $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ermitteln, um erfolgreich Biomoleküle anzubinden. Somit liegt der im Rahmen dieser Arbeit erreichte Wert sogar über dem Vergleichswert und deutet auf eine ausreichende Oberflächenmodifizierung hin, um weitere Wirkstoffe erfolgreich anbinden zu können.

4.1.2 Degradation der Polymerfasern

Die zuvor charakterisierten Polymerfasern sollen in der Anwendung im Rahmen des Cochlea-Implantats als biodegradierbare neuronale Leitstruktur dienen. Nachdem die Neuriten somit entlang der Fasern zur Oberfläche des Implantats hingewachsen sind, haben diese ihre Funktion erfüllt und sollen vom Körper abgebaut sowie aufgenommen werden. Aufgrund dessen wurden mit PGA- und PCL-Fasern aus zwei biodegradierbaren Polymeren gewählt.^[298,426] Um mehr über den Abbau der Fasern zu erfahren, fanden zunächst Degradationsversuche der Fasern *in vitro* statt. Die Versuche wurden den Bedingungen im Körper bestmöglich angepasst. Es folgt eine genauere Erläuterung der Experimente. Um die Ergebnisse der einzelnen Versuche besser miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst pro Versuch eine kommerziell erworbene Faser in 3 cm lange Stücke geschnitten. Anschließend lagerte jeweils eines dieser Stücke in 2 mL einer PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung, welche ein physiologisches Medium darstellt. Die Temperatur entsprach mit 37 °C der menschlichen Körpertemperatur. Nach bestimmten Zeitabständen (bis 14 Wochen) wurde die Faser aus der Lösung entnommen, mit

Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Es folgte die Analyse der Faser sowie der zugehörigen PBS (+ 0.1 % BSA)-Lösung im Hinblick auf die Degradation. Dieses Vorgehen ähnelt den späteren Freisetzungsexperimenten der Fasern mit den verschiedenen Biomolekülen (siehe Kapitel 3.1.6), sodass die vorliegenden Versuche auch einen Hinweis auf die Degradation der Fasern unter Freisetzungsbedingungen geben.

Zunächst wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Fasern angefertigt, um diese nach verschiedener Verweildauer in der umgebenden Lösung zu charakterisieren. Dazu stellt Abbildung 39 Bilder der un- sowie amino-modifizierten Fasern vergleichend dar, welche eine kurze, mittlere sowie lange Zeit in der Lösung inkubierten.

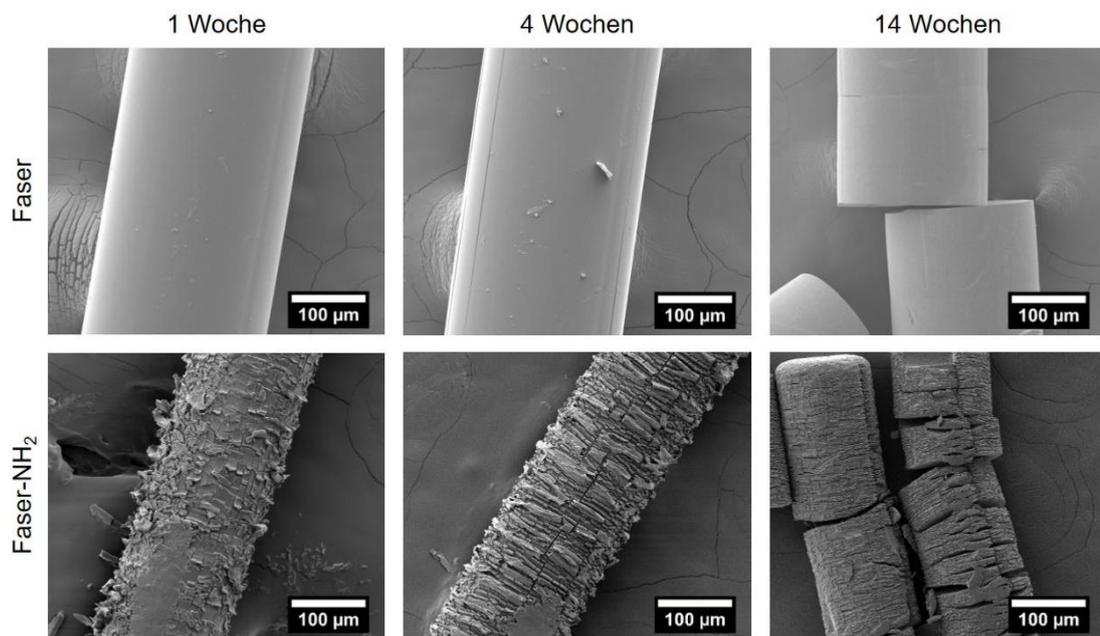


Abbildung 39: REM-Aufnahmen der un- sowie amino-modifizierten Fasern, nachdem sie 1, 4 oder 14 Wochen bei 37 °C in PBS (+0.1 % BSA) gelagert wurden. Die Aufnahmen zeigen, dass die Fasern nach längerer Lagerung in der umgebenden Lösung brüchig werden.

Die vorliegenden REM-Aufnahmen zeigen sowohl bei den un- als auch bei den amino-modifizierten Fasern auftretende Risse und Brüche im Laufe ihrer Lagerung in PBS (+0.1 % BSA). Während beide Fasertypen nach 4 Wochen lediglich einige Risse längs der Faserlänge aufweisen, sind nach 14 Wochen Risse sowie Faserbrüche senkrecht zur Faserlänge zu beobachten. Bei den amino-modifizierten Fasern treten diese häufiger in Erscheinung. Weiterhin ist zu sehen, dass sich die ursprüngliche Oberflächenstruktur der Fasern kaum ändert. Während die unmodifizierten Fasern auch nach 14 Wochen eine glatte Oberfläche aufweisen, ist bei den amino-modifizierten Fasern nach dieser Zeit die aufgeraute Oberflächenstruktur erhalten. Anhand der vorliegenden Bilder lässt sich zudem eine Abnahme des Durchmessers erahnen. Die Veränderung des Durchmessers mit fortschreitender Inkubationszeit wird in Abbildung 40 dargestellt und wurde anhand der REM-Aufnahmen ausgemessen und berechnet. Für einen besseren Vergleich der beiden Fasertypen untereinander wurde die prozentuale Abnahme des

Durchmessers abhängig vom anfänglichen Durchmesser errechnet. Außerdem stellt die Abbildung den Gewichtsverlust der Fasern nach Lagerung in PBS (+0.1 % BSA) dar (ebenfalls prozentual).

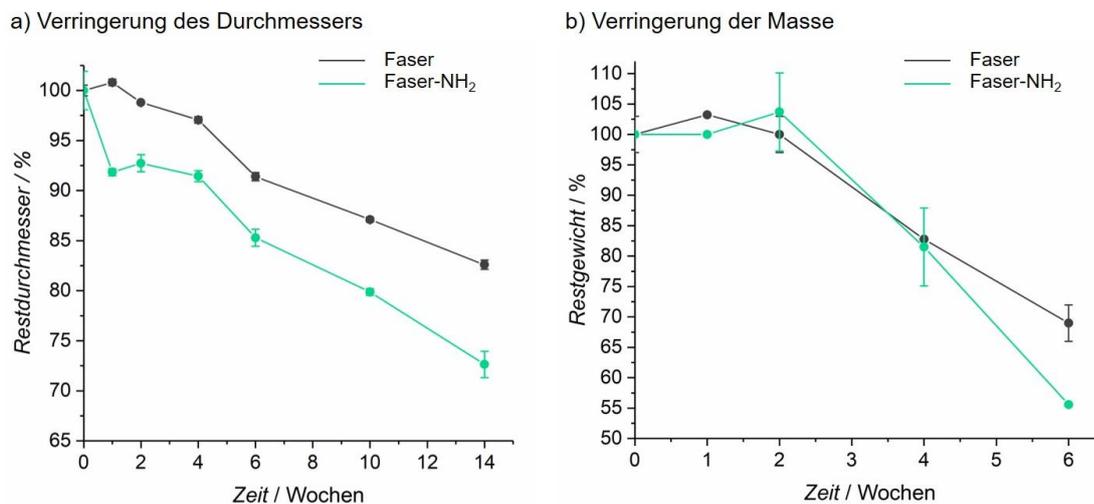


Abbildung 40: Graphische Darstellung der Verringerung des Durchmessers (a) sowie der Masse (b) der un- sowie amino-modifizierten Fasern nach Lagerung in PBS (+0.1 % BSA) bei 37 °C.

Über den beobachteten Zeitraum von 14 Wochen nimmt der Durchmesser beider Fasertypen im Durchschnitt kontinuierlich ab, wobei die amino-modifizierten Fasern eine stärkere Abnahme des Durchmessers verzeichnen. Nach 14 Wochen besitzen die amino-modifizierten Fasern einen Restdurchmesser von 72.6 ± 1.3 % und die unmodifizierten Fasern einen Durchmesser von 82.6 ± 0.5 %. Zusammen mit den REM-Aufnahmen deuten die vorliegenden Ergebnisse somit auf eine Degradation der Fasern hin. Aufgrund der vorherigen Modifizierung mit den Aminogruppen und der daraus resultierenden stärker angegriffenen Oberfläche dieser Fasern degradieren diese möglicherweise stärker als die unmodifizierten Fasern. Auch die Massenverluste beider Fasertypen mit ansteigender Inkubationsdauer in PBS (+0.1 % BSA) unterstützen die vorliegenden Resultate. Da die Fasern nach 10-wöchiger Lagerung in der umgebenden Lösung jedoch sehr brüchig waren, konnten sie nicht weiter auf ihr Gewicht hin überprüft werden. Insgesamt weisen jedoch die amino-modifizierten Fasern nach 6 Wochen Inkubation eine Restmasse von 55.6 ± 1.0 % und die unmodifizierten Fasern eine Restmasse von 69.0 ± 3.0 % auf. Somit deuten auch diese Ergebnisse auf die stärkere Degradation der amino-modifizierten Fasern hin.

Die Degradation der Fasern vollzieht sich in der hydrolytischen Spaltung der Polyestergruppen, welche anschließend als Carbonsäuren sowie Alkohole in das umgebende Lösungsmittel abgegeben werden und einen Einfluss auf den vorliegenden pH-Wert haben können.^[298,426] Aufgrund dessen wurden zusätzlich die pH-Werte der einzelnen Inkubationslösungen nach Entnahme der Fasern vermessen (siehe Abbildung 41).

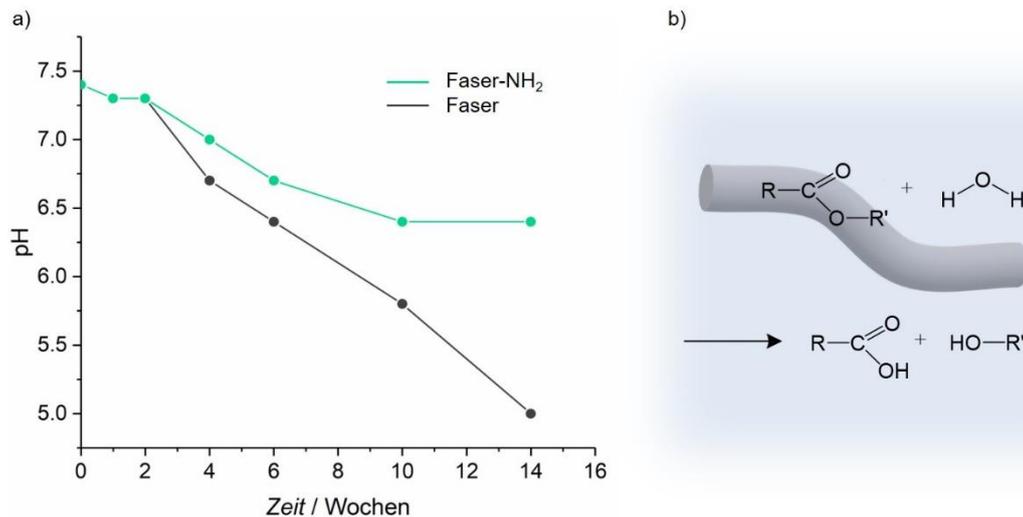


Abbildung 41: Graphische Darstellung der pH-Werte der Inkubationslösungen der un- sowie amino-modifizierten Polymerfasern, nachdem diese nach definierten Zeitpunkten aus der Lösung entnommen wurden. Es ist eine Abnahme der pH-Werte mit steigender Inkubationszeit zu erkennen (a). Schematische Darstellung der Reaktionsgleichung zur Esterhydrolyse der Faser in wässrigem Medium. Hierbei beschreiben R sowie R' die zwei verschiedenen Kohlenwasserstoffreste (b).

Anhand der vorliegenden Grafik ist zu erkennen, dass der pH-Wert in der umgebenden Lösung der un- sowie amino-modifizierten Fasern sinkt, je länger die Fasern inkubiert wurden. Während sich bei den unmodifizierten Fasern eine kontinuierliche Abnahme des pH-Wertes zeigt, sinkt dieser bei den amino-modifizierten Fasern zunächst stärker und anschließend schwächer ab. Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen die Annahme einer fortschreitenden Degradation der Polymerfasern, indem ihre Estergruppen hydrolytisch gespalten und die Produkte u. a. als Carbonsäuren in das umgebende Lösungsmittel abgegeben werden.^[298,426] Dadurch verringert sich dessen pH-Wert. Während die Lösung der unmodifizierten Fasern nach 14 Wochen einen pH-Wert von 5.0 aufweist, bringt diejenige der amino-modifizierten Fasern einen pH-Wert von 6.5 hervor. Der Unterschied lässt sich durch den Einfluss der basischen Aminogruppen erklären. Diese wirken den Carbonsäuren verstärkt entgegen, sodass die pH-Abnahme schwächer ausfällt. Es ist zu vermuten, dass sich auch oberflächengebundenes Ethylen-diamin durch die hydrolytische Esterspaltung ablösen kann.

Um diesen Effekt weiter zu untersuchen und zudem festzustellen, inwieweit sich die chemische Zusammensetzung der Fasern über die Zeit ändert, wurden IR-Spektren der Fasern nach der jeweiligen Inkubationszeit aufgenommen. Abbildung 42 zeigt die graphische Darstellung der IR-Aufnahmen der un- sowie amino-modifizierten Fasern zu verschiedenen Zeitpunkten.

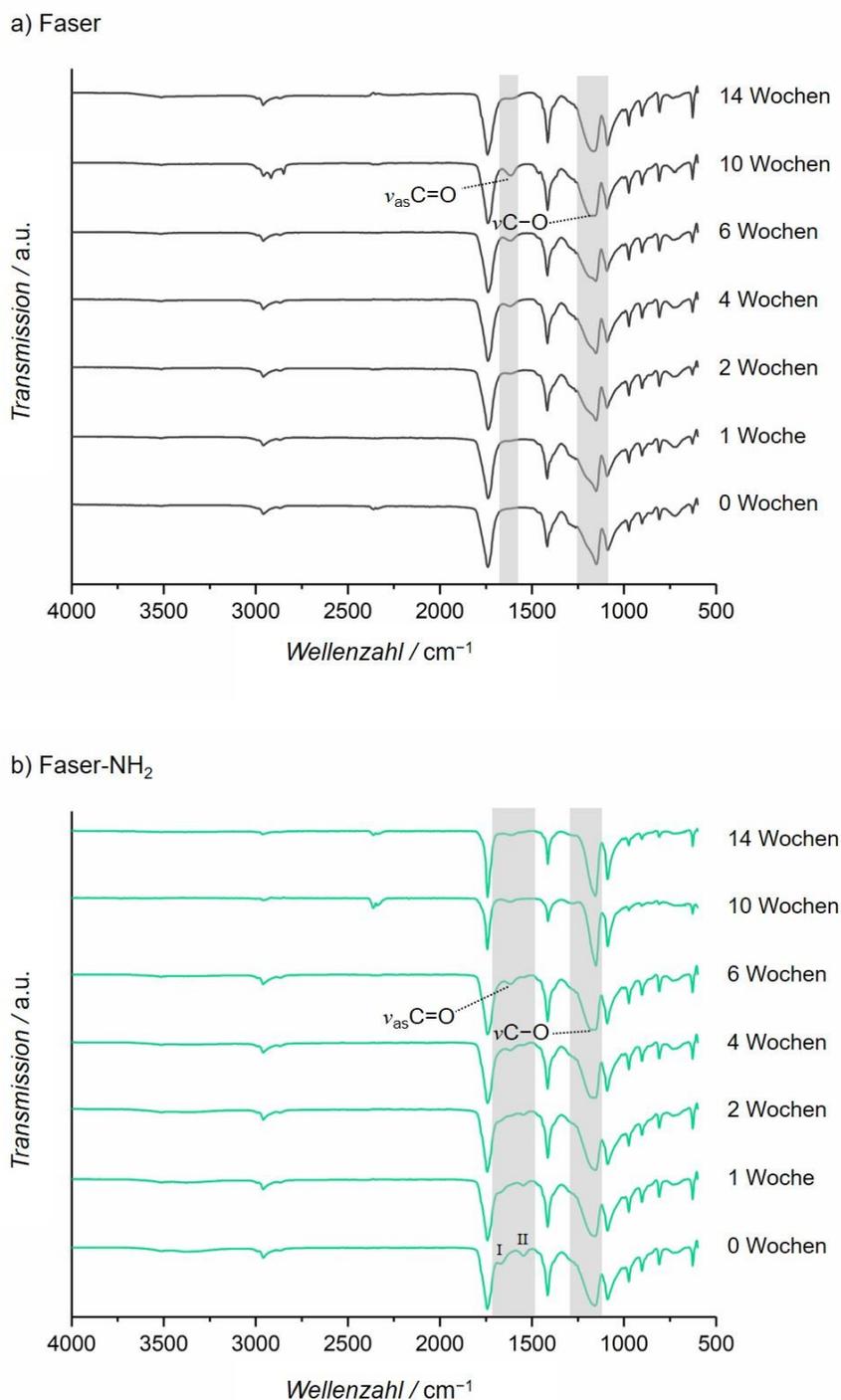


Abbildung 42: Graphische Darstellung der IR-Aufnahmen der unmodifizierten (a) sowie amino-modifizierten (b) Fasern, nachdem sie für verschiedene Zeiten in PBS (+0.1 % BSA) inkubierten. Die chemische Komposition der Fasern bleibt im Allgemeinen erhalten. Anhand der markierten Bereiche sind jedoch zusätzliche Schwingungsbänder erkennbar, die auf eine Degradation der Fasern schließen lassen.

Die IR-Spektren der un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche 0 bis 14 Wochen inkubierten, weisen unabhängig von ihrer Lagerungsdauer in PBS (+0.1 % BSA) eine hohe Übereinstimmung auf. Dies lässt darauf schließen, dass die chemische Komposition der Fasern im Allgemeinen erhalten blieb. Trotz alledem sind bei beiden Fasertypen ein paar Veränderungen in den IR-Spektren zu beobachten. Diese Bereiche wurden in der zugehörigen Grafik markiert.

In den Spektren beider Fasertypen ist bei einer Wellenzahl von 1188 cm^{-1} mit steigender Inkubationsdauer eine zusätzliche Schulter zu beobachten. Sie bildet sich stärker aus, je länger die Faser in der Lösung lagert. Die zusätzliche Bande ist auf eine C-O-Valenzschwingung zurückzuführen, die in Anwesenheit von Alkoholen auftritt.^[403] Dies ist ein Hinweis auf die fortschreitende Degradation der Polymerfasern durch eine hydrolytische Spaltung der vorhandenen Estergruppen. Als Produkt entsteht hier unter anderem ein Alkohol.^[298,426] Am deutlichsten ist diese IR-Bande in dem Spektrum der unmodifizierten Faser, welche für 10 Wochen behandelt wurde, zu beobachten. Bei den amino-modifizierten Fasern ist diese Bande am deutlichsten in dem Spektrum der Faser, welche für 6 Wochen inkubiert wurde, zu erkennen. Entgegen der Erwartung ist die Bande in den IR-Spektren der Fasern, welche für eine längere Zeit inkubiert wurden, etwas weniger stark ausgeprägt. Der Grund hierfür liegt in der Beschaffenheit der Probe. Von der unmodifizierten Faser liegen nach 14 Wochen und von der amino-modifizierten Faser schon nach 10 Wochen nur noch wenige, kleine Bruchstücke vor. Im Gegensatz zu den IR-Messungen zuvor kann somit nicht mehr die Faser als Ganzes vermessen werden. Dadurch ergeben sich Abweichungen in den Ergebnissen. Weiterhin weisen die Spektren beider Fasertypen eine zusätzliche aufkommende Bande bei 1616 cm^{-1} auf. Sie kann einer antisymmetrischen C=O-Streckschwingung zugeordnet werden, welche in Anwesenheit von Carboxylatgruppen auftritt.^[403] Auch dies weist auf die fortschreitende Degradation der Fasern hin, bei der neben dem Alkohol durch die hydrolytische Esterspaltung ebenfalls eine Carbonsäure entsteht.^[298,426] Der niedrige pH-Wert im sauren Bereich (siehe Abbildung 41) deutet auf eine Deprotonierung dieser Gruppe hin. Wie zuvor beschrieben, weisen die IR-Spektren der unmodifizierten und amino-modifizierten Fasern ab einer Inkubationsdauer von 14 bzw. 10 Wochen eine geringere Intensität der Bande auf, da die Probe sehr stark degradiert vorliegt und somit die Faser nicht mehr als Ganzes vermessen werden konnte. Bei den Spektren der amino-modifizierten Fasern ist zusätzlich zu erkennen, dass die markierten Amid-I- und -II-Banden, welche die kovalente Anbindung des Ethylendiamins aufzeigen, mit der Zeit verschwinden. Nach 6 Wochen sind sie kaum noch erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass der Gehalt an Ethylendiamin auf der Oberfläche der Polymerfasern abnimmt. Ob nach 6 Wochen noch Aminogruppen auf der Faseroberfläche zu finden sind, kann mit Hilfe der vorliegenden Messmethode jedoch nicht ausgesagt werden. Es scheint allerdings so, dass das Ethylendiamin durch die hydrolytische Esterspaltung ebenfalls mit abgetrennt wird. Somit zeigen auch die vorliegenden IR-Spektren die fortschreitende Degradation beider Polymerfasertypen. Es ist jedoch zu erkennen, dass sich die chemische Zusammensetzung der Fasern im Wesentlichen kaum ändert.

Die beobachtete Degradation der Fasern *in vitro* ist vergleichbar mit vorherigen Studien und wurde schon vielfach untersucht.^[80,84,273,298,426-428] Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass in diesem Fall eine Oberflächendegradation stattgefunden hat, da

neben der Masse der Fasern auch der zugehörige Durchmesser abnimmt.^[80] Weiterhin konnten die beobachteten Risse quer und längs zur Faserrichtung auch schon von GINDE *et al.*^[298] und CHU *et al.*^[427] bei PGA beobachtet werden. Aus Mikrorissen entstehen demnach größere Risse, die zur Fragmentierung der Faser führen. Durch die Risse ist es möglich, dass Wassermoleküle besser in die Faser propagieren und den hydrolytischen Abbau fördern. Hierbei werden den Autoren zufolge zunächst amorphe Bereiche und anschließend kristalline Regionen im Polymer hydrolysiert. Dies kann in Zukunft mit Hilfe von XRD/DSC Messungen an den vorliegenden Fasern überprüft werden. Auch GINDE *et al.*^[298] gehen von einer Oberflächendegradation im Falle des PGA aus. Demgegenüber degradieren die PGA Fasern nach GOMBOTZ und PETIT *in vitro* in einem bulk-Erosionsprozess. Dabei diffundiert das Wasser in die Fasern und löst die Hydrolyse aus.^[80,273] Die entstehenden Carbonsäuren können auf diese Weise lokal eine saure Umgebung erzeugen, welche anschließend zur Autokatalyse führen kann. Dieser Vorgang wurde ebenfalls schon bei PCL beobachtet.^[426] Möglicherweise liegt bei den Fasern in dieser Arbeit eine Kombination der Mechanismen vor. Weiterhin kann das phosphatgepufferte Medium die Hydrolyse katalytisch unterstützen, indem das Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) mit den entstehenden Carbonsäuren zu Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) und dem zugehörigen Carboxylat reagiert. Da der Puffer die Abbauprodukte entfernt, verlagert sich die hydrolytische Reaktion in Richtung einer erhöhten Hydrolyse. Dies konnte schon bei PGA beobachtet werden.^[428] Daher besteht die Vermutung, dass alle beschriebenen Mechanismen einen Einfluss auf den Abbau sowie die Abbaurate der Fasern haben, sodass anhand der vorliegenden Daten (siehe Abbildung 40 sowie Abbildung 41) nicht klar definiert werden kann, nach welcher Kinetik das Material abgebaut wird. Auch in der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Abbaurate der vorliegenden Polyester. Während der Abbau des PCL einer Kinetik 1. Ordnung zugeschrieben wird,^[288] konnte bei PGA-Fasern eine Abbaukinetik 2. Ordnung beobachtet werden.^[298] Da die Degradation der Polymere jedoch von vielen Faktoren, wie der Größe und Form des Substrats, der Kristallinität, der Temperatur, dem pH-Wert sowie dem Puffer (etc.) abhängig ist, ist eine Einordnung der zu beobachteten Kinetik komplex. Aufgrund dessen wird weiterhin vielfach in diesem Bereich geforscht.^[298,426] Zudem dienen die vorliegenden *in vitro* Versuche lediglich einer Abschätzung des Degradationsverhaltens der Fasern, welche später *in vivo* im menschlichen Körper eingesetzt werden sollen. Durch die veränderten Verhältnisse sowie den zusätzlichen Effekt der Enzyme auf die Degradation der Polymere können sich somit andere Abbauraten ergeben.

Da die vorliegenden Fasern nach 14 Wochen zu einem Großteil abgebaut wurden, deuten die erhaltenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit insgesamt auf einen erhöhten Gehalt an PGA gegenüber PCL in dem vorliegenden Material hin. Studien belegen den vollständigen Abbau von PGA aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften im Körper 4 Wochen nach Implantation, wobei in diesem Fall auch Enzyme die Abbaurate beeinflussen können.^[297] Demgegenüber

soll sich das hydrophobere PCL erst nach 3-4 Jahren vollständig abgebaut haben.^[80] Auch die IR-Untersuchungen aus dem vorherigen Kapitel 4.1.1 deuten auf einen erhöhten Gehalt an PGA hin. Die amino-modifizierten Fasern degradieren möglicherweise aufgrund ihrer höheren Oberfläche sowie den entstandenen Mikrorissen schneller als die unmodifizierten Fasern. Dies zeigte sich sowohl bei der Massenabnahme, der Reduzierung des Durchmessers als auch bei der schneller zu beobachteten makroskopischen Zersetzung der Fasern nach 10 und nicht erst nach 14 Wochen (unmodifizierte Fasern).

Für die Anwendung im Rahmen des Cochlea-Implantats konnte somit erfolgreich gezeigt werden, dass das Material im physiologischen Medium bei 37 °C Körpertemperatur abgebaut und folglich als Modellmaterial für eine biodegradierbare neuronale Leitstruktur eingesetzt werden kann. Weitere *in vivo* Untersuchungen würden Aufschluss über das Verhalten der Fasern im Körper geben und den Einfluss von Enzymen auf die Abbaurate darlegen, sind jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

4.1.3 Zusammenfassung

Für ihren Einsatz als neuronale Leitstruktur im Rahmen des CIs wurden die Polymerfasern zunächst charakterisiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fasern zu einem höheren Anteil aus PGA als aus PCL bestehen. Eine Amino-Modifizierung der Oberfläche sollte eine Alternative bilden, um später Wirkstoffe adäquat anbinden zu können. Während die unmodifizierten Fasern eine glatte Oberfläche aufweisen, zeigen die Fasern nach der erfolgreichen kovalenten Anbindung von Ethylendiamin aufgeraute Oberflächeneigenschaften sowie einen geringeren Durchmesser. Die dadurch vergrößerte Oberfläche kann sich positiv auf die Menge an angebotenen Biomolekülen auswirken. Zudem ist es möglich, dass die Zelladhäsion durch eine raue Oberfläche verbessert wird.^[56,423] Nachgewiesen werden konnte die Amino-Modifizierung qualitativ durch IR-Messungen sowie die Anbindung der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und RITC. Auch Zetapotentialmessungen im physiologischen pH-Bereich deuten auf die erfolgreiche Aminolyse hin. Zudem zeigen sie die veränderten Oberflächeneigenschaften nach der Anbindung von Ethylendiamin auf, welche einen Einfluss auf die spätere Anbindung sowie Freisetzung der Biomoleküle haben. Die Oberflächenladung der Fasern verschiebt sich nach der Aminolyse zu positiveren Werten. Letztlich konnte die Menge an eingeführten Aminogruppen über die C/N-Elementaranalyse abgeschätzt werden. Aufgrund vorangegangener Studien kann angenommen werden, dass genug NH₂-Gruppen generiert wurden, um einen positiven Einfluss auf die Anbindung von Wirkstoffen auszuüben.^[422] In der Zukunft könnten weitere quantitative Aussagen über den Gehalt an eingeführten Aminogruppen, z. B. mit einem Ninhydrin-Test,^[410] die spätere Anbindung der Biomoleküle optimieren, um die Anwendung der Fasern im Rahmen des CIs zu verbessern. Zudem weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Fasern ebenfalls als biodegradierbare Leitstruktur eingesetzt werden

können. Die *in vitro* Degradationsversuche zeigen den Abbau der Fasern in PBS über einen Zeitraum von 14 Wochen, nach denen sich das Material zu einem Großteil zersetzt hat. Da mit fortlaufender Zeit nicht nur die Masse der Fasern, sondern zusätzlich der Durchmesser der Fasern sank, wird eine Oberflächendegradation vermutet. Die entstandenen Risse in der Faser lassen jedoch vermuten, dass zudem ein *Bulk*-Erosionsprozess stattgefunden hat. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann anhand von IR- sowie pH-Wert-Messungen des umgebenden Lösungsmittels geschlussfolgert werden, dass die Fasern durch eine hydrolytische Esterspaltung abgebaut werden. Da die Fasern, wie zuvor beschrieben, schon nach wenigen Wochen fast vollständig degradieren, wird die Vermutung bestätigt, dass sie hauptsächlich aus dem hydrophileren PGA zusammengesetzt sind.^[297] Zudem ist zu beobachten, dass die amino-modifizierten Fasern schneller abgebaut werden als die unmodifizierten Fasern. Zusätzlich löst sich auch ein Teil der Oberflächenmodifikation nach einigen Wochen von den amino-modifizierten Fasern. Welche Mengen jedoch weiterhin auf der Oberfläche vorhanden sind, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt und muss genauer untersucht werden. Insgesamt stellen sowohl die unmodifizierten als auch die amino-modifizierten Fasern ein geeignetes Modellmaterial für eine biodegradierbare neuronale Leitstruktur im Rahmen des Cochlea-Implantats dar, welche somit für die Immobilisierung verschiedener Biomoleküle genutzt werden kann.

4.2 Dekoration der Polymerfasern mit dem Glykoprotein der extrazellulären Matrix: Heparansulfat

Im Rahmen des CIs werden die zuvor charakterisierten Polymerfasern als Basismaterialien für ein zukünftiges neuronales Leitsystem verwendet. Um das Entlangwachsen der Spiralganglion-Neuriten entlang dieser Fasern zu fördern, werden sie mit HS beschichtet. Fest angebunden an die Fasern soll es die extrazelluläre Matrix imitieren. Somit beschäftigen sich die folgenden Kapitel mit der stabilen Immobilisierung des Biomoleküls auf den beiden Polymerfaser-Typen.

4.2.1 Immobilisierung von Heparansulfat

Um die Anbindung des HS an die Polymerfasern besser zu verstehen, wird es zunächst genauer charakterisiert. Da es sich bei dem Molekül um ein saures Polyanion handelt, gehört es zu den geladenen Polymeren, deren Struktur sich durch äußere Einflüsse ändern kann.^[88] Da innerhalb der vorliegenden Arbeit mit HS in wässrigen Medien mit verschiedenen pH-Werten gearbeitet wurde, sollte untersucht werden, inwieweit sich die Größe des Moleküls mit dem pH-Wert ändert. Dazu wurden DLS-Messungen von gelöstem HS in wässrigen Medien bei verschiedenen pH-Werten angefertigt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.

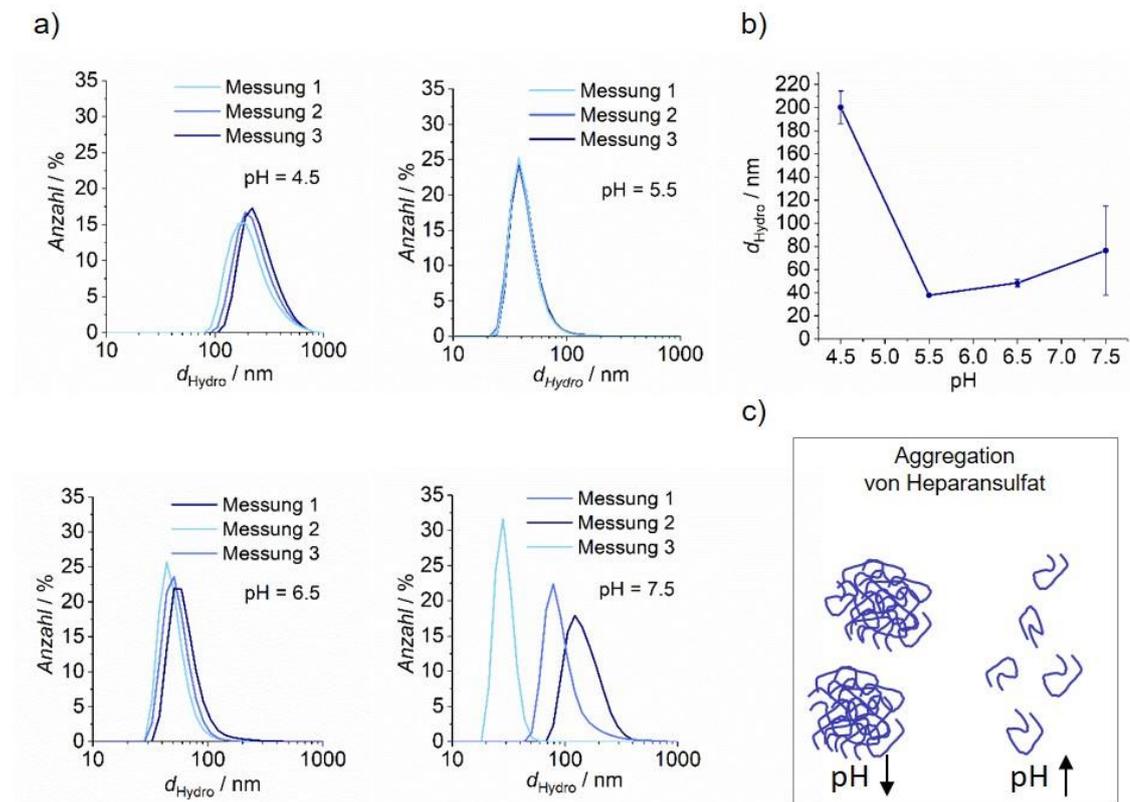


Abbildung 43: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von HS bei verschiedenen pH-Werten (4.5 bis 7.5) in Wasser mittels DLS (a). Zusätzlich sind die Maximalwerte des hydrodynamischen Durchmessers in Abhängigkeit des verwendeten pH-Wertes dargestellt (b). Resultierend daraus wurde die Faltung der HS-Polymerstränge bei verschiedenen pH-Werten visualisiert (c). Schematische Darstellung: Die Polymerstränge des HS liegen bei niedrigen pH-Werten aggregiert und bei höheren pH-Werten einzeln bzw. weniger aggregiert vor.

Sowohl anhand der einzelnen DLS-Messungen bei verschiedenen pH-Werten (Abbildung 43 links) als auch anhand der zusammenfassenden Grafik, welche die Abhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers vom verwendeten pH-Wert zeigt (Abbildung 43 rechts oben), ist eine Veränderung der Größe des HS zu erkennen. Während der hydrodynamische Durchmesser im sauren Milieu mit $d \approx 200$ nm vergleichsweise hoch liegt, sinkt er bei höheren pH-Werten ab. Bei einem pH-Wert von 5.5 liegt er nur noch bei etwa 38 nm, bei einem pH-Wert von 6.5 bei ca. 48 nm und bei einem pH-Wert von 7.5 ist er bei ungefähr 76 nm angesiedelt. Mit steigendem pH-Wert erhöht sich jedoch die Standardabweichung bzw. die einzelnen Messergebnisse weichen stärker voneinander ab. Bei niedrigen pH-Werten liegen die Sulfat- sowie Säuregruppen des Polysaccharids protoniert vor, sodass die Ladung geringer ausfällt. Dies könnte zu einer Aggregation der Moleküle führen. Der gemessene hydrodynamische Durchmesser steigt an. Da HS zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen ausbilden kann, ist dieses Verhalten sehr wahrscheinlich. Demgegenüber werden die sauren Gruppen von HS bei höheren pH-Werten deprotoniert, sodass die entstehenden negativen Ladungen einer Aggregation entgegenwirken. Somit wird ein geringerer hydrodynamischer Durchmesser bestimmt.^[429] Visualisiert worden ist dieser Prozess in Abbildung 43 unten rechts. Verglichen mit der Literatur, bei der nach Angaben von RABENSTEIN *et al.*^[88] ein HS-

Strang eine Länge von bis zu 160 nm aufweist, fallen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Größen von nicht aggregiertem HS niedriger aus. Möglicherweise liegt dies daran, dass ein Polymerstrang verschiedene Konformationen einnehmen kann.

Nachweis des angebundenen Heparansulfats mittels Toluidinblau-Test

Das nun charakterisierte HS sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kovalent an die unmodifizierten sowie amino-modifizierten Fasern angebunden werden, indem diese für 24 h bei 4 °C in einer 200 μ M Lösung des Wirkstoffes mit EDC und NHS in MES Puffer inkubiert wurden. In einer Variation des Experiments wurde untersucht, inwieweit sich HS ohne Kupplungsreagenzien an die Fasern anlagert. Als qualitative Nachweismethode für die erfolgreiche Anbindung des HS diente der Toluidinblau-Test.^[376,379,412] Nach der Inkubation der behandelten Fasern in einer Toluidinblau-Farbstofflösung wurde die restliche Extinktion des Farbstoffs mittels UV-Vis-Spektroskopie bei 631 nm vermessen. Nach MACINTOSH^[412] bildet TB einen Komplex mit den veresterten Schwefelsäuregruppen des HS. Somit bindet es an das auf den Fasern gebundene Polysaccharid und wird aus der umgebenden Lösung entfernt, was in einer geringeren Extinktionsrate des TB in der umgebenden Lösung resultiert. Abbildung 44 stellt die erhaltenen Extinktionsraten graphisch dar. Unterstützend stellt Tabelle 4 die zugehörigen Werte dar. Für einen besseren Vergleich untereinander wurden die Extinktionsraten der Proben ohne HS jeweils auf 100 % festgelegt. Die erhaltenen Intensitäten der zugehörigen Proben mit HS wurden entsprechend prozentual berechnet.

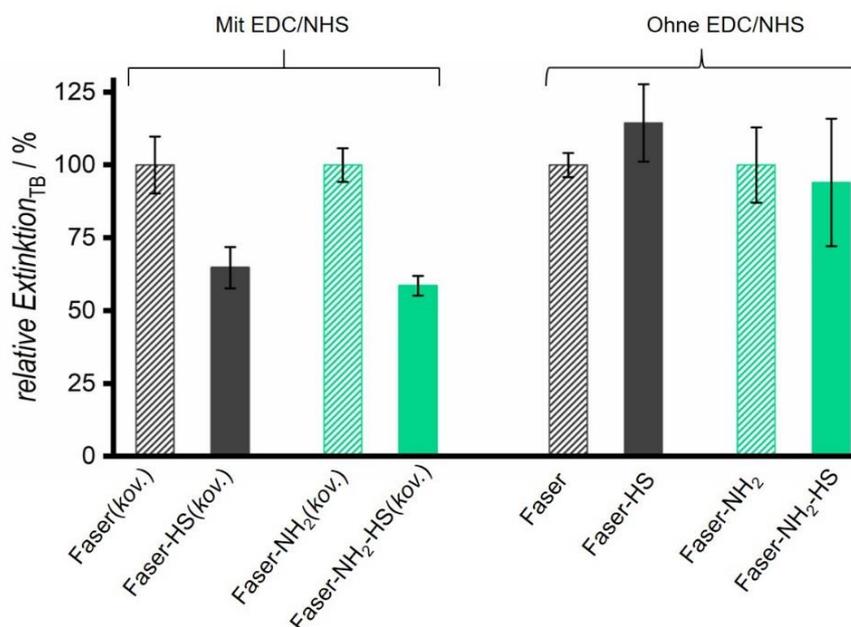


Abbildung 44: Graphische Darstellung der Intensität der relativen Extinktion der TB-Lösungen nach dem zugehörigen Testverfahren in Prozent. Links: Ergebnisse der Proben unter Zuhilfenahme der Kupplungsreagenzien EDC/NHS (*kov.*). Rechts: Ergebnisse der Proben ohne Nutzung der Kupplungsreagenzien. Die Ergebnisse der Proben ohne HS wurden für einen systematischen Vergleich auf 100 % gesetzt. Die anderen Ergebnisse wurden jeweils prozentual angeglichen. Die Ergebnisse der Proben mit EDC/NHS zeigen eine verminderte Extinktionsrate für die Proben mit HS verglichen mit den Proben ohne Biomolekül. Die Resultate der Proben ohne EDC/NHS weisen diesen Trend jedoch nicht auf.

Tabelle 4: Vergleich der Intensitäten der Extinktionsraten der TB-Lösungen nach dem zugehörigen Testverfahren in %. Es sind die Ergebnisse der un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche mit (kov.) bzw. ohne EDC/NHS und HS behandelt wurden, dargestellt.

Faser-Typ ⁷	Intensität der Extinktion der TB-Lösung / %	
	Mit Heparansulfat	Ohne Heparansulfat
Faser(-HS)(kov.)	64.8 ± 7.1	100 ± 9.7
Faser-NH ₂ (-HS)(kov.)	58.6 ± 2.9	100 ± 5.8
Faser(-HS)	114.4 ± 13.3	100 ± 4.2
Faser-NH ₂ (-HS)	94.0 ± 21.9	100 ± 12.9

Die Ergebnisse der Versuche unter Zuhilfenahme der Kupplungsreagenzien EDC/NHS der un- sowie amino-modifizierten Fasern ähneln sich sehr. In beiden Fällen liegen die Intensitäten der gemessenen TB-Lösungen, welche in Kontakt mit den HS-Fasern kamen, unter den erhaltenen Intensitäten der TB-Lösungen, in welchen lediglich die Kontrollproben ohne HS inkubiert wurden. Für die unmodifizierten Fasern mit HS wurde eine Intensität der TB-Lösung von 64.8 ± 7.1 % erhalten, wohingegen die zugehörigen Kontroll-Fasern inkl. Standardabweichung eine gemessene TB-Intensität von 100 ± 9.7 % erzeugten. In Anlehnung daran zeigte auch die TB-Lösung, in welcher die amino-modifizierten Fasern mit HS (58.6 ± 2.9 %) inkubiert wurden, eine geringere Extinktionsrate als ihre Kontrollprobe (100 ± 5.8 %). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das TB einen Komplex mit dem HS auf den Fasern eingegangen ist und somit aus der umliegenden Lösung entfernt wurde, sodass eine geringere Intensität an Farbstoff gemessen wurde. Somit gibt die Messung einen Hinweis darauf, dass beide Faser-Typen erfolgreich mit dem Biomolekül unter Zuhilfenahme von EDC/NHS beschichtet wurden. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen liegen die erhaltenen Intensitätswerte der TB-Lösungen für die un- sowie amino-modifizierten Fasern im gleichen Bereich. Möglicherweise wurden somit auch vergleichbare Konzentrationen an HS angebunden. Dies kann mithilfe des lediglich qualitativ vorliegenden Tests jedoch nicht genau festgestellt werden.

⁷ Die Klammern in dieser Spalte dienen der Tatsache, dass es sich bei den Proben um Fasern sowohl mit als auch ohne HS handelt. Die genaue Zuordnung ist den rechten Spalten der Tabelle zu entnehmen.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der Proben ohne Nutzung der Kupplungsreagenzien einen anderen Trend. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen liegen die gemessenen Intensitäten der umgebenden TB-Lösungen, welche in Kontakt mit den HS-Fasern kamen, nicht unter denjenigen der Kontrollproben. Die Proben der unmodifizierten Fasern mit HS (114.4 ± 13.3) weisen sogar höhere TB-Extinktionsraten als ihre Kontrolle auf (100 ± 4.2). Dahingegen liegen die Intensitätswerte der Proben der amino-modifizierten Fasern mit HS (94.0 ± 21.9) unter Berücksichtigung der Standardabweichung im gleichen Bereich wie ihre Kontrolle (100 ± 12.9). Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Anbindung des Heparansulfafts an die Polymerfasern ohne EDC/NHS nicht erfolgreich war. Die Kupplungsreagenzien sind nach den vorliegenden Resultaten somit maßgeblich für die Dekoration der Fasern mit HS verantwortlich. Möglichweise konnten in den Versuchen ohne EDC/NHS auch nur sehr geringe, mit diesem Verfahren nicht messbare Mengen des Biomoleküls immobilisiert werden. Mithilfe des vorliegenden, qualitativen TB-Tests kann darüber jedoch keine genaue Aussage getroffen werden. Hierfür benötigt es eine quantitative Ausführung des Tests, welche schon von TEBBE *et al.*^[413] durchgeführt wurde und auf die beschichteten Fasern in Zukunft angepasst werden kann.

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, ob und wie viel HS an die zwei Faser-Typen mit bzw. ohne Kupplungsreagenzien angebunden wurde, war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, dieselben Inkubationsversuche mit fluoreszenzmarkiertem HS durchzuführen. Anschließend wurde der Gehalt an immobilisiertem HS indirekt über Fluoreszenzmessungen der Überstandslösungen bestimmt. Für die Versuche mit EDC/NHS war dies jedoch nicht möglich, da die Kupplungsreagenzien das Fluoreszenzsignal störten und die gemessenen Intensitäten stark verringerten. Unter Zuhilfenahme von EDC/NHS verringerte sich das Fluoreszenzsignal des detektierten HS ($c_{fl. HS} = 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) um mehr als die Hälfte (von $I_{fl. HS} = 53672$ a.u. auf $I_{fl. HS \text{ mit EDC/NHS}} = 2133.5$ a.u.). Im Gegensatz dazu war eine Bestimmung für die Versuche ohne Kupplungsreagenzien möglich. Sowohl für die un- als auch für die amino-modifizierten Fasern ergab sich jedoch, dass kein HS angebunden werden konnte bzw. die Mengen an angelagertem HS zu gering waren, um detektiert zu werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus dem TB-Test liegt somit die Vermutung nahe, dass eine Anlagerung des Wirkstoffes ohne Kupplungsreagenzien nicht bzw. nur unzureichend möglich ist. Unterstützend hierzu sind die erhaltenen Oberflächenladungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern zu betrachten (siehe Abbildung 38 und Abbildung 45). Beide Faser-Typen weisen im untersuchten pH-Bereich bis 4.5 ein negatives Zetapotential auf. Auch die Inkubationen in MES (pH = 4) bzw. Wasser (pH = 5) fanden im leicht sauren Milieu statt. Folglich kann vermutet werden, dass HS als negativ geladenes, saures Polyanion^[88] eher elektrostatisch von der

Oberfläche abgestoßen wird und die Kupplungsreagenzien somit nötig wären, um eine Anbindung des Biomoleküls zu generieren. Aufgrund dessen werden im Folgenden lediglich die Fasern weiter untersucht, die unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet werden.

Zetapotentialmessungen

Um die Oberflächeneigenschaften dieser Fasern zu charakterisieren sowie eine weitere Nachweismethode für die Anbindung des Biomoleküls an die Fasern einzuführen, wurden Zetapotentialmessungen durchgeführt. Abbildung 45 stellt die erhaltenen Ergebnisse mit HS im Vergleich mit den Zetapotentialmessungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern ohne HS dar, wie sie schon in Kapitel 4.1.1 diskutiert wurden. Auch hier wurde die Oberflächenladung im physiologischen pH-Bereich vermessen, um Aussagen über die Eigenschaften der Faseroberfläche in Bezug auf die spätere Anwendung im Innenohr zu erhalten.

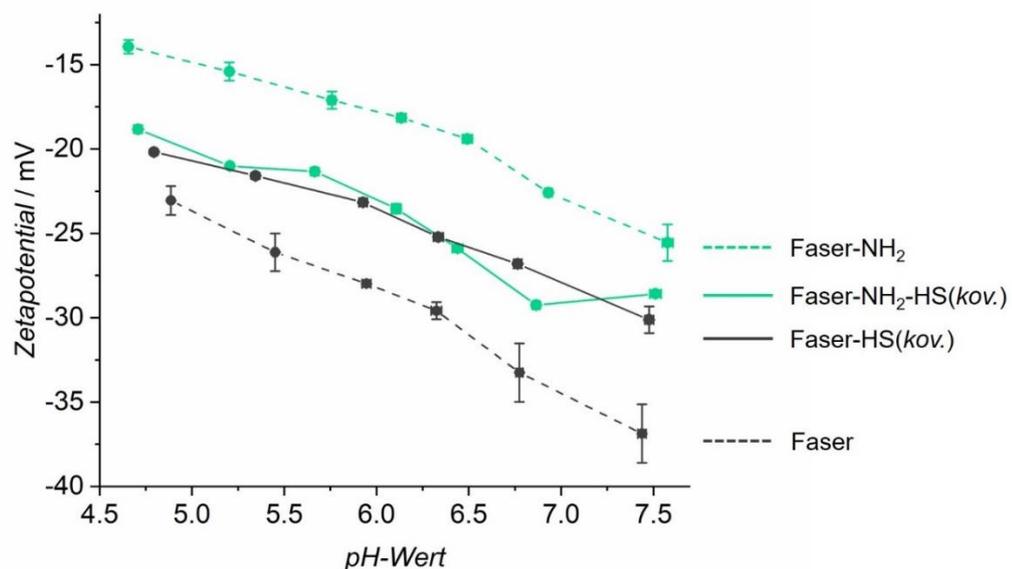


Abbildung 45: Graphische Darstellung des Zetapotentials der unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten (grün) Polymerfasern im physiologischen pH-Bereich. Die Ergebnisse der Proben mit HS sind mithilfe durchgezogener Linien dargestellt, wohingegen die Ergebnisse der Proben ohne HS anhand von gestrichelten Linien veranschaulicht werden. Sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern mit HS weisen ein sehr ähnliches Zetapotential im vorliegenden pH-Bereich auf.

Die Zetapotential-Titrationskurven der mit HS-dekorierten un- sowie amino-modifizierten Fasern liefern weitere Hinweise auf eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften nach der Reaktion mit HS. Beide Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Unabhängig vom ursprünglichen Fasertyp weisen beide Materialien Zetapotentiale im Bereich von etwa -20 mV bis etwa -30 mV auf ($4.5 < \text{pH} < 7.5$). Dieser Befund kann durch die Annahme erklärt werden, dass die Oberflächenchemie beider Materialien im Wesentlichen von derselben Substanz, nämlich HS, bestimmt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten des TB-Tests überein. Auch hier wurde für beide Fasertypen ein ähnliches Ergebnis erzielt. HS ist ein lineares Polysaccharid, welches saure Carboxy- und Sulfatgruppen trägt.^[88] Daher trägt HS in dem hier

vorliegenden physiologischen pH-Bereich stets eine negative Ladung. Studien konnten feststellen, dass diese negative Ladung für die Ferninteraktion mit verschiedenen Proteinen verantwortlich ist. Diese wurden über geladene Lysin- bzw. Arginin-Reste in den Proteinen vom HS angezogen.^[88,430] Das Zetapotential des freien HS in PBS-Lösung liegt bei $-10\text{ mV}^{[186]}$ und somit über dem Wert des oberflächengebundenen HS. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die tatsächliche Ladung von polyelektrolytischen Polymeren von der Konformation ihrer Polymerstränge abhängt. Insgesamt bestätigt die pH-Wert abhängige Zetapotentialtitration die Anbindung von HS an beide Fasertypen und weist darauf hin, dass ihre Oberflächenchemie hauptsächlich durch HS bestimmt wird.

Nachweis des angebondenen HS mithilfe der Adsorption von Nanopartikeln

Um die Oberfläche der (beladenen) Polymerfasern weiter zu untersuchen sowie zusätzliche Hinweise dafür zu finden, dass die Anbindung des HS erfolgreich verlaufen ist, wurden Anlagerungsversuche mit verschiedenen Sorten an Nanopartikeln durchgeführt. Dazu wurden sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern nach der Behandlung mit HS sowie ihre Kontrollproben über Nacht in einer wässrigen Nanopartikeldispersion ($c = 1\text{ mg mL}^{-1}$) inkubiert. Die nicht adsorbierten Nanopartikel wurden anschließend mit Wasser abgewaschen. Dazu fand eine Inkubation der Fasern für 3 s in 1 mL reinem Wasser statt. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurden auch hier lediglich Fasern genutzt, welche unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden. Bei den verwendeten Nanopartikeln handelte es sich um vier verschiedene Sorten, welche in Wasser bei $\text{pH} = 4.8$ (bzw. $\text{pH} = 4.0$ für PSLBs- OSO_3^-) sowohl ein positives ζ -Potential (PSLBs- NH_2 : $\approx +55\text{ mV}$, NPSNPs- NH_2 : $\approx +30\text{ mV}$) als auch ein negatives ζ -Potential (PSLBs- OSO_3^- : $\approx -40\text{ mV}$, NPSNPs: $\approx -10\text{ mV}$) aufweisen. Die genauen Zetapotential-Titrationskurven der vier Nanopartikel-Sorten sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abbildung 81). Kommerziell erworben wurden die PSLBs, welche einen Durchmesser von 100 nm und einerseits Aminogruppen (NH_2) sowie andererseits Sulfatgruppen auf ihrer Oberfläche (OSO_3^-) aufweisen. Währenddessen stellte Dr. KAREN BES-ECKE im eigenen Arbeitskreis die zwei Sorten der NPSNPs mit einem Durchmesser von 50 nm her.^[399,431] Die unmodifizierten Partikel zeigen an der Oberfläche Silanolgruppen (Si-OH). Diese sind im Falle der amino-modifizierten Partikel mit 3-Aminopropylmethoxysilan modifiziert, sodass ein Aminopropyl-Rest auf der Oberfläche generiert wird. Aufgrund der verschiedenen Oberflächeneigenschaften der Faser-Sorten war nun zu erwarten, dass sich die unterschiedlichen Nanopartikel stärker bzw. weniger stark an die Fasern anlagerten. Dabei wurde ein großer Fokus auf die elektrostatischen Wechselwirkungen gelegt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen visualisierten die erhaltenen Ergebnisse. Zunächst werden nun die Resultate der unmodifizierten Fasern mit/ohne HS vorgestellt, welche mit den un- sowie amino-modifizierten NPSNPs behandelt wurden (siehe Abbildung 46).

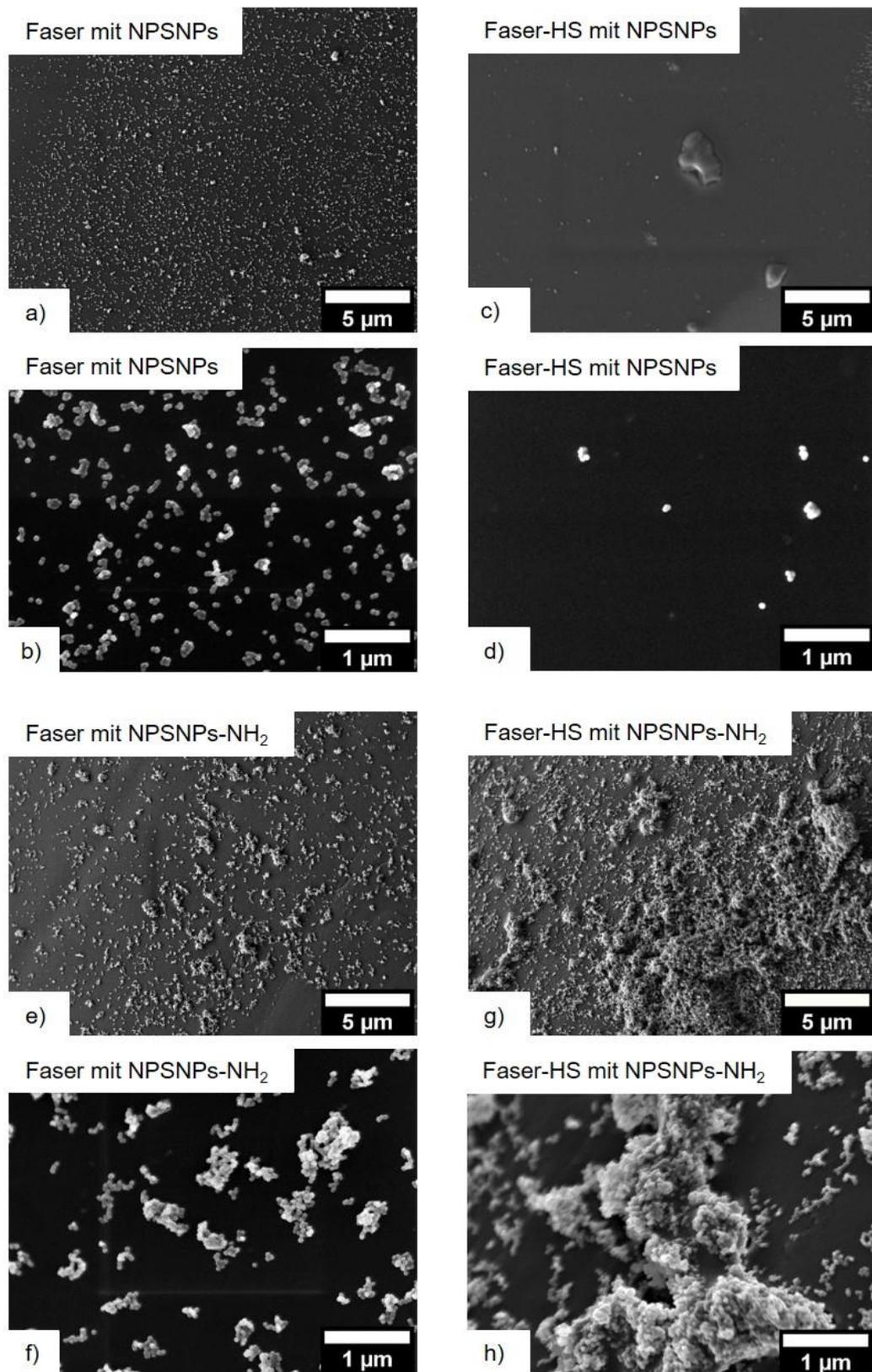


Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unmodifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS und Anlagerung verschiedener NPSNPs sowie deren Kontrollen in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die unmodifizierten Fasern hin.

Es ist zu erkennen, dass auf den unmodifizierten Kontroll-Fasern (a,b) eine weitaus größere Menge an unmodifizierten NPSNPs adsorbierte als auf den unmodifizierten Fasern, welche mit HS behandelt wurden (c,d). Als Grund hierfür wird die elektrostatische Abstoßung zwischen den NPSNPs mit einer negativen Oberflächenladung und dem sauren, polyanionischen HS gesehen.^[88] HS weist viele deprotonierbare, saure Sulfatgruppen sowie Carbonsäuregruppen auf.^[88] Die unmodifizierten Polymerfasern besitzen jedoch lediglich Estergruppen, welche sich zu Carbonsäuren bzw. in deprotonierter Form zu Carboxylgruppen aufgespalten haben können. Die Säurestärke dieser Gruppen liegt allerdings unter derjenigen der Sulfatgruppen im HS. So weisen Sulfatgruppen einen pKs-Wert von -3 (sehr starke Säure) auf, wohingegen derjenige von endständigen Carbonsäuren bei $4,75$ liegt (mittelstarke Säure).^[432] Somit zeigen die REM-Aufnahmen den stark sauren Charakter des HS, der zur stärkeren Abstoßung der NPSNPs führt. Nichtsdestotrotz stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den ZP-Titrationskurven, bei denen die unmodifizierten Kontrollfasern eine stärker negative Oberflächenladung aufzeigen als die unmodifizierten Fasern mit HS. Ein Grund für die Abweichung kann mithilfe der Messmethode erklärt werden. Die Fasern werden während der Zetapotential-Messung mit einer Elektrolytlösung überströmt, sodass sich ein zu detektierendes Potential ausbildet. Dadurch wird jedoch lediglich die makroskopische Gesamt-Oberflächenladung der Fasern abgebildet (Summe der Ladungen). Im Falle der mit HS beschichteten Fasern ist diese von der Lage der Polymerstränge des angebundenen Biomoleküls abhängig. Dahingegen sind die NPSNPs mit ihrer geringen Größe in der Lage, direkte sterische Wechselwirkungen mit den Oberflächengruppen einzugehen, sodass sie von den stärker negativen Ladungen im HS abgestoßen werden. Die Anlagerung der Partikel an die unmodifizierten Fasern ohne HS kann möglicherweise durch Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt worden sein. Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine erfolgreiche Anbindung von HS an die unmodifizierten Polymerfasern hin. Die Resultate der Proben, welche mit den amino-modifizierten NPSNPs behandelt wurden, lassen auf eine ähnliche Erkenntnis schließen. Die REM-Aufnahmen visualisieren, dass sich an die unmodifizierten Fasern mit HS (g,h) mehr Partikel mit einem positiven ZP anlagerten als an die Kontrollproben (e,f). In Anlehnung an die vorangegangene Diskussion lässt sich dies auf die elektrostatische Anziehung zwischen dem sauren, polyanionischen HS und den NH_2 -Nanopartikeln mit einer positiven Oberflächenladung zurückführen. Die Adsorption von einigen Partikeln an die Kontrollfasern kann durch die ebenfalls vorliegende negative Oberflächenladung erklärt werden. Aufgrund der geringeren Säurestärke der Carbonsäuregruppen auf den Fasern liegt hier jedoch eine geringere Ladungsdichte und somit eine geringere Menge an Partikeln vor. Für beide Fasertypen sind weiterhin Wasserstoffbrückenbindungen durch die Aminogruppen sowie hydrophobe WW zwischen der Propylkette der aminopropyl-funktionalisierten NPs und den unpolaren Einheiten auf der Faseroberfläche

denkbar. Aufgrund dieser Wechselwirkungen können die amino-modifizierten NPSNPs zudem miteinander Agglomerate bilden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen unter Verwendung der unmodifizierten NPSNPs auf den zuletzt diskutierten Aufnahmen zu sehen ist. Auch in vorangegangenen Arbeiten war die Bildung von Agglomeraten der NH_2 -NPSNPs schon zu beobachten.^[165,433] Es ist zu erkennen, dass auf der Faser, welche zuvor mit HS behandelt wurde, stärkere Agglomerate der NH_2 -NPSNPs vorliegen als auf der Kontrollfaser. Die Fläche der Faser ist nicht gleichmäßig, sondern unterschiedlich stark mit den Nanopartikeln bedeckt. Möglicherweise zeigen sie auf, an welchen Stellen auf der Faseroberfläche HS erfolgreich aufgebracht wurde. Insgesamt weisen auch diese Aufnahmen auf die erfolgreiche Immobilisierung des HS an die unmodifizierten Polymerfasern hin.

Des Weiteren wurde mit der vorliegenden Methode untersucht, inwieweit sich die amino-modifizierten Fasern mit HS beschichten lassen. Die REM-Aufnahmen der Proben nach der Behandlung mit den un- sowie amino-funktionalisierten NPSNPs sind in Abbildung 47 dargestellt.

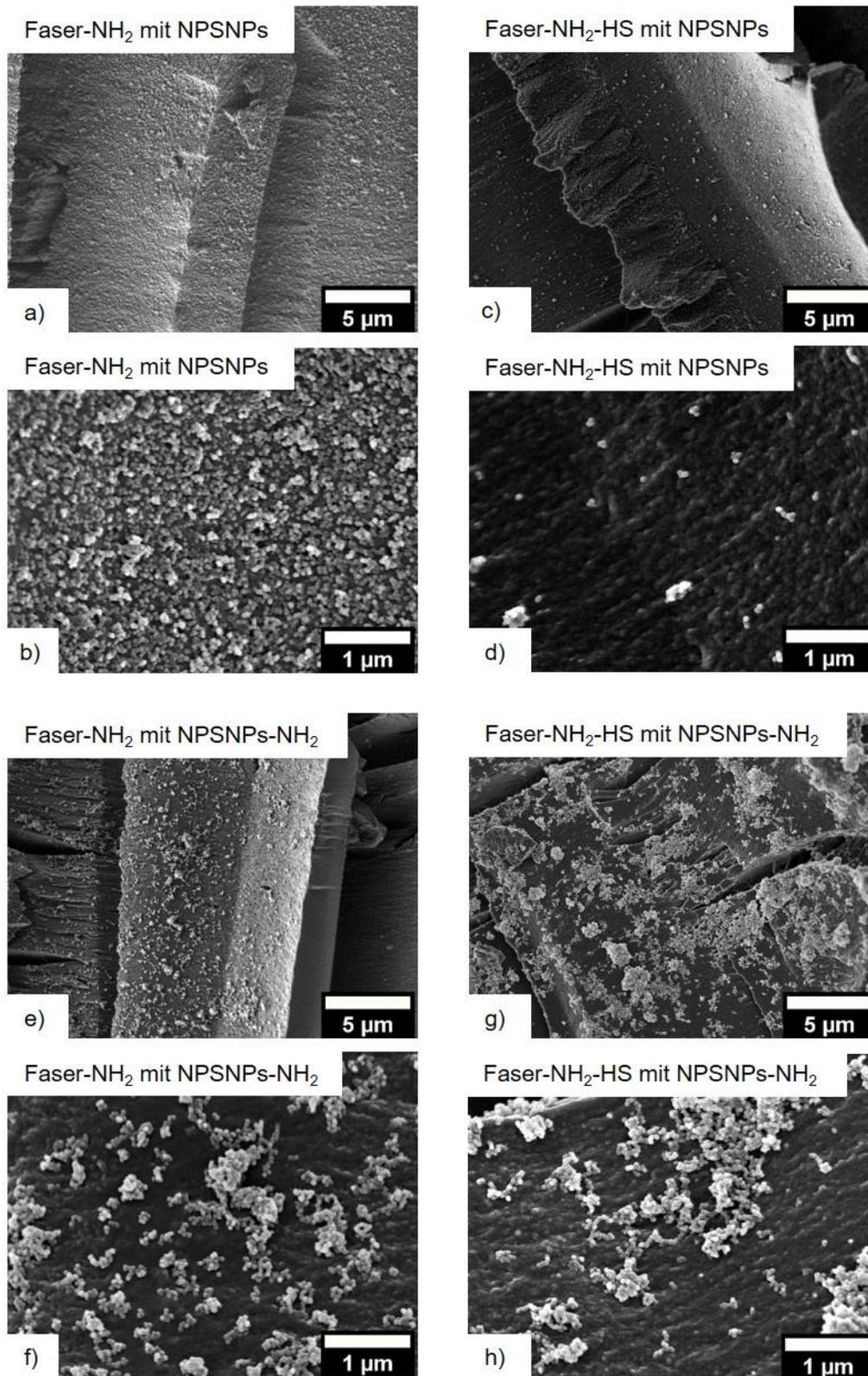


Abbildung 47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der amino-modifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS und Anlagerung verschiedener NPSNPs sowie deren Kontrollen in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die amino-modifizierten Fasern hin.

Es ist zu erkennen, dass an die Kontrollfasern (a,b) weitaus mehr unmodifizierte NPSNPs adsorbierten als an die Fasern mit HS (c,d). Hier liegen lediglich vereinzelt Nanopartikel vor. Begründet werden kann diese Beobachtung mit der elektrostatischen Abstoßung der NPs mit einer negativen Oberflächenladung von der Faseroberfläche mit dem sauren, polyanionischen HS. Die Kontrollfasern weisen basische, protonierbare Aminogruppen auf ihrer Oberfläche auf, die zu einer zusätzlichen elektrostatischen Anziehung der unmodifizierten NPSNPs führen können. Dieses Ergebnis zeigt den gleichen Trend wie die erhaltenen ZP-Kurven. Diejenige der amino-modifizierten Fasern ohne HS weist ebenfalls eine weniger negative Oberflächenladung auf als diejenige der amino-modifizierten Fasern mit HS. Nichtsdestotrotz weisen die Kontrollfasern laut Zetapotentialmessungen immer noch eine negative Gesamtladung auf der Oberfläche auf, was einer elektrostatischen Anziehung zu den NPSNPs entgegensprechen würde. Aber auch in diesem Fall bilden die ZP-Messungen lediglich die makroskopische Oberflächenladung bzw. Summe der Ladungen auf der Faser ab. Auch hier sind immer noch saure Gruppen der Ausgangsmaterialien vorhanden, welche die negative Gesamtladung auf der Oberfläche verantworten. Trotz dessen liegen basische Aminogruppen vor, welche nun im Falle der Nanopartikelversuche mit genau diesen in Wechselwirkung treten und eine Adsorption der Partikel nach sich ziehen. Somit deuten die erhaltenen Ergebnisse auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die amino-modifizierten Polymerfasern hin. Unterstützend hierzu wurden dieselben Versuche mit amino-modifizierten NPSNPs durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch ein weniger klares Ergebnis. Auf den REM-Bildern ist zu erkennen, dass sich an die amino-modifizierten Fasern mit HS (g,h) etwas mehr Partikel angelagert haben als an die Kontrollfasern ohne HS (e,f). Der Unterschied ist jedoch nur leicht erkennbar und vor allem auf den Aufnahmen mit einer geringeren Vergrößerung (e,g) zu beobachten. Als Grund für die stärkere Anlagerung der amino-modifizierten NPSNPs mit einem positiven ZP an die HS-Fasern ist die elektrostatische Anziehung zu dem sauren, polyanionischen Biomolekül zu nennen. Eine Adsorption der Partikel an die Kontrollfasern kann einerseits durch elektrostatische Anziehung zu den noch vorhandenen negativen Gruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern begründet werden (siehe negative ZP-Kurve). In beiden Fällen können jedoch andererseits noch weitere Wechselwirkungen die vorliegenden Ergebnisse beeinflussen. Es kann zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Amino-Propyl-Kette auf den NPs und den unpolaren Anteilen auf der Faseroberfläche gekommen sein. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH- sowie Aminogruppen auf der Faseroberfläche und den Aminogruppen auf den Partikeln können sich zudem ausgebildet haben. Wie zuvor beschrieben, liegen auch in diesen Versuchen Agglomerate der amino-modifizierten NPSNPs vor.^[165,433] Die Verteilung der NPs auf den mit HS behandelten Fasern ist jedoch ungleichmäßiger als auf den Kontrollfasern und es sind auch stärkere Agglomerate zu erkennen. Möglich-

erweise werden auch hier wieder die Bereiche auf der Faser durch die adsorbierten NPs sichtbar gemacht, die mit dem polyanionischen Biomolekül beschichtet wurden. Insgesamt unterstützen die Aufnahmen jedoch die Ergebnisse der Versuche mit den unmodifizierten NPs, so dass von einer erfolgreichen Anbindung des HS an die amino-modifizierten Polymerfasern ausgegangen werden kann.

Für eine bessere Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die vorangegangenen Inkubationsversuche der Fasern in einer NPs-Dispersion ebenfalls mit kommerziell erhältlichen Partikeln durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche mit den unmodifizierten Fasern mit/ohne HS, welche anschließend mit sulfat- sowie amino-modifizierten PSLBs behandelt wurden, sind in Abbildung 48 illustriert.

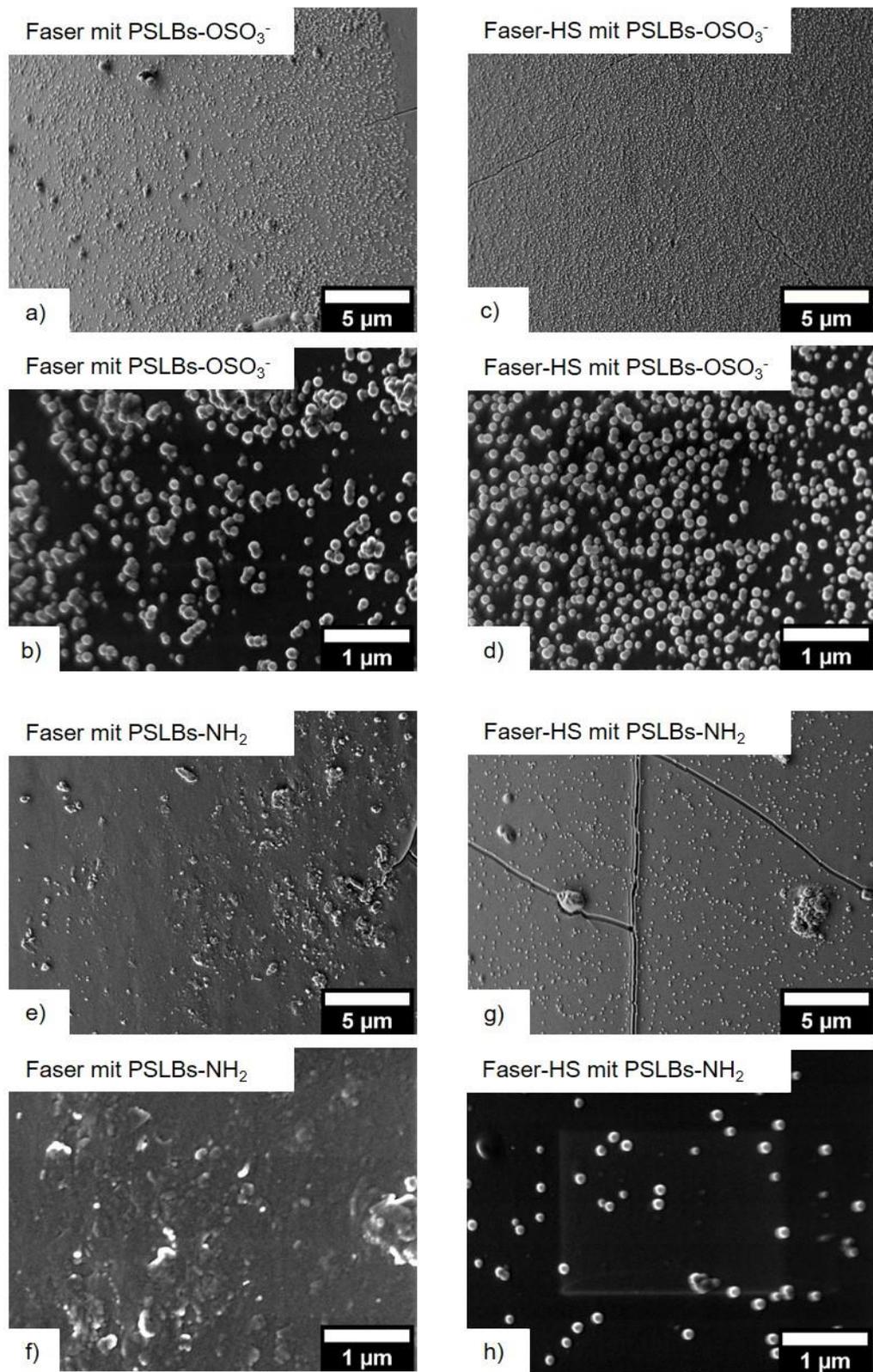


Abbildung 48: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unmodifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS und Anlagerung verschiedener PSLBs sowie deren Kontrollen in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die unmodifizierten Fasern hin.

Es ist zu erkennen, dass sowohl an die unmodifizierten Fasern mit HS (c,d) als auch an die Kontrollfasern ohne HS (a,b) viele sulfat-modifizierte Partikel angelagert werden konnten. Erstere sind jedoch etwas stärker mit den PSLBs bedeckt. Zunächst einmal deutet der zu beobachtende Unterschied auf eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften hin. Somit kann eine erfolgreiche Anbindung des HS vermutet werden. Die Ergebnisse entsprechen jedoch nicht den Erwartungen, dass die Partikel mit einem sehr negativen ZP von den unmodifizierten Fasern mit einer ebenfalls negativen Oberflächenladung bzw. von dem sauren, polyanionischen HS abgestoßen werden. Dies kann auf verschiedene Polymer-Polymer-Interaktionen zurückzuführen sein. Es handelt sich sowohl bei HS als auch bei den Nanopartikeln um Polymere mit einer geladenen Oberfläche, welche komplexe Eigenschaften aufweisen und dementsprechend komplexe Wechselwirkungen untereinander ausbilden können.^[434] Des Weiteren bestehen die Fasern selbst aus Polymeren und weisen geladene Bereiche auf der Oberfläche (Carboxyl-, Hydroxylgruppen) auf. Das Verhalten des HS ist abhängig von seiner Kettenfaltung, welche durch seinen Charakter als geladenes Polymer nicht stabil ist.^[88] Insgesamt weisen geladene Polymere keine Strukturstabilität auf. Zudem können hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Styrol-Partikeln sowie den hydrophoben Einheiten auf den Fasern entstehen. Aufgrund dieser Einflüsse kann anhand der vorliegenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine erfolgreiche Anbindung des HS an die unmodifizierten Fasern lediglich vermutet werden. Eine genaue Aussage kann jedoch nicht getroffen werden. Die Aufnahmen der Fasern, welche mit den amino-modifizierten PSLBs behandelt wurden, sind ebenfalls dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich mehr Partikel an die Fasern mit HS (g,h) angelagert haben als an die Kontrollfasern (e,f). Die REM-Bilder dieser Fasern zeigen keine vorhandenen PSLBs, sondern lediglich Polymerreste auf ihrer Oberfläche. Begründet werden kann dies mit der stärkeren elektrostatischen Anziehung zwischen den positiv geladenen Partikeln und dem sauren, polyanionischen HS auf der Polymerfaseroberfläche. Somit weist die zweite Messung auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die unmodifizierten Polymerfasern hin und unterstützt damit die bereits erhaltenen Ergebnisse aus den vorherigen Untersuchungen mit den NPSNPs. Es war jedoch zu erwarten, dass insgesamt mehr amino-modifizierte PSLBs (e-h) mit einem positiven Zetapotential an die Fasern mit einer negativen Oberflächenladung adsorbierten als die sulfat-modifizierten Partikel (a-d) mit einem ebenfalls negativen Zetapotential. Dies kann, wie zuvor diskutiert, auf den geladenen, polymeren Charakter der Partikel sowie der Faseroberfläche bzw. des HS zurückgeführt werden.

Weiterhin sind in Abbildung 49 die REM-Aufnahmen der amino-modifizierten Fasern mit bzw. ohne HS dargestellt, welche anschließend mit den verschiedenen modifizierten PSLBs behandelt wurden.

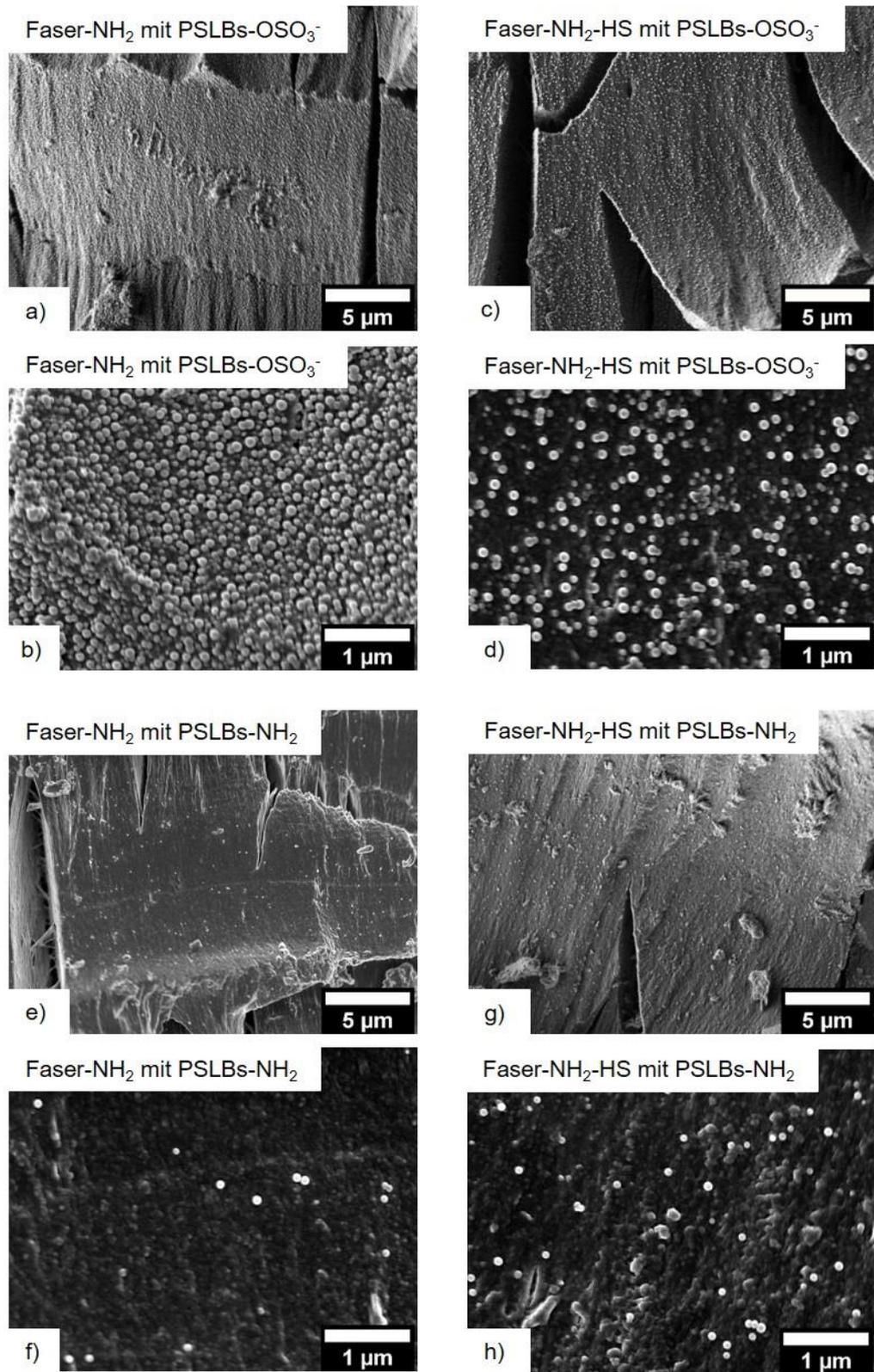


Abbildung 49: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der amino-modifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS und Anlagerung verschiedener PSLBs sowie deren Kontrollen in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten auf eine erfolgreiche Anbindung des HS an die amino-modifizierten Fasern hin.

Die Aufnahmen der Fasern, welche mit den sulfat-modifizierten PSLBs behandelt wurden, zeigen eine erhöhte Bedeckungsrate für die Kontrollfasern (a,b). Ein Grund für die geringere Menge an adsorbierten Partikeln an die amino-modifizierten Fasern mit HS (c,d) kann in der elektrostatischen Abstoßung der jeweils negativ geladenen Spezies liegen. Die Kontrollfasern üben durch ihre basischen, protonierbaren Aminogruppen eher eine elektrostatische Anziehung auf die PSLBs mit einer negativen Oberflächenladung aus, sodass es zu einer vermehrten Adsorption kommt. Somit unterstützen die vorliegenden Aufnahmen die zuvor erhaltenen Ergebnisse und weisen darauf hin, dass HS erfolgreich an die amino-modifizierten Polymerfasern aufgebracht werden konnte. Auch die Versuche unter Zuhilfenahme der amino-modifizierten PSLBs unterstützen diese Vermutung. Auf den Aufnahmen der Fasern mit HS (g,h) sind mehr Partikel zu erkennen als auf denjenigen der Kontrollfasern (e,f). Die PSLBs mit der positiven Oberflächenladung können somit von den sauren, negativ geladenen Gruppen des HS angezogen worden sein, wohingegen sie im Rahmen der Kontrollfasern von den basischen, protonierbaren Aminogruppen auf der Faseroberfläche abgestoßen worden sein können. Die erhaltenen Ergebnisse können zudem durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen auf den Partikeln und den korrespondierenden Gruppen auf der Oberfläche der Fasern beeinflusst werden. Insgesamt unterstützen diese Resultate ebenfalls die These der erfolgreichen Anbindung von HS an die amino-modifizierten Fasern. Wie bereits diskutiert ist dabei jedoch zu beachten, dass die Testergebnisse aus Abbildung 49 ebenfalls durch den polymeren Charakter der Partikel (geladene Oberfläche) sowie der Faseroberfläche (mit geladenen Bereichen) bzw. des HS (geladen) beeinflusst werden. ^[434]

Insgesamt zeigen die Versuchen mit den NPSNPs ein eindeutigeres Ergebnis als diejenigen, welche mit den PSLBs durchgeführt wurden. Die Silica-Partikel erscheinen besser für den vorliegenden Nachweis geeignet zu sein, da sie im Gegensatz zu den Polymer-Partikeln einen anorganischen, strukturstabilen Charakter aufweisen.

Wechselwirkungen zwischen HS und der Faseroberfläche

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern erfolgreich unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden. Zwischen dem Biomolekül und der Faseroberfläche liegen eine Vielzahl an attraktiven Wechselwirkungen vor (siehe Abbildung 50).

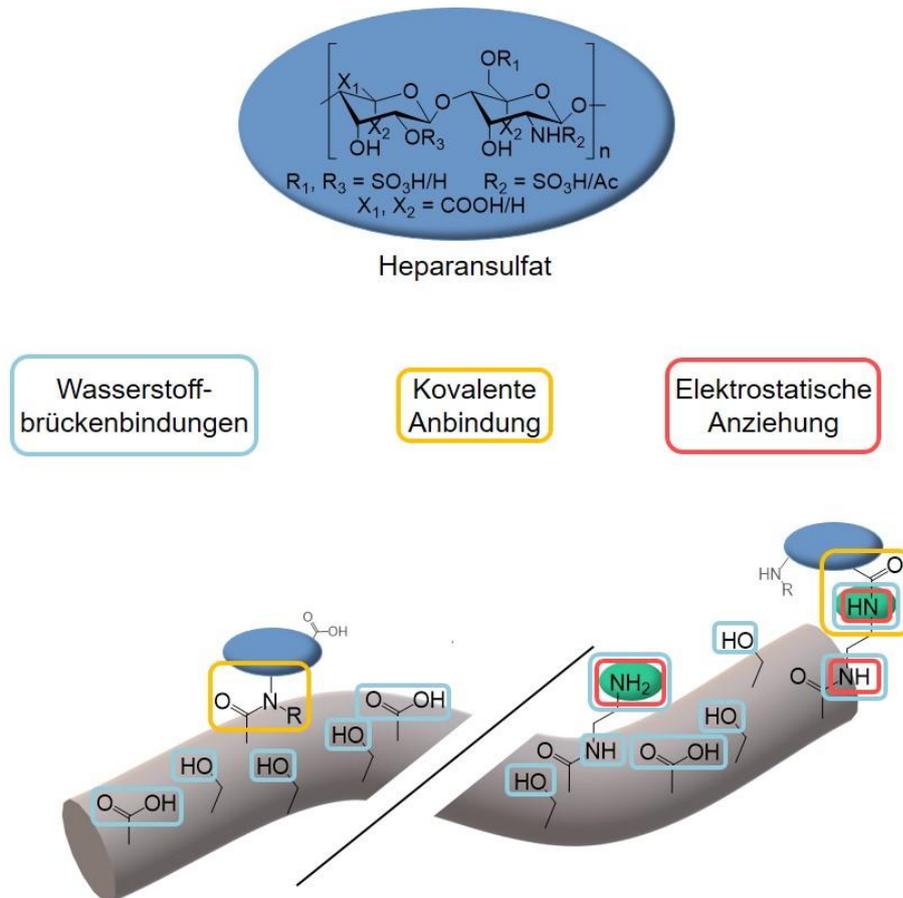


Abbildung 50: Schematische Darstellung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen HS (vgl. Abbildung 10)^[88] und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (links) sowie amino-modifizierten (rechts) Polymerfasern.

Wird die Anbindung des HS an die unmodifizierten Fasern betrachtet, so können die auf der Faseroberfläche generierten Carboxylgruppen durch die Kupplungsreagenzien zunächst aktiviert werden, um anschließend mit den Aminogruppen des HS zu reagieren. Stabile Amidbindungen resultieren sodann in einer kovalenten Anbindung von HS an die Fasern.^[379–383] Zusätzlich können sowohl Carboxyl- als auch Hydroxylgruppen auf den Fasern über Wasserstoffbrückenbindungen mit den dazugehörigen Gruppen des HS interagieren. Bei den amino-modifizierten Fasern können die Aminogruppen und möglicherweise auch restliche Carboxylgruppen auf der Faseroberfläche durch das EDC/NHS-System aktiviert werden.^[379] Somit können stabile Amidbindungen entweder zwischen den endständigen Aminogruppen auf der Faseroberfläche und den Säuregruppen im HS oder aber zwischen den restlichen Carboxylgruppen auf den Fasern und den Aminogruppen des Biomoleküls entstehen. Zusätzlich kann das negativ geladene HS^[88] elektrostatisch mit den positiv geladenen Aminogruppen wechselwirken. Wie auch bei den unmodifizierten Fasern können auch hier eine Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen. Insgesamt scheint die Anzahl der Carboxyl- bzw. Aminogruppen des HS, welche an der kovalenten Bindung beteiligt sind, jedoch klein zu sein im Vergleich zu der Gesamtzahl der verfügbaren jeweiligen Gruppen. Die Zetapotential-Kurven der beiden Fasertypen zeigen im vorliegenden pH-Bereich ein sehr ähnliches Verhalten

und deuten damit auf eine vergleichbare Oberflächenchemie hin. Weiterhin geben auch die durchgeführten DLS-Messungen einen Hinweis auf die Anbindung des HS an die Fasern. Die Inkubationsversuche wurden in MES-Puffer mit einem pH-Wert von ≈ 4 durchgeführt, sodass den Messungen zufolge das HS während der Inkubation in seiner ungeladenen, aggregierten-Form vorliegt (siehe Abbildung 43). Möglicherweise ist mit den schwächer geladenen Molekülen eine dichtere Bedeckung der Faseroberfläche möglich. Nach SHIRATORI *et al.*^[435] können auf diese Weise Substrate flächendeckend mit Polymerfilmen beschichtet werden. Die kovalente Anbindung des HS an die Faseroberfläche durch EDC/NHS kann zur Folge haben, dass spezifische Bindungsstellen für weitere Immobilisierungen von Wirkstoffen oder aber Wechselwirkungen mit Zellen blockiert werden.^[86] Vorangegangene Studien bestätigten jedoch, dass auch bei einer kovalenten Anbindung von Glykosaminoglykanen genug funktionale Stellen im Molekül vorhanden sind, um den verschiedenen Anforderungen gerecht zu werden.^[89,90,101]

4.2.2 Stabilität des angebundenen Heparansulfats

Für die spätere Anwendung im Rahmen des CIs soll das HS fest auf der Oberfläche der Fasern anhaften, um den Neuriten dauerhaft eine extrazelluläre Matrix entlang der neuronalen Leitstruktur zur Elektrodenoberfläche hin zu bieten. Aufgrund dessen wurde sich in dem vorangegangenen Kapitel auf die kovalente Immobilisierung des Biomoleküls konzentriert. Anschließend wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob HS nach einiger Zeit von den Fasern freigesetzt wird oder ob es fest auf deren Oberfläche anhaftet.

Stabilität des angebundenen HS während weiterer Inkubationsschritte

Hierzu wurde zunächst untersucht, wie sich weitere Immobilisierungsschritte auf die Stabilität des anhaftenden Biomoleküls auswirkten. Für die Anwendung im CI sollen die mit HS beschichteten Fasern in einem nächsten Schritt mit dem für die SGNs wichtigen Wachstumsfaktor BDNF dekoriert werden. Es wurde in einem ersten Experiment untersucht, ob das Glykosaminoglykan während der anschließenden Inkubation der Fasern in einer BDNF Lösung bei 4 °C über Nacht von diesen freigesetzt wird. Aufgrund von Kostenersparnissen sowie der geringen Konzentration und damit Einflussmöglichkeit des BDNFs ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) erfolgten die Versuche lediglich in dem reinen Lösungsmittel PBS (+ 0.1 % BSA). Hierbei wurden Fasern, beschichtet mit dem fluoreszenzmarkiertem HS, verwendet. Die Menge an möglicherweise freigesetztem HS wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie aus den Inkubationslösungen ermittelt. Es konnte herausgefunden werden, dass sich sowohl von den un- als auch von den amino-modifizierten Fasern, welche zuvor unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden, kein HS während der simulierten BDNF-Inkubation löste. Somit deutet dies auf eine stabile Anbindung des Biomoleküls an die Fasern hin. Als Vergleich wurden Fasern

verwendet, welche ohne Kupplungsreagenzien mit dem HS behandelt wurden. Auch hier konnten keine detektierbaren Mengen des Biomoleküls in dem Überstand der Inkubationslösungen der beiden Fasertypen gefunden werden. Möglicherweise wurde unter diesen Konditionen kein HS freigesetzt, da es zuvor auch nicht erfolgreich angebunden werden konnte. Diese Vermutung lässt sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel, welche annehmen lassen, dass kein HS angelagert wurde, aufstellen.

Freisetzungsexperimente

Da die Fasern in der Anwendung im Innenohr einen langen Zeitraum der dortigen Lympheflüssigkeit ausgesetzt sind, wurde weiterhin untersucht, inwieweit das HS von den Fasern freigesetzt wird, wenn diese über einen längeren Zeitraum in einer körperähnlichen Flüssigkeit lagern. Die hier verwendeten Fasern wurden zuvor mit dem fluoreszenzmarkierten HS behandelt, da eine spätere spektroskopische Analyse folgte. Der Simulation der Bedingungen im menschlichen Körper diente PBS (+0.1 % BSA) mit einem konstanten pH-Wert von 7.4. Zudem wurde bei Körpertemperatur (37 °C) gearbeitet. Die Fasern lagerten für einen definierten Zeitraum in 1 mL PBS (+0.1 % BSA) ein. Anschließend wurde die Lösung entnommen, durch eine frische Lösung ersetzt und bis zur fluoreszenzspektroskopischen Analyse eingefroren. Die Untersuchungen fanden an verschiedenen Fasertypen statt. Zunächst erfolgten die Experimente mit den Fasern, welche unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden. Weiterhin wurden Fasern untersucht, welche ohne Kupplungsreagenzien mit dem Biomolekül in Berührung kamen. Zudem wurde getestet, inwieweit sich die (simulierte) BDNF-Anbindung auf den *Release* des HS auswirkte. Die jeweiligen Freisetzungsexperimente dauerten einen Zeitraum von 105 d an. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 graphisch dargestellt.

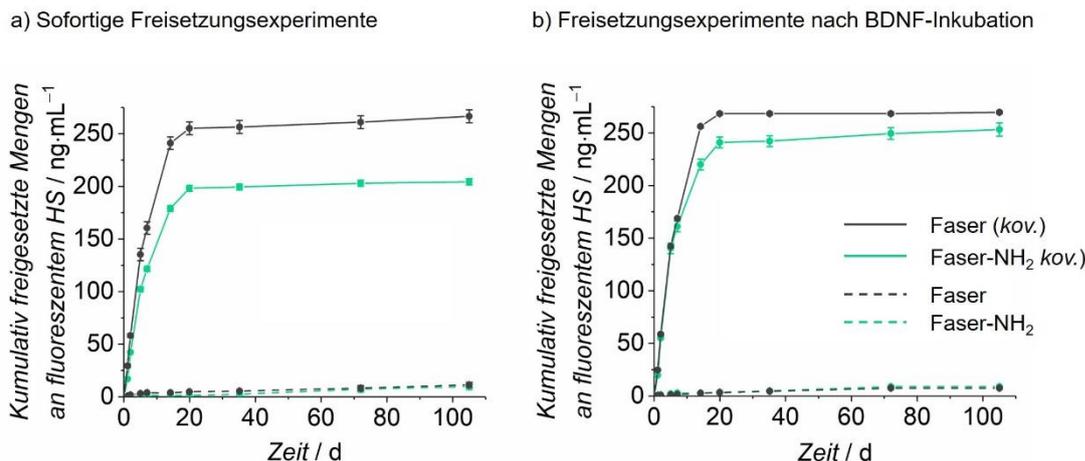


Abbildung 51: Graphische Darstellung der kumulativ freigesetzten Mengen an fluoreszentem HS über einen Zeitraum von 105 d in PBS (+ 0.1 % BSA). Es sind Freisetzungskurven der unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten Fasern (gün) gezeigt, welche zuvor unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden (Faser (kov.) / Faser-NH₂ (kov.)). Daneben sind Freisetzungskurven von unmodifizierten (grau, gestrichelt) sowie amino-modifizierten (grün, gestrichelt) Fasern dargestellt, welche ohne Kupplungsreagenzien mit HS behandelt wurden (Faser / Faser-NH₂). Weiterhin wird unterschieden zwischen Freisetzungen, die sofort nach der HS-Inkubation starteten (A) und denjenigen, die nach einem anschließenden, simulierten BDNF-Inkubationsschritt begonnen wurden (B). Von den Fasern, welche kovalent mit dem Biomolekül beschichtet werden sollten, wurde viel mehr HS freigesetzt als von den Fasern, welche ohne EDC/NHS mit HS behandelt wurden. Nachweisgrenze des fl. HS: 0.7 ng, Bestimmungsgrenze des fl. HS: 2.1 ng.⁸

Werden zunächst die Freisetzungskurven der Fasern, welche ohne EDC/NHS mit HS behandelt wurden, betrachtet, so ist festzustellen, dass kaum etwas von dem Biomolekül in das umgebende Lösungsmittel abgegeben wurde. Sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern zeigen dieses Ergebnis. Es ist zudem unabhängig davon, ob die Fasern vor dem *Release* einem simulierten BDNF-Inkubationsschritt unterzogen wurden. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse bestätigt sich hier die Vermutung, dass zuvor kaum HS an die Oberfläche der Fasern angebinden und damit auch nicht mehr abgegeben werden konnte. Die geringen Mengen an freigesetztem Biomolekül ($\approx 9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) lassen vermuten, dass zuvor lediglich ein kleiner Teil des HS adsorptiv an die Fasern angelagert wurde. Dies geschah möglicherweise durch Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Anziehung. Dieser Teil war jedoch zu gering, um mit den zuvor beschriebenen Methoden detektiert zu werden. Dagegen zeigen die Freisetzungskurven der Fasern, welche kovalent mit HS beschichtet werden sollten, ein anderes Ergebnis. Sowohl von den un- als auch von den amino-modifizierten Fasern wurde in den ersten 21 d in einem *burst Release* vergleichsweise viel HS freigesetzt, wobei in allen Fällen die Freisetzung im Anschluss stark abnahm und sich einem Plateau näherte.^[436] Hierbei konnte von den Fasern, welche einem zusätzlichen Inkubationsschritt unterzogen wurden (siehe Abbildung 51 b), insgesamt mehr HS freigesetzt werden als von den Fasern, mit welchen sofort nach der HS-Inkubation Freisetzungsexperimente durchgeführt

⁸ Die Bindung zwischen HS und dem Fluoresceinamin wird unter den gegebenen Bedingungen als stabil angesehen, da eine kovalente Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes an das Biomolekül erfolgte.^[460]

wurden (siehe Abbildung 51 a). In beiden Fällen wurde von den unmodifizierten Fasern (nach HS-Inkubation: $\approx 267 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, nach HS-Inkubation mit anschließendem Inkubationsschritt: $\approx 270 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) mehr HS freigesetzt als von den amino-modifizierten Fasern (nach HS-Inkubation: $\approx 204 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, nach HS-Inkubation mit anschließendem Inkubationsschritt: $\approx 253 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Zunächst einmal deutet die Menge an freigesetztem HS darauf hin, dass an beide Fasertypen zuvor erfolgreich HS angebinden werden konnte. Während der Inkubation standen $50 \mu\text{g}$ des Biomoleküls zur Anbindung an die Fasern zur Verfügung, sodass ein *Release* von ca. 250 ng vermuten lässt, dass anschließend immer noch HS auf den Fasern vorzufinden ist. Es ist denkbar, dass in den ersten 21 d nur schwach adsorbiertes HS abgegeben wurde, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Anziehung an den Fasern anhaftete. Das kovalent angebundene HS liegt anschließend weiter auf den Fasern vor und wird nicht mehr freigesetzt, wie es der Verlauf der *Release*-Kurven zeigt. Möglicherweise wurde in diesem Fall von den unmodifizierten Fasern mehr HS in das umgebende Lösungsmittel abgegeben, da es adsorptiv nicht so stark gebunden vorliegt. Es kann zu einer stärkeren Abstoßung zwischen dem sauren, negativ geladenen HS sowie der unmodifizierten Faser mit einer negativen Oberflächenladung (siehe Abbildung 45) gekommen sein. Die elektrostatische Abstoßung zwischen HS und den NH_2 -Fasern ist somit aufgrund der basischen Aminogruppen geringer, weswegen möglicherweise geringere Mengen des Biomoleküls von den Fasern abgegeben wurden. Ein Grund für die stärkere Abgabe von HS nach dem zusätzlichen Inkubationsschritt in PBS (+ 0.1 % BSA) kann in der teilweisen Auflösung der Faser liegen. Es handelt sich bei den verwendeten Polymerfasern um ein biodegradierbares Material,^[307] bei dem die Estergruppen auf der Oberfläche im wässrigen Milieu hydrolytisch gespalten werden,^[273,294,297] sodass sich die Fasern langsam auflösen. Auf den Abbau der Fasern wurde genauer in Kapitel 4.1.2 eingegangen. Somit ist es möglich, dass die Oberfläche der Fasern durch die zusätzliche Inkubation in PBS (+ 0.1 % BSA) schon etwas stärker angegriffen ist. Durch die weitere Lagerung der Fasern in den *Release*-Lösungen kann es somit zu einer etwas schnelleren Auflösung und damit Ablösung von Bestandteilen der Oberfläche der Fasern kommen. Damit kann anhaftendes HS in die umgebende Lösung mit abgegeben werden. Zu beobachten ist, dass der Unterschied an freigesetztem HS (mit / ohne zusätzlichem Inkubationsschritt) bei den amino-modifizierten Fasern größer ist als bei den unmodifizierten Fasern. Möglicherweise wurde die Oberflächenladung der NH_2 -Fasern während des zusätzlichen Schritts im wässrigen Medium herabgesetzt, da durch die hydrolytische Spaltung der Estergruppen auf der Oberfläche nicht nur zusätzliche negative Gruppen eingeführt wurden, sondern auch Diamin-Gruppen abgespalten und in das Lösungsmittel abgegeben werden konnten. Anhand vorheriger Messungen kann vermutet werden, dass sich basische Gruppen mit der Zeit von der Faser lösen (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 42). Durch die stärker negative Oberflächenladung war auch hier das

negativ geladene HS nicht mehr so stark adsorptiv gebunden und wurde eher freigesetzt. Insgesamt kann die Degradation der Fasern (siehe Kapitel 4.1.2) jedoch alle Freisetzen beeinflussen. Durch die Auflösung der Fasern kann eine generelle Freisetzung des Wirkstoffes begünstigt werden.

Langzeitstabilität des angebondenen Heparansulfats: Zetapotentialmessungen

Um zu überprüfen, ob nach 21 d fest angebondenes HS auf den Fasern vorzufinden ist und zuvor lediglich adsorptiv angebondenes HS freigesetzt wurde, war es möglich, weitere Untersuchungen durchzuführen. Zunächst dienten Zetapotentialmessungen der Charakterisierung der Faseroberfläche. Dazu wurden sowohl un- als auch aminomodifizierte Fasern genutzt, welche zuvor unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS behandelt und anschließend für 21 d einem *Release* bei 37 °C in PBS (+ 0.1 % BSA) unterzogen wurden. Als Vergleich fand zudem eine Untersuchung an un- sowie amino-modifizierte Fasern ohne HS statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 graphisch dargestellt.

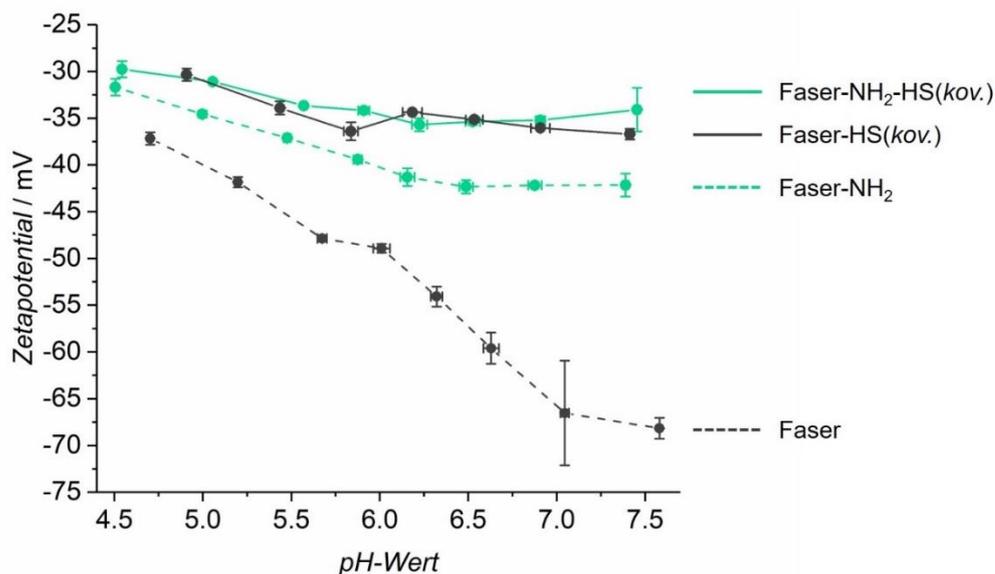


Abbildung 52: Graphische Darstellung des Zetapotentials der unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten (grün) Polymerfasern im physiologischen pH-Bereich nach 21 d *Release*. Die Ergebnisse der Proben mit HS sind mithilfe durchgezogener Linien dargestellt, wohingegen die Ergebnisse der Proben ohne HS anhand von gestrichelten Linien veranschaulicht werden. Sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern mit HS weisen ein sehr ähnliches Zetapotential im vorliegenden pH-Bereich auf.

Die vorliegenden ZP-Kurven zeigen nicht nur die Degradation der Polymerfasern nach 21 *Release*-Tagen, sondern weisen weiterhin darauf hin, dass die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der einzelnen Fasertypen bestehen bleiben. In Anlehnung an die Ergebnisse vor den Freisetzungsexperimenten (siehe Abbildung 45) unterscheiden sich die Kurven der un- sowie amino-modifizierten Fasern ohne HS in dem untersuchten pH-Bereich stark voneinander. Die unmodifizierten Fasern weisen ein negatives Zetapotential auf, welches von -40 mV bei einem pH-Wert von ≈ 5 auf -68 mV bei einem pH-Wert von ≈ 7.5 absinkt. Dies kann

wieder auf Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern zurückzuführen sein, welche durch die Spaltung der Estergruppen erzeugt wurden. Das Zetapotential der unmodifizierten Fasern nimmt nach dem *Release* Werte an, die sich als viel stärker negativ darstellen verglichen mit denjenigen vor den Freisetzungsexperimenten ($16 \text{ mV} < \Delta\zeta < 31 \text{ mV}$). Somit kann die Degradation der Fasern, welche eine größere Menge an sauren Carboxylgruppen auf der Oberfläche nach sich zieht, beobachtet werden.^[299,426] Im Gegensatz dazu liegt die Zetapotential-Titrationskurve der amino-modifizierten Fasern ohne HS nach 21 *Release*-Tagen in einem viel weniger negativen Bereich im Vergleich zu den unmodifizierten Fasern. Das Zetapotential sinkt von -35 mV bei einem pH-Wert von ≈ 5 auf -42 mV bei einem pH-Wert von ≈ 7.5 . Hier ist eine Erhaltung der basischen Aminogruppen auf der Faseroberfläche zu erkennen, welche protoniert werden können und somit ein stärker positives Zetapotential kreieren.^[59] Da die erhaltenen Werte negativer ausfallen als diejenigen der amino-modifizierten Fasern vor dem *Release* ($17 \text{ mV} < \Delta\zeta < 21 \text{ mV}$), ist auch in diesem Fall die Degradation der Fasern zu erkennen. Neben der Bildung von Carboxylgruppen aufgrund von Esterspaltungen auf der Oberfläche der Polymerfasern^[299,426] kann ebenfalls die Freisetzung von oberflächen-gebundenem Ethylendiamin mit berücksichtigt werden.

Werden die Zetapotential-Titrationskurven der mit HS beschichteten unmodifizierten sowie amino-modifizierten Fasern nach den Freisetzungsexperimenten betrachtet, so ist festzustellen, dass sich beide Kurven in ihrem Verlauf stark ähneln. Dieses Ergebnis stimmt mit demjenigen vor den *Release*-Versuchen überein. Im physiologischen pH-Bereich von 5 bis 7.5 besitzen die Fasern nach den Freisetzungen Zetapotential-Werte von -30 mV bis -35 mV . Hierdurch wird angezeigt, dass die Oberflächenchemie unabhängig vom ursprünglichen Fasertyp von derselben Substanz dominiert wird; in diesem Fall HS. Da das Glycosaminoglycan eine negative Oberflächenladung aufweist, die aus sauren Carboxyl- sowie Sulfatgruppen resultiert,^[88] entsprechen die erhaltenen Ergebnisse der Literatur. Ähnlich zu den Ergebnissen vor dem Freisetzungsexperiment zeigt auch in diesem Fall das oberflächengebundene HS ein viel negativeres Zetapotential als freies HS in PBS ($\approx -10 \text{ mV}$).^[186] Auch hier können unterschiedliche Konformationen der Polymerstränge des polyelektrolytischen HS der Grund für die unterschiedliche Nettoladung sein. Im Vergleich zu den Befunden aus den Zetapotential-Messungen der mit HS dekorierten Fasern vor den Freisetzungsexperimenten zeigen die Ergebnisse danach nur eine geringe Verschiebung zu negativeren Werten ($5 \text{ mV} < \Delta\zeta < 10 \text{ mV}$). Möglicherweise schützt HS die Fasern vor starkem Abbau entweder aus sterischen Gründen, da HS die Faseroberfläche vollständig bedeckt, oder aufgrund des sauren Charakters des Glycosaminoglykans.^[88,186] Im Gegensatz zur basischen Esterhydrolyse verläuft die saure Katalyse langsamer und reversibel. Erst in stark saurer Umgebung (ca. pH 1) werden die Ester stärker katalytisch gespalten.^[437] (Budweiser, 2015) Dies ist hier jedoch nicht der Fall nsge-

samt bestätigen die erhaltenen Ergebnisse die erfolgreiche Konservierung des an der Oberfläche der Polymerfasern anhaftenden HS nach 21 Tagen Freisetzung. Da Abbildung 51 zeigt, dass von diesem Moment an kein HS mehr von den Fasern freigesetzt wird, wird eine stabile, wahrscheinlich kovalente Bindung von HS an beide Fasertypen vermutet. In den ersten 21 Tagen wurden möglicherweise geringe Mengen an schwach adsorbiertem HS von den Fasern freigesetzt. Wie die Zetapotentialmessungen zeigen, ist danach genügend HS auf den Fasern vorhanden, um die Oberflächeneigenschaft zu dominieren.

Langzeitstabilität des angebondenen Heparansulfats: Adsorption von Nanopartikeln

Um dies mithilfe einer weiteren Methode zu untersuchen, wurden wiederum Anlagerungsversuche mit verschiedenen Sorten an Nanopartikeln durchgeführt. Dazu wurden die Fasern mit bzw. ohne HS einem *Release* von 21 Tagen unterzogen und anschließend nach dem zuvor beschriebenen Verfahren (siehe Kapitel 4.2.1) in Nanopartikel-Dispersionen inkubiert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sollten im Nachhinein visualisieren, in welchem Maße sich die Partikel an die unterschiedlichen Fasertypen angelagert haben. Durch die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikel-Sorten und den variierenden Faseroberflächen wurde nun darauf geschlossen, ob HS immer noch gebunden vorliegt. Dazu sind die REM-Aufnahmen der unmodifizierten Fasern mit bzw. ohne Biomolekül nach den Freisetzungsexperimenten, welche anschließend mit den un- bzw. amino-modifizierten NPS-NPs behandelt wurden, in Abbildung 53 heranzuziehen.

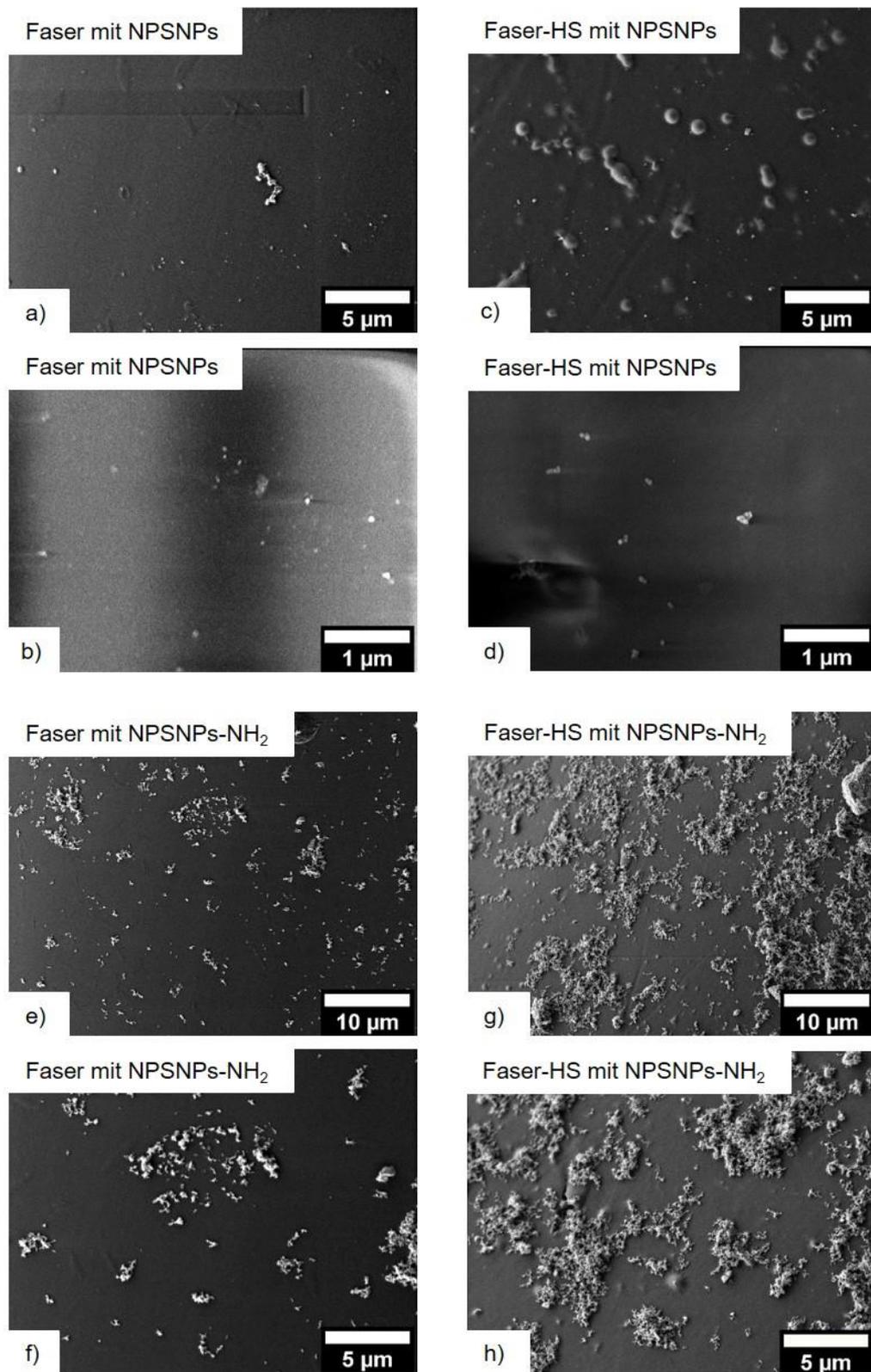


Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unmodifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS sowie deren Kontrollen, nachdem sie einem *Release* von 21 Tagen ausgesetzt und in verschiedenen NPSNPs-Dispersionen inkubiert wurden in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten sowohl auf die Degradation der Fasern nach dem *Release* sowie auf den Erhalt des HS auf der Oberfläche hin.

Die Aufnahmen der beiden unmodifizierten Fasersorten, welche mit den unmodifizierten NPSNPs behandelt wurden, zeigen eine große Ähnlichkeit (a-d). Es sind kaum Nanopartikel zu erkennen. Dahingegen sind einige Polymerreste auf der Oberfläche zu finden. Dies deutet auf eine negative Oberflächenladung beider Fasersorten hin, sodass eine elektrostatische Abstoßung zu den unmodifizierten NPSNPs mit einer ebenfalls negativen Oberflächenladung stattgefunden haben kann. Außerdem ähneln diese Aufnahmen denjenigen der unmodifizierten Fasern mit HS, welche mit den unmodifizierten NPSNPs behandelt wurden, vor den Freisetzungsexperimenten (siehe Abbildung 46 c,d). Daraus kann in diesem Fall für die Fasern mit HS vermutet werden, dass das Biomolekül immer noch präsent auf der Oberfläche zu finden und somit durch seinen sauren, polyanionischen Charakter^[88] für die elektrostatische Abstoßung zu den Partikeln verantwortlich gemacht werden kann. Auch die Zetapotentialmessungen nach dem *Release* deuten auf einen Erhalt des HS auf der Faseroberfläche hin. Eine genaue Aussage darüber kann jedoch mithilfe der vorliegenden REM-Aufnahmen nicht getroffen werden. Weiterhin ist an den ZP-Titrationskurven zu erkennen, dass die unmodifizierten Fasern ohne HS durch die Inkubation in den *Release*-Lösungen eine viel stärker negativ geladene Oberfläche aufweisen. Dies ist möglicherweise durch die Degradation der Fasern geschehen. Die so gespaltenen Estergruppen auf der Oberfläche erzeugen eine größere Menge an Carboxylgruppen. Durch Deprotonierung kann so die negative Ladungsdichte auf der Faseroberfläche erhöht werden, was zu einer stärkeren elektrostatischen Abstoßung zu den NPSNPs als vor den Freisetzungsexperimenten geführt haben könnte. Die erhaltenen REM-Aufnahmen (a,b) bestätigen dies. Trotz ähnlicher Erscheinung der Bilder deuten diese somit auf einen Erhalt des angebondenen HS auf den unmodifizierten Polymerfasern nach einem *Release* von 21 Tagen hin. Eine genaue Aussage darüber kann jedoch nicht getroffen werden. Die Aufnahmen der Fasern, welche mit den amino-modifizierten NPSNPs behandelt wurden, deuten auf einen Erhalt des angebondenen HS hin. Um den Anlagerungseffekt der Nanopartikel besser zu erkennen, wurden hier andere Vergrößerungen gewählt. Insgesamt ist auf allen Bildern (e-h) eine deutlich höhere Menge an angelagerten Partikeln zu erkennen, als es bei den unmodifizierten NPSNPs der Fall war. Ein Grund hierfür liegt in der elektrostatischen Anziehung zwischen den Fasern mit einer negativen Oberflächenladung und den Partikeln mit einem positiven Zetapotential. Weiterhin zeigen die Aufnahmen der Fasern, an welche zuvor HS angebonden wurde, mehr Nanopartikel sowie stärkere Agglomerate als die Aufnahmen der Kontrollfasern. Dies kann auf die stärkere elektrostatische Anziehung zwischen den amino-modifizierten Nanopartikeln sowie den stark sauren, polyanionischen HS zurückzuführen sein. Trotz einer erhöhten Ladungsdichte der Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten Polymerfasern im Gegensatz zu den Versuchen vor dem *Release* besitzen diese Gruppen eine geringere Säurestärke als die Sulfat-Gruppen im HS. Die amino-modifizierten NPSNPs kön-

nen mit ihrer geringen Größe durch direkte sterische Wechselwirkungen mit den Oberflächengruppen im HS von diesen angezogen werden. Die entgegengesetzt erhaltenen Ergebnisse der ZP-Titrationskurven sind möglicherweise wiederum auf die Messmethode zurückzuführen. Hier wird die Gesamtoberflächenladung durch das Überströmen der Fasern mit einer Elektrolytlösung erhalten. Dieses ist im Falle der mit HS beschichteten Fasern zudem von der Lage der Polymerstränge abhängig. Zusätzlich beeinflussen weitere Wechselwirkungen die Anhaftung der NH₂-NPSNPs. Hierzu gehören neben den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Propylketten der aminopropyl-modifizierten NPs und den unpolaren Einheiten auf den Faseroberflächen auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen der Partikel und den zugehörigen Gruppen auf den Polymerfasern. Während die Agglomerate der Partikel auf eine Wechselwirkung untereinander hindeuten, kann aus den größeren Ansammlungen der NH₂-NPs auf den Fasern mit HS vermutet werden, dass diese die Orte des immer noch angebondenen Biomoleküls visualisieren. Insgesamt unterstützen die erhaltenen Ergebnisse die aufgestellte Vermutung, dass das HS nach 21 Tagen Freisetzung auf den unmodifizierten Fasern erhalten bleibt.

Diese Untersuchungen wurden ebenfalls für die amino-modifizierten Fasern durchgeführt. Dazu sind die rasterelektronischen Aufnahmen der Fasern mit / ohne HS nach dem *Release* und der Inkubation in den unterschiedlichen NPSNPs-Dispersionen in Abbildung 54 zu sehen.

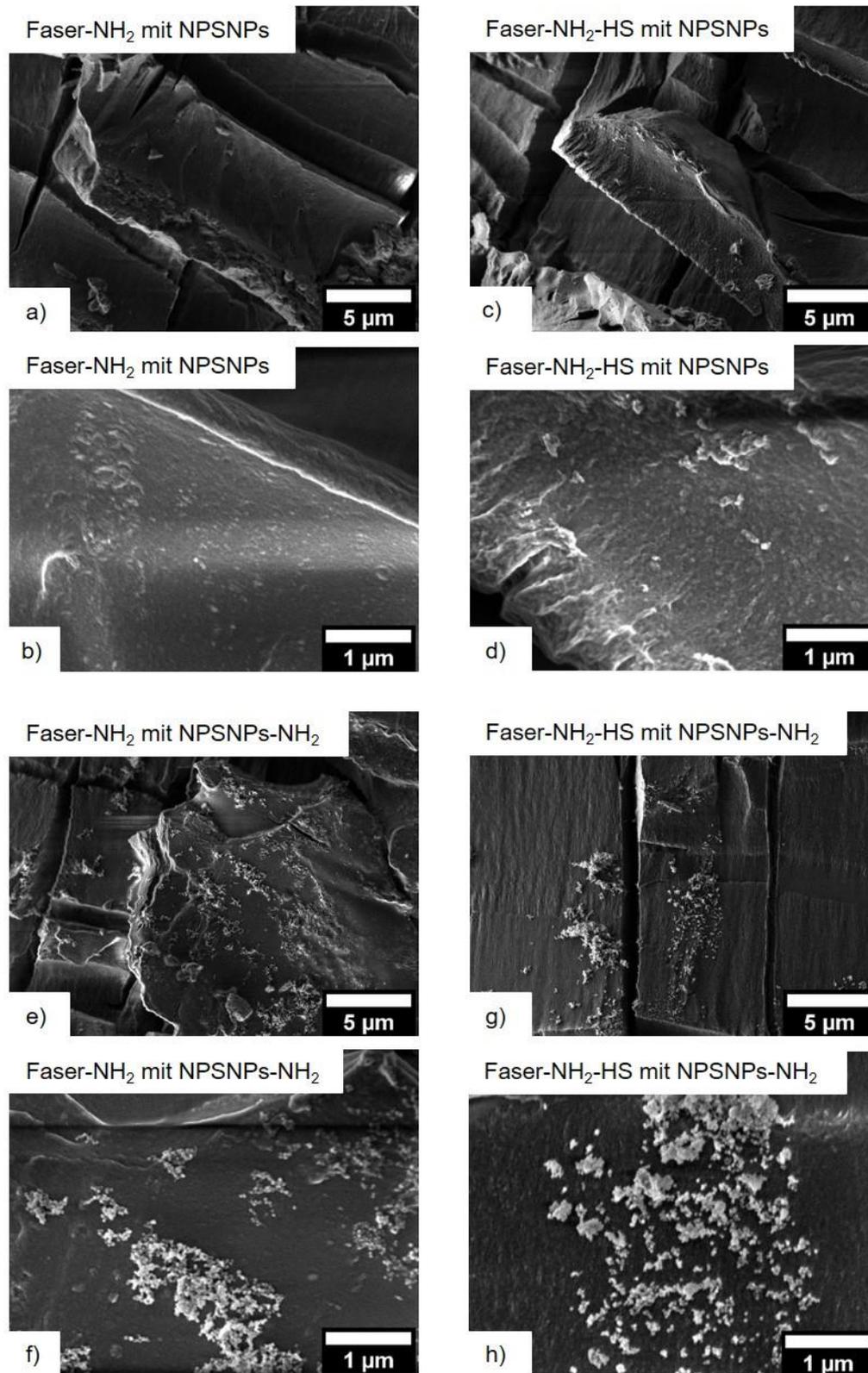


Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der amino-modifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS sowie deren Kontrollen, nachdem sie einem *Release* von 21 Tagen ausgesetzt und in verschiedenen NPSNPs-Dispersionen inkubiert wurden in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer NPSNPs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten auf die Degradation der Fasern nach dem *Release* hin.

Zunächst sind auf allen Aufnahmen der amino-modifizierten Fasern, welche mit den unmodifizierten NPSNPs behandelt wurden, keine angelagerten Partikel zu sehen. An die Kontrollfasern ohne HS adsorbierte vor den *Release*-Experimenten eine große Menge an Nanopartikeln aufgrund von elektrostatischer Anziehung. Wie den Zetapotential-Titrationskurven nach den Freisetzungen zu entnehmen ist, weisen die amino-modifizierten Fasern aufgrund von Degradation und der damit verbundenen Esterspaltungen sowie Abgabe der angebondenen Diamine nun eine viel negativere Oberflächenladung auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die unmodifizierten NPSNPs mit einer ebenfalls negativen Oberflächenladung von diesen Fasern abgestoßen werden. Die REM-Aufnahmen der Fasern mit HS zeigen sowohl vor- als auch nach den *Release*-Experimenten keine angelagerten Partikel. Möglicherweise ist auch nach den Experimenten immer noch saures, polyanionisches HS auf den Fasern vorhanden, welches für die Abstoßung der Partikel mit der negativen Oberflächenladung verantwortlich ist. Denn auch die Zetapotentialmessungen nach dem *Release* deuten auf einen Erhalt des HS auf der Faseroberfläche hin. Eine genaue Aussage kann mithilfe der vorliegenden REM-Bilder darüber jedoch nicht getroffen werden. Auf den Aufnahmen der Fasern, welche anschließend mit den amino-modifizierten Partikeln behandelt wurden, sind ungleichmäßig verteilte sowie agglomerierte Nanopartikel zu beobachten. Zwischen den Proben mit bzw. ohne HS ist hier kein Unterschied auszumachen. Möglicherweise konnte, so wie es auch die ZP-Titrationskurven zeigen, HS auf den amino-modifizierten Fasern erhalten werden. Dazu müssten eigentlich mehr NPs mit einem positiven ZP auf den Fasern mit dem sauren, polyanionischen HS zu finden sein als auf den Kontrollfasern mit den basischen Aminogruppen. So zeigen es auch die Aufnahmen vor dem *Release*. Ein Grund für die Gleichverteilung könnte in der nun negativer geladenen Oberfläche der Kontrollfasern liegen (siehe Abbildung 52), sodass beide Fasertypen eine Adsorption der NH_2 -NPs ermöglichen. Außerdem beeinflussen hier noch weitere Wechselwirkungen das Ergebnis. Hierzu zählen neben den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Propylketten der aminopropyl-modifizierten NPSNPs und den unpolaren Anteilen auf den Faseroberflächen auch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen auf den Partikeln und den zugehörigen Gruppen an der Oberfläche der Polymerfasern. Insgesamt kann mithilfe der vorliegenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ein Erhalt des HS auf den amino-modifizierten Fasern lediglich vermutet werden. Genaue Aussagen darüber können jedoch nicht getroffen werden.

In Anlehnung an die Versuche vor den Freisetzungsexperimenten wurden auch hier Anlagerungsversuche mit kommerziell erhältlichen PSLBs mit sowohl positivem als auch negativem Zetapotential durchgeführt, um eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten. Dazu sind in Abbildung 55 die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der unmodifizierten Fasern mit bzw. ohne HS zu sehen, welche für 21 Tage einem *Release*

unterzogen wurden und anschließend in eine PSLBs-OSO₃⁻- bzw. PSLBs-NH₂-Dispersion eingelegt wurden.

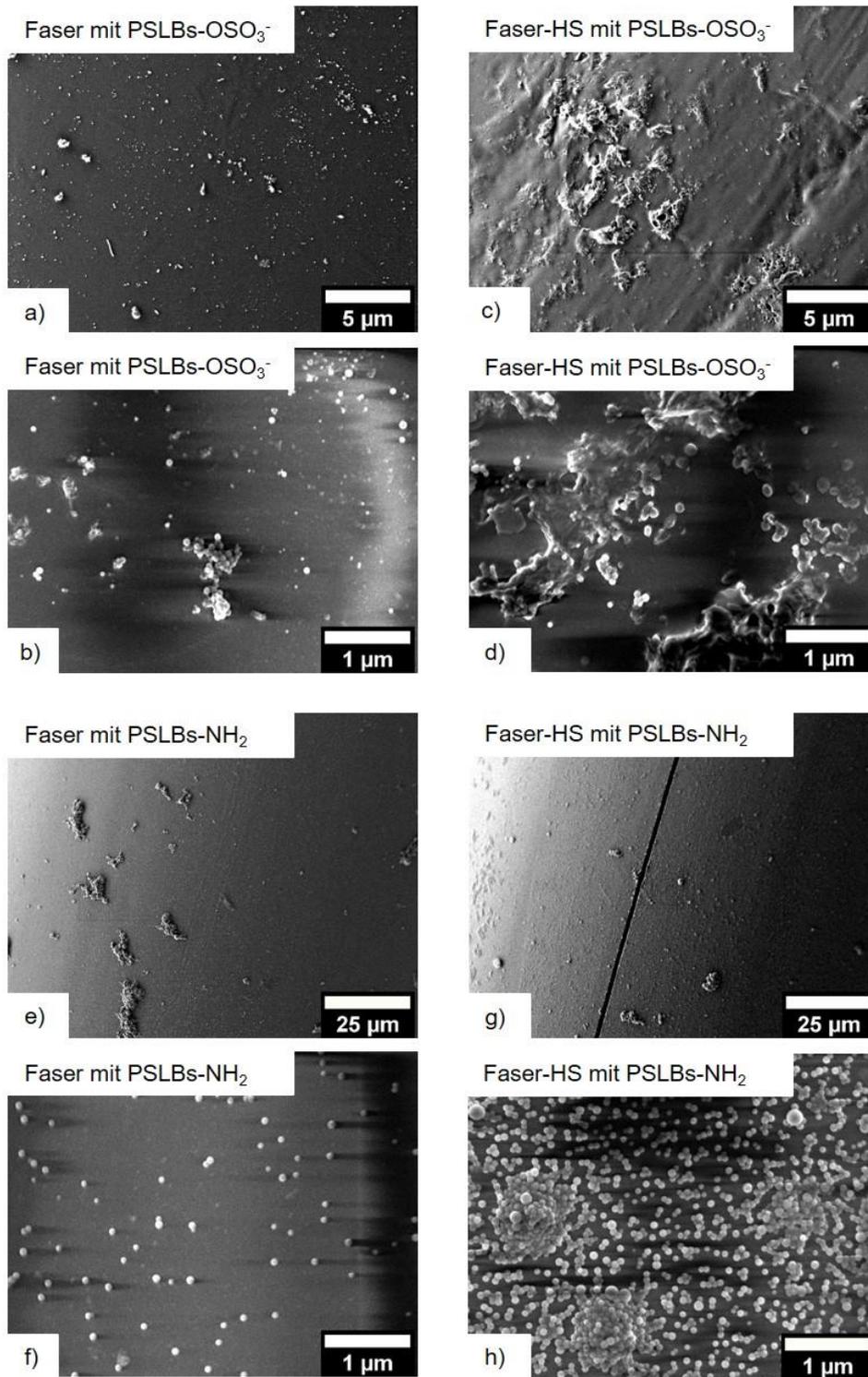


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unmodifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS sowie deren Kontrollen, nachdem sie einem *Release* von 21 Tagen ausgesetzt und in verschiedenen PSLBs-Dispersionen inkubiert wurden in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Unmodifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Unmodifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLB-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten sowohl auf die Degradation der Fasern nach dem *Release* als auch auf den Erhalt des angebondenen HS hin.

Die Aufnahmen aller Proben, welche mit den sulfat-modifizierten PSLBs behandelt wurden, zeigen lediglich wenig adsorbierte Partikel auf der Faseroberfläche (a-d). Auf den Fasern mit HS sind zusätzlich Polymerreste zu erkennen. Ansonsten kann kein Unterschied zwischen den Proben mit bzw. ohne HS ausgemacht werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen überein, welche bei der Anlagerung der unmodifizierten NPSNPs an diese Fasern erhalten wurden. Auch hier deutet dieses Ergebnis auf eine negative Oberflächenladung beider Fasersorten hin, sodass eine elektrostatische Abstoßung zu den sulfat-modifizierten PSLBs mit einer ebenfalls negativen Oberflächenladung stattgefunden haben kann. Daraus kann für die Fasern mit HS vermutet werden, dass das Biomolekül auf der Oberfläche der Fasern erhalten blieb und somit durch seinen sauren, polyanionischen Charakter^[88] für die elektrostatische Abstoßung zu den Partikeln verantwortlich gemacht werden kann. Auch die mögliche Degradation der Fasern, welche eine stärker saure Oberfläche kreiert, kann hier unterstützend wirken. Zudem deuten ebenfalls die Zetapotentialmessungen nach dem *Release* auf einen Erhalt des HS auf der Faseroberfläche hin. Mithilfe der vorliegenden REM-Aufnahmen kann darüber jedoch keine genaue Aussage getroffen werden. Weiterhin zeigen die ZP-Titrationskurven einen stark sauren Charakter der unmodifizierten Fasern nach dem *Release* durch eine mögliche Degradation der Faseroberfläche, sodass es zu einer stärkeren elektrostatischen Abstoßung zu den sulfat-modifizierten PSLBs als vor den Freisetzungsexperimenten gekommen ist. Die erhaltenen REM-Aufnahmen (a,b) bestätigen dies. Trotz ähnlicher Erscheinung der vorliegenden Aufnahmen kann ein Erhalt des angebundene HS auf den unmodifizierten Polymerfasern nach einem *Release* von 21 Tagen vermutet werden. Im Gegensatz dazu ist auf den Aufnahmen der unmodifizierten Fasern, welche nach den Freisetzungsexperimenten mit den amino-modifizierten PSLBs behandelt wurden, ein Unterschied auszumachen. Auf den Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, adsorbierten mehr Nanopartikel (h) als auf den Kontrollfasern (f). Zudem haben sich auf beiden Fasersorten Agglomerate der Partikel gebildet (e,g). Um dies sichtbar zu machen, wurde hier eine abweichende Vergrößerung der Bilder gewählt. Die Agglomerate können durch Wechselwirkungen der Nanopartikel untereinander entstanden sein. Die Aminogruppen können bspw. Wasserstoffbrückenbindungen zueinander ausbilden. Die größere Menge an amino-modifizierten PSLBs auf den Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, deutet auf den Erhalt des Biomoleküls auf der Faseroberfläche hin. Die Partikel mit einem positiven ZP können somit von dem sauren, polyanionischen HS auf der Faseroberfläche elektrostatisch angezogen worden sein. Im Gegensatz dazu scheint die Oberfläche der Kontrollfasern eine geringere Dichte an negativen Ladungen aufzuweisen, obwohl die zugehörige ZP-Titrationskurve stärker negative Werte aufzeigt als diejenige der Fasern mit HS (siehe Abbildung 52). Auch hier kann die vorliegende Messmethode als Grund für den Unterschied gesehen werden. Mit ihrer Hilfe kann lediglich die Gesamtladung der Oberfläche durch eine überströmende Elektrolytlösung bestimmt werden. Für die mit HS beschichteten Fasern

ist diese jedoch von der Lage der Polymerstränge abhängig. Trotz dessen, dass die amino-modifizierten Fasern nun wahrscheinlich mehr saure Carboxyl-Gruppen als vor den Freisetzungsexperimenten besitzen, weisen diese jedoch eine geringere Säurestärke als die Sulfatgruppen im HS auf. Durch ihre geringe Größe können die Nanopartikel direkt mit den einzelnen Gruppen auf der Faseroberfläche wechselwirken. Somit werden sie stärker von den Sulfatgruppen mit einer höheren Säurestärke angezogen als von den Carboxylgruppen mit einer geringeren Säurestärke. Natürlich können sich auch hier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen auf den Partikeln und den zugehörigen Gruppen auf den Fasern ausgebildet haben. Insgesamt deuten die erhaltenen REM-Aufnahmen jedoch auf den Erhalt des HS auf der Oberfläche der unmodifizierten Fasern hin. Trotz dessen muss auch bei diesen Ergebnissen der Einfluss der geladenen, möglicherweise strukturinstabilen Polymere und die dadurch entstehenden Wechselwirkungen berücksichtigt werden (siehe Kapitel 4.2.1 sowie Abbildung 43).

Weiterhin wurden die Untersuchungen mit den amino-modifizierten Fasern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 dargestellt.

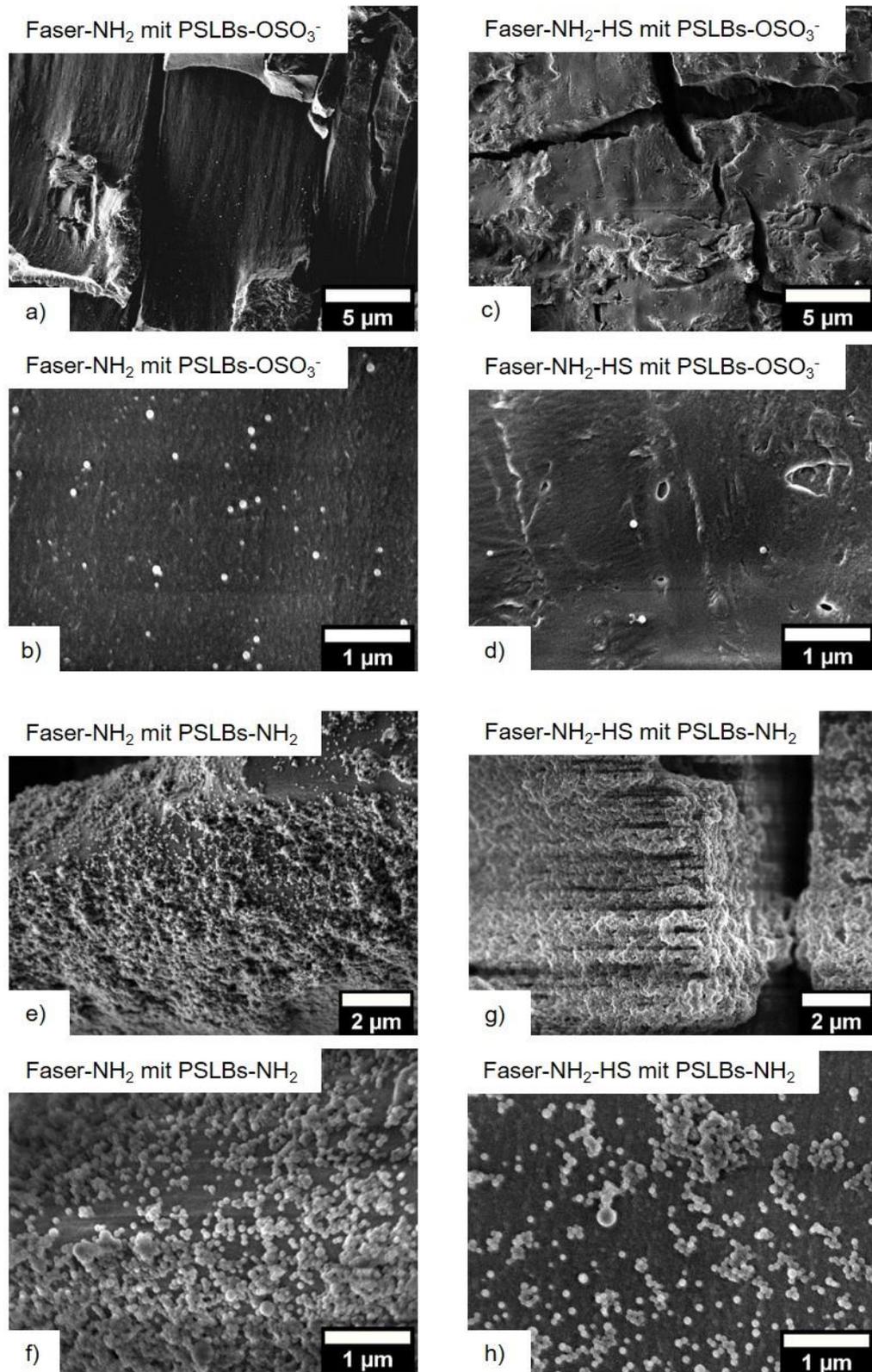


Abbildung 56: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der amino-modifizierten Polymerfasern nach der Reaktion mit HS sowie deren Kontrollen, nachdem sie einem *Release* von 21 Tagen ausgesetzt und in verschiedenen PSLBs-Dispersionen inkubiert wurden in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen. (a, b): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (c, d): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-OSO₃⁻-Dispersion inkubiert wurden. (e, f): Amino-modifizierte Fasern, welche nicht mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLBs-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. (g, h): Amino-modifizierte Fasern, welche mit HS in Kontakt kamen und anschließend in einer PSLB-NH₂-Dispersion inkubiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen deuten sowohl auf die Degradation der Fasern nach dem *Release* als auch auf den Erhalt des angebondenen HS hin.

Die Aufnahmen der amino-modifizierten Fasern, welche mit den sulfat-modifizierten PSLBs behandelt wurden, zeigen kaum angelagerte Partikel auf der Oberfläche. Hier zeigt sich die Degradation der Fasern (siehe Abbildung 52) während des *Release* und die damit verbundene stärker negativ ausgeprägte Oberflächenladung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch erhalten, als die Fasern nach den Freisetzungsexperimenten mit den NPSNPs behandelt wurden. Somit kann eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Partikeln mit einem negativen ZP und der Faseroberfläche mit einer ebenfalls negativen Oberflächenladung vermutet werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass auf den Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, viel weniger Partikel angelagert wurden als auf den Kontrollfasern. Dies kann auf den stark sauren Charakter des HS und der damit verbundenen stärkeren elektrostatischen Abstoßung zurückzuführen sein. Somit deuten die erhaltenen Ergebnisse auf eine stabile Anbindung des Biomoleküls an die Oberfläche der amino-modifizierten Fasern hin. Nichtsdestotrotz zeigt die ZP-Titrationskurve der Kontrollfasern stärker negative Werte als diejenige der Fasern mit HS (siehe Abbildung 45). Analog zu den vorherigen Diskussionen kann auch hier die vorliegende Messmethode als Grund für den Unterschied ausgemacht werden. Durch die überströmende Elektrolytlösung kann hier lediglich die Gesamtladung der Oberfläche bestimmt werden. Für die mit HS beschichteten Fasern ist diese jedoch von der Lage der Polymerstränge abhängig. Die höhere Säurestärke der Sulfat-Gruppen im HS kann für die stärkere elektrostatische Abstoßung zu den sulfat-modifizierten PSLBs verantwortlich gemacht werden. Durch ihre geringe Größe können die Nanopartikel direkt mit den einzelnen Gruppen auf der Faseroberfläche wechselwirken. Dahingegen adsorbierten die amino-modifizierten PSLBs sehr stark auf beiden Fasertypen nach dem *Release*. Die REM-Aufnahmen verdeutlichen, dass es auf beiden Fasertypen sowohl Bereiche gibt, die sehr stark mit den Nanopartikeln belegt sind als auch Stellen vorzufinden sind, die eine geringere Menge an adsorbierten PSLBs aufweisen. Ein Unterschied zwischen den Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, und ihren Kontrollfasern kann nicht ausgemacht werden. Die starke Anlagerung der Partikel kann sowohl auf die elektrostatische Anziehung durch das saure, polyanionische HS als auch die generierten Carboxylgruppen auf der Faseroberfläche zurückzuführen sein. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass beide Fasersorten eine negative Oberflächenladung aufweisen, die durch die Degradation der Fasern während der Freisetzungsexperimente erzeugt wurde (siehe Abbildung 45). Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen der Partikel und den korrespondierenden Gruppen auf den Fasern können diese Wechselwirkungen jedoch überlagern und so das Ergebnis beeinflussen. Somit kann mithilfe der vorliegenden REM-Aufnahmen zwar auf die Degradation der Fasern während des *Release* geschlossen werden, ein Erhalt des HS auf der Oberfläche der amino-modifizierten Fasern kann jedoch nur vermutet werden. Auch hier muss der Einfluss der geladenen, möglicherweise strukturinstabilen Polymere und die dadurch entstehenden Wechselwirkungen berücksichtigt werden.

Insgesamt deuten auch die Inkubationsversuche mit den verschiedenen Sorten an oberflächenmodifizierten Nanopartikeln auf einen Erhalt des HS auf den beiden Fasertypen nach einem Release von 21 Tagen hin. Da angesichts der vorliegenden Freisetzungsexperimente anschließend kaum HS von den Fasern freigesetzt wurde, kann vermutet werden, dass dieses stabil auf den Fasern angebunden ist. Der Einsatz der Kupplungsreagenzien EDC/NHS hat somit zu einer stabilen, wahrscheinlich kovalenten Anbindung des HS an die un- sowie amino-modifizierten Polymerfasern geführt.

4.2.3 Zusammenfassung

Für die Etablierung einer neuronalen Leitstruktur im Innenohr des Menschen sollte im Rahmen dieser Arbeit das Glykosaminoglykan HS stabil auf der Oberfläche der Fasern angebunden werden und somit den umliegenden Zellen als Imitator für die extrazelluläre Matrix dienen. Um ein besseres Verständnis für das Verhalten von HS in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu erhalten und damit die Anbindung des Moleküls an die Polymerfasern besser untersuchen zu können, wurden zunächst DLS Messungen durchgeführt. Hierbei wurden im sauren Milieu höhere hydrodynamische Radien ($d \approx 200$ nm) als im basischen Milieu ($d \approx 50$ nm) bestimmt. Möglicherweise führt die geringere Ladung des HS im sauren Milieu zu dessen Aggregation.^[429] Die Anbindung des HS sowohl an die un- als auch an die amino-modifizierten Fasern wurde anschließend in MES-Puffer (pH = 4) durchgeführt ($c_{\text{HS}} = 200$ μM). Um das Molekül stabil bzw. kovalent an die Oberfläche der Fasern anzubinden, wurden das Kupplungsreagenz EDC sowie der Stabilisator NHS hinzugefügt. Hierbei konnte mithilfe verschiedener Nachweismethoden qualitativ die erfolgreiche Anbindung des HS an beide Fasertypen festgestellt werden. Sowohl der Toluidinblau-Test als auch die Zeta-Potential-Messungen weisen ein gleiches Ergebnis für beide Fasertypen auf. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass sich das Molekül in vergleichbaren Mengen an die unterschiedlichen Fasern angelagert hat. Letztere Methode zeigt zudem, dass die Oberflächenchemie in beiden Fällen vom HS dominiert wird. Weiterhin konnte durch die Anlagerung von Nanopartikeln (NPSNPs, PSLBs) mit positivem sowie negativem Zetapotential qualitativ bestätigt werden, dass HS unter Zuhilfenahme von EDC/NHS an die Fasern angebunden werden konnte. Die Ergebnisse weisen jedoch einige Unstimmigkeiten auf. Eine Möglichkeit der Erklärung bieten die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Faseroberfläche. Eventuell kann durch die amino-modifizierten NPSNPs visualisiert werden, welche Bereiche der Faser mit HS beschichtet wurden. Die Partikel haben sich in starken Agglomeraten auf den Fasern mit HS angelagert. Da sie ein positives Zetapotential besitzen, wird angenommen, dass sie vom sauren, polyanionischen HS^[88] elektrostatisch angezogen werden.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das HS ohne EDC/NHS nicht bzw. nur in unzureichend messbaren Mengen an die Fasern angelagert werden konnte. Dies konnte zunächst mithilfe des Toluidinblau-Tests gezeigt werden. Zudem wurden Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem HS durchgeführt. Über indirekte Fluoreszenzmessungen der Inkubationslösungen ergab sich jedoch ebenfalls ein negatives Ergebnis. Somit scheinen die Kupplungsreagenzien notwendig zu sein, um HS sowohl an die unmodifizierten als auch an die amino-modifizierten Fasern anzulagern. Neben der kovalenten Anbindung über die funktionellen Gruppen im HS kann dieses zudem über Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Anziehung an die Fasern angelagert werden. Da die ZP-Messungen ein gleiches Verhalten der beiden Fasertypen mit HS zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil an COOH- sowie NH₂-Gruppen, welche an der kovalenten Bindung zur Faseroberfläche beteiligt sind, gering ist. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass viele reaktive Gruppen im HS frei verfügbar vorliegen, um später aktiv ihre Funktion auszuführen. Hierzu gehört neben der geplanten weiteren Anbindung von Wachstumsfaktoren, wie BDNF, auch die Wechselwirkungen mit den Neuronen in der Anwendung im Innenohr. Bei einer kovalenten Anbindung kann es nach vorangegangenen Studien dazu kommen, dass das jeweilige Molekül einen Teil seiner biologischen Aktivität verliert.^[86] Da in diesem Fall jedoch kaum reaktive Gruppen einer chemischen Bindung unterzogen wurden, sondern frei vorliegen, kann vermutet werden, dass das Molekül einen Großteil seiner Aktivität behalten hat. Für weitere Studien wären quantitative Untersuchungen zur Bestimmung der angebundenen Mengen des HS an die Fasern sinnvoll. So könnte der TB-Test quantitativ ausgeweitet werden.^[380] Andererseits wäre es möglich, die Inkubationsversuche mit fluoreszentem HS auszuweiten. Da die vorliegenden Messergebnisse zeigen, dass die Kupplungsreagenzien das zu detektierende Signal stören, wäre eine vorzeitige Aktivierung der Fasern mit EDC/NHS und eine anschließende Behandlung mit dem fluoreszenzmarkierten HS möglich.^[257,438,439] Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis zeigten mithilfe dieser Methode schon erfolgreiche, quantitative Ergebnisse.^[440]

Weiterhin wurde die Stabilität des angebundenen HS untersucht. Wie zuvor erwähnt, sollten die Fasern in einem nächsten Schritt mit dem Wachstumsfaktor BDNF beschichtet werden. Es konnte unter Zuhilfenahme des fluoreszenzmarkierten HS herausgefunden werden, dass während dieses Inkubationsschritts sowohl von den Fasern mit EDC/NHS als auch ohne Kupplungsreagenzien kein HS abgegeben wurde. Da die Fasern in der Anwendung im Innenohr über einen langen Zeitraum der dortigen Lympheflüssigkeit ausgesetzt sind, wurden weitere Experimente zur Freisetzung des HS unter physiologischen Bedingungen (PBS (+0.1 % BSA), 37 °C) durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass von den Fasern, welche ohne EDC/NHS mit HS behandelt wurden, kaum etwas freigesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse kann daher vermutet werden, dass kein bzw. nur sehr geringe, kaum messbare Mengen an HS angebunden wurden. Von beiden Fasertypen, welche

unter Zuhilfenahme von EDC/NHS mit HS beschichtet wurden, konnten in den ersten 21 d etwa 250 ng des fl. markierten HS freigesetzt werden, wohingegen anschließend kaum noch etwas abgegeben wurde und der *Release* sich bis zu Tag 105 einem Plateau näherte. Durch möglicherweise geringere Wechselwirkungen mit der Faseroberfläche wurde von den unmodifizierten Fasern mehr HS freigesetzt als von den amino-modifizierten Fasern. Zudem unterstützte der zusätzliche Inkubationsschritt für die spätere Anbindung des BDNFs die Freisetzung von HS. Zurückgeführt werden kann dies auf eine gesteigerte Degradation der biodegradierbaren Fasern. Die Ergebnisse gehen einher mit der Annahme, dass HS zu Anfang erfolgreich an die Fasern angebunden wurde. Weiterhin bestand die Vermutung, dass in den ersten 21 d lediglich adsorptiv angelagertes HS von den Fasern freigesetzt wurde. Um zu untersuchen, ob anschließend kovalent gebundenes HS stabil auf den beiden Fasertypen vorliegt, wurden sowohl Zetapotentialmessungen als auch Anlagerungsversuche mit den Nanopartikeln durchgeführt. Beide Untersuchungsmethoden deuteten zunächst auf die Degradation der Fasern während ihrer Lagerung im physiologischen Medium hin. Die Oberfläche der Fasern weist laut ZP-Messungen eine stärker negative Ladung auf, sodass sich auch weniger Nanopartikel mit einer negativen Oberflächenladung bzw. mehr Partikel mit einer positiven Oberflächenladung anlagerten. Zudem konnte mithilfe der Versuche gezeigt werden, dass HS auf beiden Fasertypen erhalten blieb. Die ZP-Messungen markieren, dass HS die Oberflächenchemie der Fasern bestimmt und geben einen Hinweis darauf, dass es die Fasern möglicherweise vor einer stärkeren Degradation schützt.

Insgesamt konnte somit innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mithilfe der Kupplungsreagenzien EDC/NHS das extrazelluläre Matrixmolekül HS stabil, wahrscheinlich kovalent, an die un- sowie amino-modifizierten Fasern angebunden werden konnte. Unter physiologischen Bedingungen werden innerhalb der ersten 21 d adsorptiv angelagerte Mengen HS von den Fasern freigesetzt. Anschließend liegt das Biomolekül bis zu 105 d stabil auf den beiden Fasertypen vor. Auch in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Glykosaminoglykane, wie HS, über einen längeren Zeitraum stabil^[379] mithilfe von Carbodiimiden sowohl an Oberflächen mit NH_2 -^[89,377,379] als auch OH-/COOH-Gruppen^[379–382] in MES Puffer angebunden werden konnte. Dahingegen führte eine Adsorption von HS an Oberflächen ohne zusätzliche Reagenzien lediglich zu einer kurzzeitigen Anlagerung und zeitigen Freisetzung des Biomoleküls.^[369,370] Somit erfüllen die Fasern im Rahmen dieser Arbeit die Bedingungen für eine Anwendung am CI, bei der das HS als fester Bestandteil der neuronalen Leitstruktur dienen und als Vertreter der extrazellulären Matrix den Neuriten auf ihrem Weg zur Implantatoberfläche Unterstützung geben soll.

Zusätzlich kann in Zukunft mithilfe der vorliegenden Ergebnisse an einer Zusammenführung von Teilprojekten im Arbeitskreis Behrens zur Optimierung des Elektroden-Nerven-Kontaktes im Rahmen des CIs gearbeitet werden. So forschte Dr. N. SCHMIDT an der Immobilisierung

von Wirkstoffen auf den NPSNPs, um diese anschließend im Innenohr wieder freizusetzen, sodass sie lokal ihre Wirkung entfalten können. Denkbar wäre somit eine Anlagerung der NPs mit eingelagertem Wirkstoff an die Fasern, welche als *Drug Delivery* Reservoir dienen. Von den NPs konnten schon große Mengen an BDNF freigesetzt werden, welche einen positiven Effekt auf die SGNs zeigten.^[59]

4.3 Entwicklung eines Freisetzungssystems für BDNF

Ziel dieser Arbeit ist es, das neuronale Leitsystem hinsichtlich der Anwendung auf der Cochlea-Elektrode ebenfalls als ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem für BDNF einzusetzen. Der Wachstumsfaktor ist als natürlicher Bestandteil der Cochlea für das Überleben sowie die Regeneration der dort ansässigen Spiralganglienneuronen zuständig.^[54,195,196] Als Wirtmaterial dienen die zuvor mit HS beschichteten Polymerfasern. Hierbei wird die Fähigkeit des Glykosaminoglykans, Wachstumsfaktoren anzubinden, zu stabilisieren und deren Freisetzung zu kontrollieren, genutzt. Dazu wird im folgenden Kapitel zunächst die Immobilisierung des BDNFs auf den Fasern analysiert. Anschließend erfolgt eine Quantifizierung der sowohl immobilisierten als auch freigesetzten BDNF-Mengen. Vergleichend wurde untersucht, inwieweit die vorherige Immobilisierung von HS auf den Fasern die Ergebnisse beeinflusst. Um sowohl den neuroprotektiven als auch den –regenerativen Einfluss der entwickelten Freisetzungssysteme zu bestimmen, erfolgt anschließend eine genaue Darstellung der Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen mit den SGN.

4.3.1 Immobilisierung von BDNF auf den Polymerfasern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, inwieweit BDNF an die unterschiedlichen Fasertypen angebunden werden konnte. Mithilfe eines qualitativ durchgeführten ELISAs wurde dies zunächst überprüft.

Qualitativer ELISA

Die mit HS beschichteten un- sowie amino-modifizierten Fasern wurden in einer BDNF-Lösung in PBS (0,1 % BSA) 24 Stunden bei 4 °C inkubiert, um das Protein an ihrer Oberfläche zu immobilisieren. Dabei wurde eine BDNF Konzentration von $c_{\text{BDNF}} = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gewählt. Es handelte sich hierbei um die Fasern, welche zuvor kovalent mit HS beschichtet wurden.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss das HS auf die Immobilisation des BDNFs hat, wurden dieselben Experimente mit Fasern durchgeführt, welche zuvor nicht mit dem Glykosaminoglykan beschichtet wurden. Zunächst wurde ein qualitativer, direkter BDNF-spezifischer ELISA auf den Fasern selbst durchgeführt, um zu testen, ob die Immobilisation erfolgreich verlaufen ist. Dazu wurden die einzelnen Lösungen des ELISA-Kits direkt zu den Fasern in

einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die restliche Durchführung entsprach dem gängigen Protokoll. Fotografien der Proben nach Zugabe der *TMB color developing* -Lösung sind in Abbildung 57 zu sehen. Bei Anwesenheit von BDNF ist die Lösung für eine enzyminduzierte Blaufärbung verantwortlich.

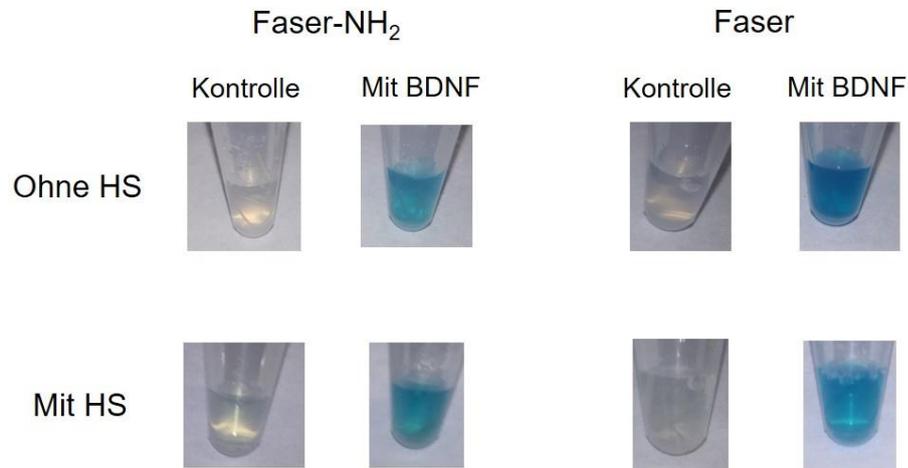


Abbildung 57: Fotografien der un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche mit BDNF und ggf. HS behandelt wurden sowie deren Kontrollen, nachdem sie in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß einem direkten, BDNF-spezifischen ELISA unterzogen wurden. Die auftretende Blaufärbung weist auf die erfolgreiche Immobilisierung des Wachstumsfaktors an alle Fasertypen hin.

Die Fotografien zeigen nicht nur die ELISA-Lösungen, sondern ebenfalls die darin enthaltenen Fasern, obwohl diese hier schlecht zu erkennen sind. Trotz dessen ist allen Proben, welche zuvor mit BDNF behandelt wurden, gemein, dass sie eine Blaufärbung aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen die Fotografien aller Kontrollen keine Färbung. Da die Blaufärbung ein Indikator für einen positiv verlaufenden ELISA-Test ist, welcher die Anwesenheit von BDNF anzeigt, kann geschlussfolgert werden, dass auf allen Fasertypen BDNF immobilisiert wurde. Mithilfe dieses Verfahrens konnte die Anbindung des Wachstumsfaktors visualisiert werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass keine Aussagen über die Mengen an angebundem BDNF getätigt werden können.

Quantitative Bestimmung der immobilisierten BDNF Mengen

Zur Quantifizierung wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Dazu wurden die verbleibenden Konzentrationen des Proteins in den Inkubations- und Waschlösungen bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Quantifizierung der Mengen an immobilisiertem BDNF auf den un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche ggf. zuvor mit HS beschichtet und anschließend in einer BDNF-Lösung inkubiert wurden ($c_{\text{BDNF}} = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BDNF).

Fasertyp	BDNF-Konzentration		Beladungseffizienz auf den Fasern (%)
	Inkubationslösung (ng mL^{-1})	Waschlösung (ng mL^{-1})	
Faser	1284.0 ± 193.7	58.4 ± 21.0	0
Faser-NH ₂	957.0 ± 253.4	39.4 ± 2.7	0
Faser-HS	5.0 ± 2.1	6.3 ± 3.2	98.9 ± 0.8
Faser-NH ₂ -HS	4.2 ± 0.9	2.5 ± 0.6	99.3 ± 0.2

Zunächst ist zu erkennen, dass unter Berücksichtigung der Standardabweichungen in den Inkubations- sowie Waschlösungen der Fasern, welche zuvor nicht mit HS beschichtet wurden, die gesamten BDNF-Mengen wiedergefunden wurden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass keine bzw. nur unzureichend messbare Mengen an BDNF auf den Fasern immobilisiert wurden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denjenigen aus dem qualitativen ELISA, welcher eine erfolgreiche Immobilisierung des Wachstumsfaktors auf ebendiesen Fasern voraussagte. Begründet werden kann dieser Unterschied mit der Sensitivität der jeweiligen Messmethoden. Nach Herstellerangaben zeigt der vorliegende ELISA ein positives Ergebnis bei Anwesenheit von BDNF-Konzentrationen in einem Bereich von 31.2 bis 2000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Somit können auch schon sehr geringe Mengen an BDNF in dem direkten, qualitativen ELISA zu einem positiven Ausschlag geführt haben. Diese Mengen waren jedoch zu gering, um mithilfe des ELISAS indirekt über die Inkubations- sowie Waschlösungen bestimmt zu werden. Somit ist davon auszugehen, dass sich lediglich geringe Mengen an BDNF an die un- sowie amino-modifizierten Fasern ohne HS angelagert haben. Im Gegensatz dazu sind die BDNF-Konzentrationen in den Inkubations- und Waschlösungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, sehr gering (in den niedrigen $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Bereichen gegenüber $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in der Inkubationslösung). Folglich haben beide Fasertypen nahezu die Gesamtmenge an BDNF immobilisiert. Einige Proteinmoleküle können jedoch bei Ad- und Desorptionsvorgängen an der Faseroberfläche Konformationsänderungen erfahren haben. Diese Moleküle würden nicht zum ELISA-Signal beitragen, da sie nicht mehr immunologisch aktiv sind. Daher ist bei der Interpretation der Ergebnisse

Vorsicht geboten, und immobilisierte Mengen, die indirekt bestimmt wurden, können tatsächlich zu hoch sein. Kontrollexperimente, bei denen eine Inkubation von BDNF ohne Fasern stattfand, zeigen jedoch die Stabilität des Wachstumsfaktors während der Inkubationsversuche, da die gesamte BDNF-Menge durch den ELISA wiedergewonnen wurde. Weiterhin muss beachtet werden, dass sich auch BSA-Moleküle ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in der Inkubationslösung befinden und als Konkurrent hinsichtlich der Bindungsstellen wirken können. Aufgrund des natürlichen Verhaltens von Proteinen können diese ebenfalls auf der Oberfläche der Fasern immobilisiert werden. Nach vorangegangenen Studien werden zwar BSA-Moleküle angelagert, sie haben jedoch keine Auswirkung auf die Menge des immobilisierten BDNFs.^[165]

Für die Anwendung der beschichteten Fasern im Innenohr im Rahmen des CIs ist es von Bedeutung, dass BDNF dort auf einen extrazellulären Rezeptor wirkt. Obwohl nicht endgültig ausgeschlossen werden kann, dass auch oberflächengebundenes BDNF eine Wirkung ausübt, erscheint es wahrscheinlicher, dass gelöste Moleküle des Wachstumsfaktors die Rezeptoren erreichen. Daher ist eine kovalente Bindung des BDNF an die Fasern nicht angestrebt. Stattdessen wird ein biomimetischer Ansatz verfolgt, da bekanntlich eine der biologischen Rollen von HS als extrazelluläre Matrixkomponente darin besteht, Wachstumsfaktoren, wie BDNF, zu binden und freizusetzen.^[93,100,101] Andere Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Faseroberfläche können weiter zur Bindung und Freisetzung von BDNF beitragen. Die Fasern können zusätzlich elektrostatisch mit BDNF interagieren, da beide Typen nach Dekoration mit HS bei einem pH-Wert von 7.4 (siehe Abbildung 45) ein ähnlich negatives Zetapotential aufweisen. Dieser pH-Wert entspricht dem von PBS. BDNF als basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt von ungefähr 10 weist bei diesem pH-Wert eine positive Nettoladung auf.^[42,62] Wasserstoffbrücken zwischen Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminogruppen auf der Oberfläche der Polymerfasern und verschiedenen Einheiten des Proteins unterstützen die Anlagerung ebenso wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Regionen der Polymeroberfläche und entsprechenden Domänen des BDNFs (siehe Abbildung 58).^[213] Zusätzlich können sich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen möglicherweise adsorbierten BSA-Molekülen und dem BDNF ausbilden. Da BSA unter den Inkubationsbedingungen (IEP = 4.7) eine negative Oberflächenladung aufweist, sind elektrostatische Anziehungskräfte zum positiv geladenen BDNF-Dimer möglich.^[213] Um diese Vermutung zu stützen, müssten jedoch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Immobilisierung sowie Wechselwirkung der BSA-Moleküle folgen.

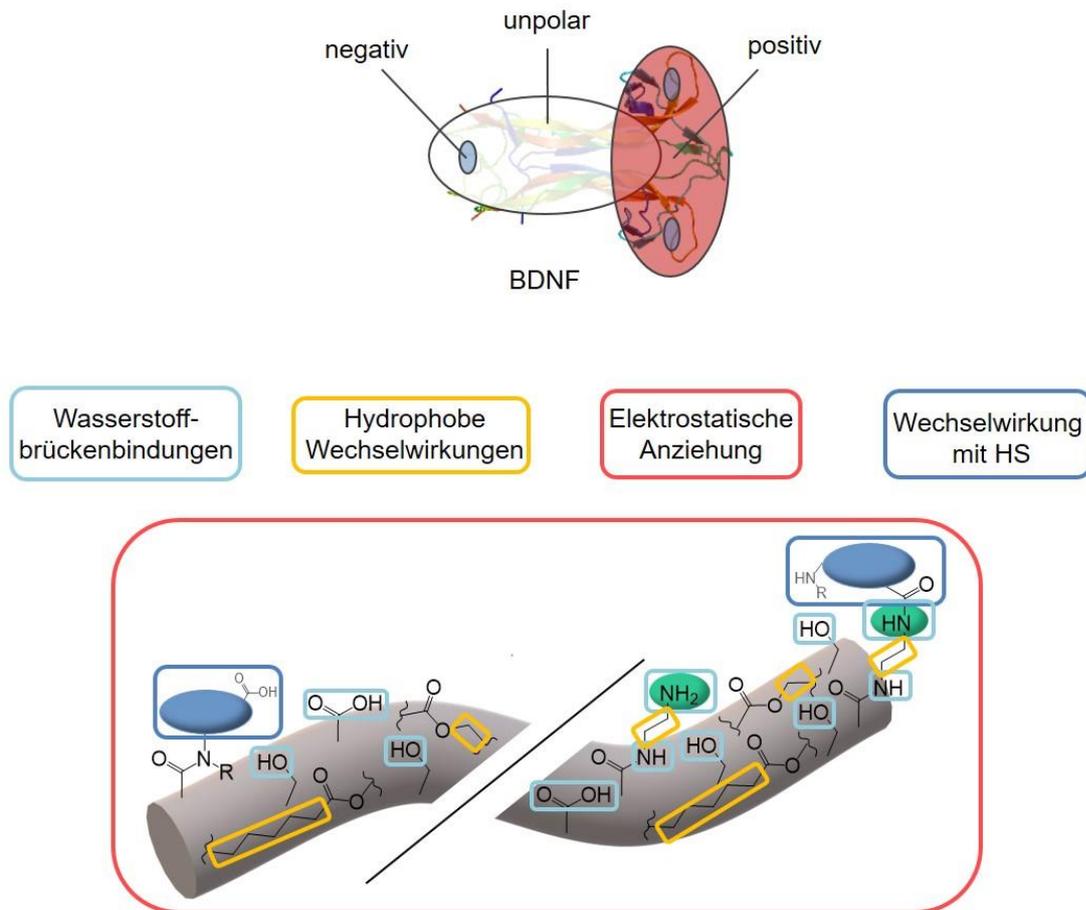


Abbildung 58: Schematische Darstellung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen BDNF (vgl. Abbildung 12)^[190,213,214] und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (links) sowie amino-modifizierten (rechts) Polymerfasern (mit HS).

4.3.2 BDNF-Freisetzung von den Polymerfasern

Für die Anwendung im Innenohr soll der Wachstumsfaktor BDNF über einen längeren Zeitraum hinweg von den Fasern abgegeben werden, um im Kontakt mit den SGNs ihre Überlebensrate zu erhöhen und das Aussprossen der Neuriten zu fördern. Diese sollen anschließend entlang der neuronalen Leitstruktur zur Oberfläche des Implantats wachsen, um besser mit diesem wechselwirken zu können.

Somit wurden Untersuchungen zur Freisetzung des BDNFs von den verschiedenen Fasertypen durchgeführt. Diese fanden unter physiologischen Bedingungen statt, um die Situation im Innenohr des Menschen nachzuahmen. Dafür wurden fünf Fasern in jeweils 1 mL PBS (+0.1 % BSA) bei 37 °C über einen festgelegten Zeitraum inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entnommen, eingefroren und durch eine frische Lösung ersetzt. Die freigesetzten Mengen an BDNF wurden schließlich aus den eingefrorenen Überstandslösungen durch einen BDNF-spezifischen ELISA bestimmt. Dazu zeigt Abbildung 59 die kumulativ freigesetzte Menge an

BDNF von den un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, über einen Zeitraum von 105 Tagen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss HS auf den *Release* des Wachstumsfaktors hat, wurden zudem Experimente mit Fasern durchgeführt, welche zuvor nicht mit dem Glykosaminoglykan behandelt wurden. Auch diese Ergebnisse sind in der folgenden Grafik dargestellt.

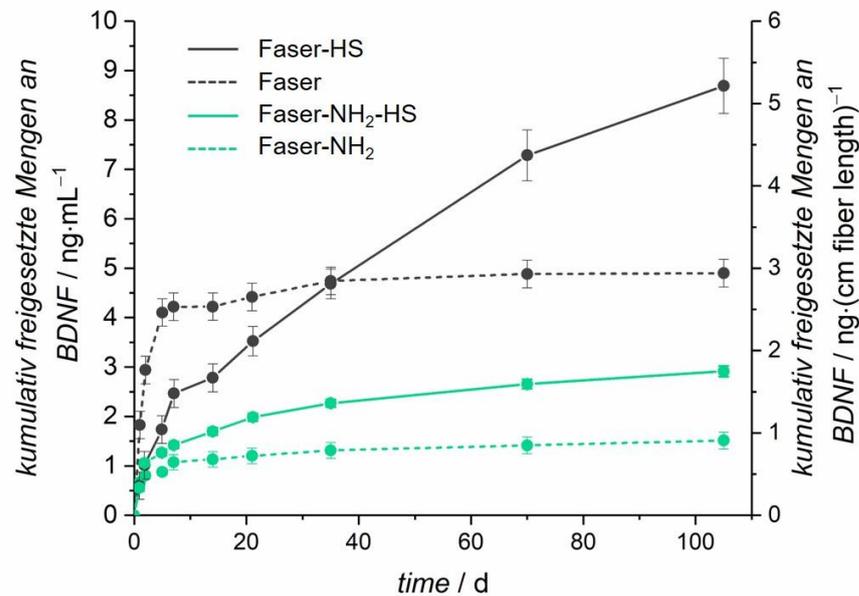


Abbildung 59: Graphische Darstellung der kumulativ freigesetzten Menge an BDNF von den un-sowie amino-modifizierten Fasern mit / ohne HS über einen Zeitraum von 105 d in PBS (+0.1 % BSA). Von den Fasern mit HS konnte der Wachstumsfaktor auch zu späteren Zeitpunkten in höheren Mengen abgegeben werden.

Die unmodifizierten Fasern mit HS zeigen eine verzögerte bzw. länger andauernde Freisetzung von BDNF, sodass nach 105 Tagen $9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des Wachstumsfaktors von den Fasern abgegeben wurden. Dies entspricht 2 % der scheinbar immobilisierten Menge an BDNF. Die mit HS vorbeschichteten, amino-modifizierten Fasern zeigen eine ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte verzögerte bzw. länger andauernde Freisetzung von BDNF. Insgesamt wurden innerhalb von 105 Tagen $3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ freigesetzt, was 1 % des ursprünglich gebundenen BDNF entspricht. Anhand beider Kurven ist ersichtlich, dass die Freisetzung nach 105 Tagen noch nicht beendet ist. Es wird erwartet, dass die weitere Freisetzung aus den nicht modifizierten Fasern mit HS-Vorbeschichtung aufgrund der höheren Steigung der anfänglichen Kurve stärker ist. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass sehr hohe BDNF-Spiegel, wie sie beispielsweise nach einem dauerhaften, lärminduzierten Trauma beobachtet werden, auch schädlich sein können. Die unterschiedliche Regulation von BDNF und seinen Pro-Formen sowie seiner Rezeptoren bedarf weiterer Überlegungen.^[441] Die Bedeutung der HS-Beschichtung wird deutlich, wenn die Freisetzungskurven der HS-tragenden sowie nicht tragenden Fasern verglichen werden. Aus Abbildung 59 ist zu erkennen, dass von beiden Fasertypen (ohne HS, gestrichelte Linien) zunächst in einem *burst-Release* ein Großteil des BDNFs abgegeben wurde und sich die Kurven anschließend einem Plateau nähern.^[436] Von den unmodifizierten Fasern wurden

insgesamt $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und von den amino-modifizierten Fasern $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ abgegeben. Verglichen mit den Experimenten aus der Anbindung des BDNFs an diese Fasertypen kann vermutet werden, dass zu Anfang geringe Mengen an BDNF im ng-Bereich an die Fasern adsorbierten. Diese wurden jedoch während der Freisetzungsexperimente durch die schwache Wechselwirkung mit der Faseroberfläche relativ schnell wieder abgegeben.

Um den Einfluss des HS auf den *Release* weiter zu untersuchen, stellt Abbildung 60 die relativen Freisetzungskurven dar, bei denen die freigesetzte Gesamtmenge für jede Kurve auf 100 % eingestellt ist.

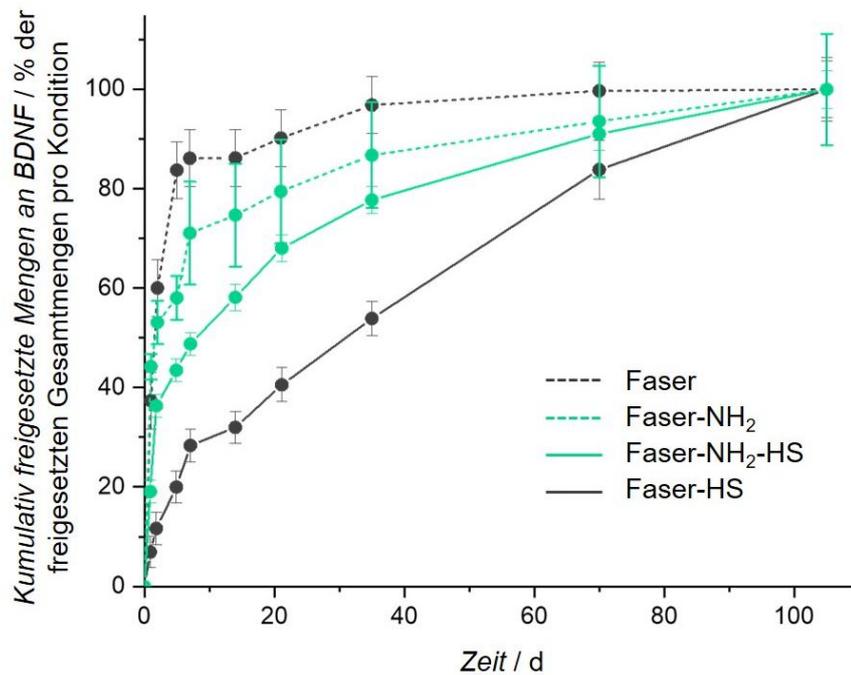


Abbildung 60: Graphische Darstellung der kumulativ freigesetzten Mengen an BDNF von den un- sowie amino-modifizierten Fasern mit / ohne HS, bei der die freigesetzte Gesamtmenge für jede Kurve auf 100 % eingestellt ist. Von den Fasern mit HS wird der Wachstumsfaktor BDNF kontinuierlicher abgegeben als von den Fasern ohne HS.

Ohne die HS-Vorbeschichtung zeigen beide Fasertypen, wie zuvor schon beschrieben, eine *Burst*-Freisetzung (gestrichelte Linien),^[436] während in beiden Fällen, in denen HS auf den Fasern vorhanden ist, eine kontinuierlichere Freisetzung beobachtet wird (durchgezogene Linien). Zunächst stützen diese Ergebnisse die vorliegenden Erkenntnisse über eine erfolgreiche und langanhaltende stabile Bindung von HS an die Oberfläche der Polymerfasern. Zudem entspricht es dem gewünschten biomimetischen Ansatz, bei dem HS als Nachahmung der extrazellulären Matrix sowohl bei der Speicherung als auch bei der Stabilisierung und langsamen Freisetzung des Wachstumsfaktors dient. Die allgemeine Form der Freisetzungskurven von den mit HS-beschichteten Fasern, wie in Abbildung 59 und Abbildung 60 dargestellt, kann mit einer Freisetzungskinetik erster Ordnung erklärt werden, bei der die Freisetzung des Wirkstoffs bis zu einem gewissen Grad behindert wird; hier durch die Wechselwirkung mit der Wirt-Matrix.^[436] Die Unterschiede in den Freisetzungprofilen dieser beiden Fasertypen

könnten auf die Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen BDNF und der Oberfläche der un- sowie amino-modifizierten Fasern mit HS zurückgeführt werden. Auch der Abbau der Polymerfasern selbst könnte eine Rolle spielen. Da die Beladungseffizienz in beiden Fällen nahezu gleich ist, kann angenommen werden, dass BDNF stärker an die HS-tragenden amino-modifizierten Fasern gebunden ist. Dies resultiert einerseits in einer langsameren Freisetzung. Andererseits ist dies möglicherweise der Grund dafür, dass die von der Oberfläche freigesetzte Gesamtmenge geringer ist. Auch die Auflösung der biologisch abbaubaren Polymerfasern unter physiologischen Bedingungen,^[299,426] wie in PBS, kann zu einer weiteren Freisetzung von BDNF führen. Unterstützend hierzu wurde, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, der Abbau dieser Fasern unter den verwendeten Bedingungen untersucht. Eine anteilige Auflösung der Fasern kann nach Freisetzungsperioden von 98 Tagen beobachtet werden. REM-Untersuchungen zeigen eine Abnahme der Durchmesser der Fasern und das Auftreten von Rissen im Laufe der Zeit. Diese Effekte sind bei den amino-modifizierten Fasern viel ausgeprägter zu beobachten als bei den nicht modifizierten Fasern, wobei erstere offensichtlich während des Modifizierungsverfahrens angegriffen wurden (vgl. Abbildung 35). Darüber hinaus zeigen Messungen des pH-Werts des umgebenden Mediums, dass die Abnahme des pH-Werts aufgrund der Freisetzung saurer Komponenten während des Faserabbaus bei den amino-modifizierten Polymerfasern viel weniger ausgeprägt ist (siehe Abbildung 41 sowie Abbildung 65). Dies weist auf die Wirkung der basischen Spezies (Ethylendiamin oder Derivate davon) auf der Oberfläche der amino-modifizierten Fasern freigesetzt hin. Die basischen Spezies werden mit der Zeit von den Fasern freigesetzt. Diese Beobachtungen deuten jedoch eher auf eine stärkere Freisetzung aus den amino-modifizierten Fasern hin. Dies widerspricht der Feststellung, dass von diesen Fasern geringere Mengen an BDNF freigesetzt wurden als von den unmodifizierten Fasern. Es kann vermutet werden, dass bei den amino-modifizierten Fasern die Freisetzung stärker über hydrophobe Wechselwirkungen als über elektrostatische Wechselwirkungen kontrolliert wird, was zu den beobachtbaren Freisetzungsprofilen führt. Darüber hinaus ist es möglich, dass die gelösten Teile der Polymerfasern (Hydroxycarbonsäuren, Ethylendiamin, Derivate davon, usw.) die Nachweisbarkeit von BDNF im ELISA beeinflussen.^[442] Zusätzlich muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass BDNF-Moleküle während des Beladungs- sowie Freisetzungsvorgangs eine Denaturierung erfahren können. Vorangegangene Studien belegen, dass BDNF sowohl unter den vorliegenden Inkubationsbedingungen als auch nach 24 h unter Freisetzungsbedingungen nicht degradiert. Nach 7 d Freisetzung kann jedoch nur noch die Hälfte des BDNF und nach 14 d *Release* lediglich 35 % des Biomoleküls als immunologisch aktiv angesehen und damit im ELISA nachgewiesen werden.^[165] Dies deutet trotz der anwesenden Albumin-Moleküle auf eine Degradation des BDNFs hin.^[398] Der Vorgang ist auf generelle Konformationsänderungen der Proteine in Lösung zurückzu-

führen, da deren native Struktur nur gering thermodynamisch stabil ist.^[443] Somit ist es möglich, dass die tatsächlich freigesetzte Menge an BDNF höher ausfällt als sie im ELISA ermittelt wurde. Relevant ist dies vor allem für die Experimente mit den Fasern, welche lediglich mit BDNF beschichtet wurden. Im Gegensatz dazu scheint die Möglichkeit für die Fasern, welche mit HS und BDNF beschichtet wurden, eher von geringerer Wichtigkeit. Die Bindung von BDNF an HS, die Lagerung auf HS sowie die Freisetzung aus HS ähnelt natürlichen Prozessen. Darüber hinaus haben neuere Studien die erfolgreiche Immobilisierung und Freisetzung von biologisch aktiven Wachstumsfaktoren aus Glykosaminoglykanen gezeigt.^[27,97,101,380] Eine Heparin-enthaltende Matrix auf Fibrinbasis, deren Struktur eng mit HS verwandt ist,^[88] kann BDNF sowohl anbinden als auch wieder freisetzen.^[97] Weiterhin können mit Heparin bedeckte Poly (L-Glutaminsäure)-Partikel effektiv als Trägersysteme für die BDNF-Abgabe verwendet werden.^[27] Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) kann auf einem mit Heparin vorbeschichteten PCL-Gerüst immobilisiert und von diesem freigesetzt werden.^[380] Es wurde weiterhin gezeigt, dass HS sowohl die Beladung als auch die Freisetzung des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF) auf Kollagen-basierten Matrizen verbessert.^[101] Somit ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen zwischen BDNF und den verschiedenen Faseroberflächen einen größeren Einfluss auf die Freisetzungsprofile haben als die anderen Faktoren.

Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Versuche gezeigt werden, dass BDNF von den Fasern, welche zuvor mit HS beschichtet wurden, kontinuierlich über einen Zeitraum von 105 Tagen abgegeben wurde. Die Fasern ohne HS zeigten lediglich die anfängliche Freisetzung von BDNF in einem *initial burst release*. Da für die Anwendung im CI jedoch eine kontinuierliche Behandlung der Neurone mit BDNF gebraucht wird, um ihr Überleben zu sichern sowie die Aussprossung von Neuriten zu fördern, sind lediglich die Fasern mit HS vielversprechend. Aufgrund dessen wurden im Anschluss Zellkulturexperimente mit diesen durchgeführt, um den neuroprotektiven sowie –regenerativen Effekt der Fasern gegenüber den im Ohr existierenden SGNs zu untersuchen.

4.3.3 Neuroprotektiver und -regenerativer Effekt von BDNF-beladenen Fasern

Die zuvor beschriebenen amino- sowie unmodifizierten Polymerfasern, welche sowohl mit HS als auch mit BDNF beschichtet wurden, wurden anschließend auf ihren neuroprotektiven sowie regenerativen Effekt gegenüber den SGNs getestet. Im Rahmen des CI-Systems sollen die Fasern im Innenohr platziert werden, sodass die Abgabe des BDNFs von den Fasern auf die dort existierenden Neurone wirken kann. In vorangegangenen Arbeiten konnte schon die Cytokompatibilität der beiden Fasertypen gegenüber Fibroblasten festgestellt werden.^[444]

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven Effekt der Bestandteile der Polymerfasern**

Um zu sehen, welchen Einfluss die Fasern selbst auf die SGNs haben, wurden zu Anfang Zellkulturexperimente mit einem der Hauptbestandteile der Fasern, der Glykolsäure, und den SGNs durchgeführt. Nachdem verschiedene Mengen an Polyglykolsäure zu den SGNs gegeben wurden, erfolgte eine Inkubation für 48 h sowie anschließende Bestimmung der Überlebensrate der Neurone. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 61 dargestellt.

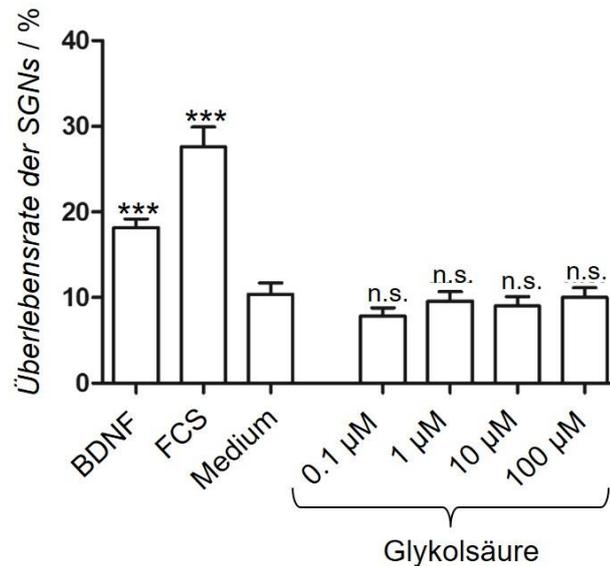


Abbildung 61: Ergebnisse der SGN-Zellkulturuntersuchungen nach einer Kultivierung von zwei Tagen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Glykolsäure inkubiert. Zusätzlich sind die Ergebnisse der Kontrollen dargestellt (Positiv Kontrolle: BDNF mit $c_{BDNF} = 50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, FCS; Negativ Kontrolle: Medium). Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt ($N = 3$, $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mithilfe der einfachen ANOVA mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (n.s. = nicht signifikant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Die Sternchen über den Balken geben die Signifikanz der Überlebensrate der verschiedenen Konditionen im Vergleich zum Medium (ohne Serum) an. Die Glykolsäure übt keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs aus.

Die Grafik zeigt den erwarteten positiven Effekt des BDNFs sowie FCS auf die Überlebensrate der SGN.^[416] Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist ebenfalls zu erkennen, dass die verwendeten Mengen an Glykolsäure keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate der SGNs im Vergleich zu der Medium-Kontrolle ausmachen. Somit kann geschlossen werden, dass sie keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs haben. Diese Resultate sind zum einen von Bedeutung, da die Neuriten der SGNs in der CI-Anwendung an den Polymerfasern, u. a. aus Glykolsäure, entlangwachsen und somit direkt mit diesen in Kontakt treten. Zudem lösen sich die degradierbaren Fasern mit der Zeit auf, sodass verschiedene Mengen an Glykolsäure in gelöster Form die SGNs erreichen und mit ihnen wechselwirken können. Die verwendeten Fasern erscheinen nach den vorliegenden Ergebnissen im Hinblick auf die enthaltene Glykolsäure somit für eine Anwendung an den SGNs passend zu sein.

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven Effekt der BDNF-beladenen Fasern auf SGNs**

Für ihre beabsichtigte Anwendung im Rahmen des Cochlea-Implantats ist es wichtig zu testen, ob die Polymerfasern ein geeignetes Trägersystem für die sichere und wirksame Abgabe von

Neurotrophinen an das Innenohr bieten. Somit wurde in weiteren Zellkulturexperimenten anschließend untersucht, welchen Effekt die mit BDNF-beladenen Fasern auf die SGNs ausüben. Wie zuvor beschrieben, sollen die Neuriten in direktem Kontakt an diesen Fasern zur Oberfläche des Implantats hinwachsen. Dazu wurde zu je einem Well mit SGNs eine un- oder amino-modifizierte Faser mit bzw. ohne HS und BDNF gegeben. Es folgte eine Inkubation für 48 h bei 37 °C sowie eine anschließende Bestimmung der Überlebensrate der Neurone. Während dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 graphisch dargestellt.

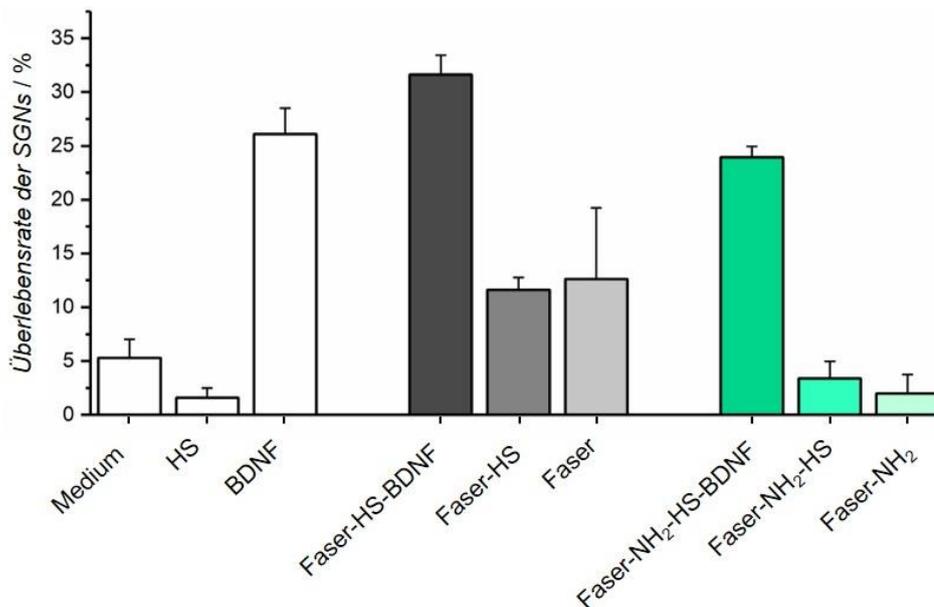


Abbildung 62: Ergebnisse der SGN-Zellkulturuntersuchungen nach einer Kultivierung von zwei Tagen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Fasertypen inkubiert (unmodifiziert sowie amino-modifiziert mit / ohne HS und BDNF). Zusätzlich sind die Ergebnisse der Kontrollen dargestellt (Positiv Kontrolle: BDNF mit $c_{\text{BDNF}} = 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; Negativ Kontrolle: Medium; HS). Es sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt ($N = 1, n = 3$). Die Überlebensrate der SGNs ist erhöht, wenn diese in Kontakt mit Fasern kommen, welche mit BDNF beschichtet wurden.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Grafik zeigen, dass die Überlebensrate der SGNs erhöht ist, wenn diese mit BDNF-beladenen Fasern in Kontakt kommen. Die erhaltenen Überlebensraten liegen im Bereich der Positiv-Kontrolle ($26.1 \pm 2.4 \%$). Somit weisen die SGN, welche in Kontakt mit den unmodifizierten Fasern mit HS und BDNF kamen, eine Überlebensrate von $31.6 \pm 1.8 \%$ auf. Die Neurone, welche in Kontakt mit den amino-modifizierten Fasern mit HS und BDNF kamen, besitzen eine Überlebensrate von $24.0 \pm 1.0 \%$. Die Überlebensraten der zugehörigen Kontrollen fallen niedriger aus. Sie liegen im Bereich der Medium-Kontrolle ($5.3 \pm 1.7 \%$). Hieraus kann ein neuroprotektiver Effekt des BDNFs, abgegeben von den Polymerfasern, geschlossen werden. Es ist anzunehmen, dass das BDNF ähnlich zu den *Release*-Versuchen in PBS auch im Zellmedium von den Fasern freigesetzt werden konnte und dass ein direkter *Release* in Gegenwart von SGNs einen positiven Einfluss auf ihre Überlebensrate hat. In Anlehnung an die Freisetzungsexperimente in PBS würden von den un- sowie amino-modifizierten Fasern während der zweitägigen Inkubation ca. $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ an BDNF in

das umgebende Medium freigesetzt werden (vgl. Abbildung 59). Die hieraus erhaltenen Überlebensraten der SGNs sind jedoch vergleichbar mit der Positiv-Kontrolle, bei der jedoch $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF verwendet wurden. Möglicherweise hat das Zellkulturmedium einen Einfluss auf die Menge des freigesetzten BDNFs und fördert dessen Abgabe, sodass mehr Wirkstoff freigesetzt worden sein könnte als zunächst angenommen. Zusätzlich kann auch die geringfügige Freisetzung von HS von den Fasern ein möglicher Grund für dieses positive Ergebnis sein (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 51). Aufgrund früherer Untersuchungen kann ein synergetisch positiver Effekt der Kombination aus HS und BDNF auf Neurone angenommen werden.^[102] Es wäre zudem denkbar, dass das von den Fasern freigesetzte BDNF effektiver auf die Neurone wirken kann, da es durch HS stabilisiert wird und dies einer möglichen Denaturierung des Proteins entgegenwirkt.^[93–96,160,179–181] Denaturiertes BDNF wäre für die Zellen unbrauchbar. Die Positivkontrolle enthält kein HS. Möglicherweise liegt hier zwar immunologisch aktives BDNF vor, welches mittels ELISA nachgewiesen werden kann, jedoch nicht mehr effektiv gegenüber Zellen wirkt. Das Vorhandensein von HS allein in der vorliegenden Konzentration hat nach diesen Ergebnissen keine neuroprotektive Wirkung auf die SGN. Von einer unmodifizierten sowie amino-modifizierten Faser werden nach vorherigen Experimenten nach 48 h in etwa $11 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an HS freigesetzt (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 51). Weiterhin weisen die Kontrollen der amino-modifizierten Fasern (Faser-NH₂-HS: $3.4 \pm 1.6 \%$, Faser-NH₂: $2.0 \pm 1.7 \%$) eine geringere Überlebensrate der Neurone auf als die Kontrollen der unmodifizierten Fasern (Faser-HS: $11.6 \pm 1.1 \%$, Faser: $12.6 \pm 6.6 \%$). Es ist zu vermuten, dass der Effekt durch die sich ablösende Amino-Modifizierung hervorgerufen wird (siehe Kapitel 4.1.2).^[445] Die Glykolsäure selbst, ein Hauptbestandteil der Faser, übt keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der Neurone aus (siehe Abbildung 61).

Insgesamt ist aus den vorliegenden Ergebnissen zu erkennen, dass die BDNF-beladenen Fasern im direkten Kontakt mit den im Innenohr ansässigen SGNs deren Überlebensrate erhöhen. Da diese Zellen jedoch erst mit der Zeit Neuriten ausbilden, welche anschließend zu den Fasern beziehungsweise zum Implantat hingelenkt werden müssen, ist zusätzlich die Wirkung von freigesetztem BDNF auf die SGNs von Bedeutung.

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroprotektiven Effekt des freigesetzten BDNFs auf SGNs**

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wurden ergänzend Spiralganglienzellkulturen mit Überständen aus den Freisetzungstudien der Fasern durchgeführt. Somit kann der neuroprotektive Effekt individuell für verschiedene Zeitschritte der Freisetzung bewertet werden. Die Wirkung der freigesetzten Substanz wird dann durch die Untersuchung der Überlebensrate und der Neuritenlänge der SGNs bewertet. Die Spiralganglienzellen wurden zwei Tage lang in einer 1:1-Mischung aus serumfreiem SGN-Medium und den gesammelten Überständen kultiviert, die aus Freisetzungsexperimenten mit un- sowie amino-modifizierten Fasern erhalten

wurden, welche entweder mit BDNF beladen waren oder nicht. Nach der Inkubationszeit wurden mikroskopische Bilder aufgenommen (siehe Abbildung 63).

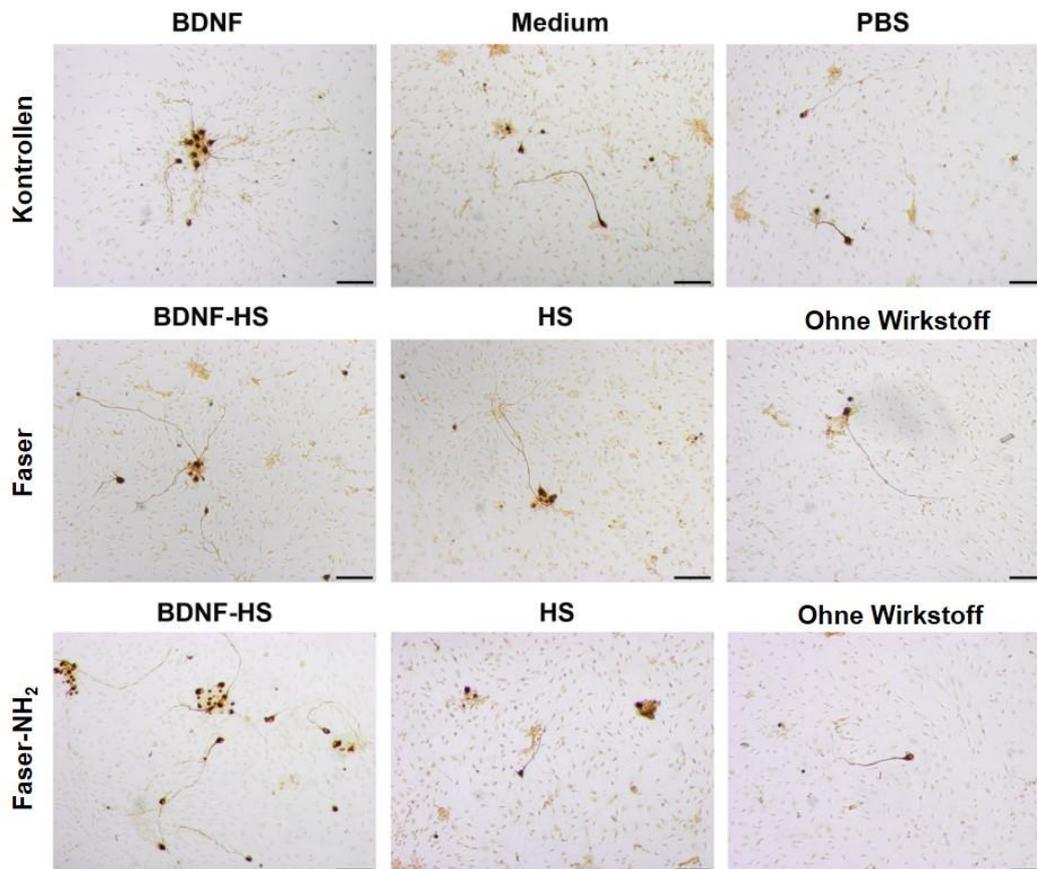


Abbildung 63: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Spiralganglienzellkulturen unter Verwendung der Überstände der zwei verschiedenen Fasertypen vom ersten Tag der Freisetzungsexperimente. Die SGNs werden als überlebend betrachtet, wenn ein Neurit mit einer Länge von mindestens drei Somagrößen aus dem Zell-Soma herausgewachsen ist (Maßstab: 100 μm). Es ist eine höhere Anzahl an SGNs zu erkennen, wenn diese zuvor mit BDNF in Kontakt kamen.

Die aufgenommenen Bilder zeigen Unterschiede hinsichtlich des neuronalen Überlebens und des Neuritenwachstums. Zellen, die in Gegenwart der Überstände von den BDNF-beladenen Fasern (un- sowie amino-modifiziert) kultiviert wurden, weisen eine hohe Anzahl überlebender Neuronen mit herauswachsenden Neuriten auf. Im Gegensatz dazu können in Zellkulturen mit Überständen, die von den unbeladenen Fasern (ohne BDNF) stammen, weniger Neuronen mit entwickelten Neuriten gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Quantifizierung der Überlebensraten der SGNs erhalten (siehe Abbildung 64 a); numerische Daten sind in Tabelle 10 im Anhang zu finden).

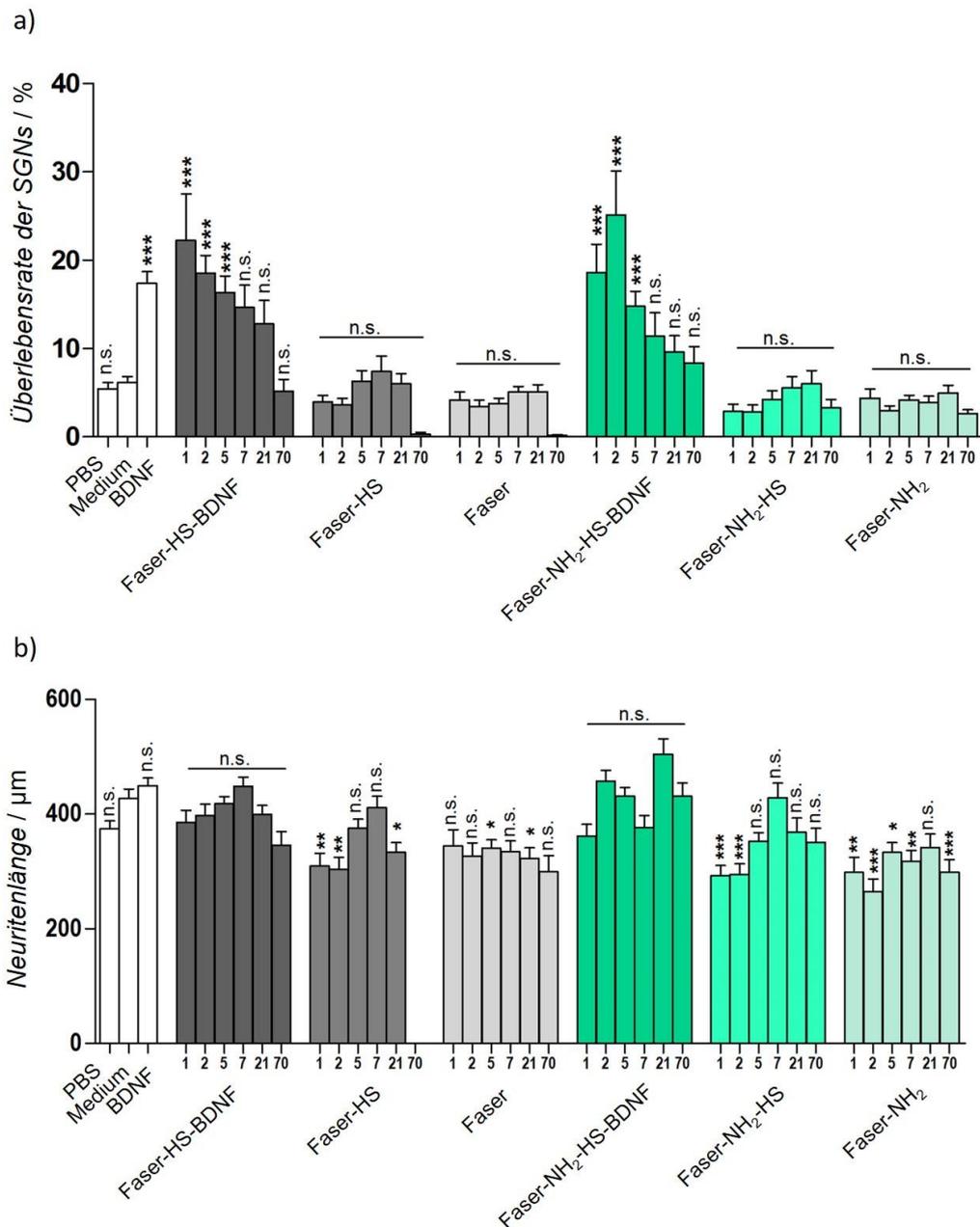


Abbildung 64: Ergebnisse der Zellkulturstudien mit Spiralganglienzellen nach zwei Tagen der Kultivierung. Die Zellen wurden mit den Überständen aus den Freisetzungsexperimenten der unmodifizierten (graue Säulen) oder amino-modifizierten (grüne Säulen) Fasern inkubiert. Die Ergebnisse der Fasern, welche sowohl BDNF als auch HS tragen, sind in den dunkelsten Farben dargestellt. Dahingegen weisen die Ergebnisse der Fasern, welche nur HS tragen, mittlere Farbtöne auf und diejenigen, die nicht weiter modifiziert wurden, sind im hellsten Farbton dargestellt. Die Werte für die Kontrollen werden als weiße Spalten (PBS und Medium als Negativkontrolle, Medium mit zugesetztem BDNF ($c_{BDNF} = 50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) als Positivkontrolle). (a) Überlebensraten der SGNs (b) Neuritenlängen überlebender SGN. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben ($N = 3$, $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mithilfe der einfachen ANOVA mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest durchgeführt (n.s. = nicht signifikant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Die Sternchen über den Balken geben die Signifikanz der Überlebensrate der verschiedenen Konditionen im Vergleich zum Medium (ohne Serum) an. Die Überlebensraten der SGNs sind erhöht, wenn sie mit Überständen von BDNF-tragenden Fasern inkubiert wurden. Dahingegen zeigt BDNF keinen signifikant positiven Einfluss auf die Länge der Neuriten.

Die Überlebensraten der SGN, welche mit BDNF-Überständen in Berührung kamen, ist erhöht im Gegensatz zu denjenigen der Kontrollfasern ohne BDNF-Beladung. Dies zeigt, dass das aus beiden Fasertypen freigesetzte BDNF eine deutliche neuroprotektive Wirkung ausübt. Die

Überlebensrate der SGNs ist für die ersten drei getesteten Zeitpunkte ($\approx 19\%$) im Vergleich zu den Medium- und PBS-Kontrollen (letztere ist die Lösung, in der die Freisetzungsexperimente durchgeführt wurden) ($\approx 6\%$) signifikant erhöht. Selbst in dem Zeitraum zwischen 7 und 70 Tagen nach Beginn der Freisetzung, in dem die freigesetzten Mengen an BDNF kleiner werden, ist die Überlebensrate der SGNs im Vergleich zu den Negativkontrollen erhöht. Für die ersten drei Zeitpunkte (Tag 1 bis 5) zeigen die Ergebnisse sowohl für die un- als auch für die amino-modifizierten Fasern mit BDNF praktisch die gleiche Überlebensrate wie sie bei der Positivkontrolle ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ BDNF, $\approx 17\%$) erhalten wurde. Wie zuvor schon beschrieben, kann ein Grund für dieses positive Ergebnis die zusätzliche HS-Freisetzung von den Fasern sein, die zuvor schon nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 51). Der synergetisch positive Effekt der Kombination von HS und BDNF auf Neurone kann aufgrund früherer Untersuchungen angenommen werden.^[102]

Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass die tatsächlich vorhandene Menge an BDNF einen proportionalen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs ausübt. Da zu den ersten Zeitpunkten mehr BDNF von den Fasern freigesetzt wird (siehe Abbildung 59), zeigt auch die SGN-Überlebensrate in diesen Fällen höhere Werte. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die SGN-Überlebensraten bei den unmodifizierten Fasern im Vergleich zu denen der amino-modifizierten Fasern geringfügig höher ausfallen. Es wird etwas mehr BDNF von den nicht modifizierten Fasern freigesetzt (siehe Abbildung 59). Daneben könnte auch die Stabilität des Neurotrophins eine wichtige Rolle spielen. Bei Verwendung von BDNF-Überständen, die nach einem längeren Zeitraum gesammelt wurden, wurde das BDNF für eine längere Zeit bei 37°C inkubiert, was seine Konformation und biologische Aktivität beeinträchtigen könnte.^[442] Somit ist es möglich, dass zu späteren Zeitpunkten erhaltene Überstände weniger biologisch aktiven BDNF enthalten und somit die neuroprotektive Wirkung geringer ist. Beim Vergleich aller Ergebnisse fallen die sehr niedrigen SGN-Überlebensraten erhalten mithilfe der Überstände, die nach 70 Tagen von den unmodifizierten Fasern gesammelt wurden. Alle Überlebensraten, die für die drei verschiedenen Subtypen unmodifizierter Fasern beobachtet wurden, sind im Vergleich zu denen, die zu früheren Zeitpunkten erhalten wurden, sehr niedrig. Die Probe, die in Kontakt mit den Überständen der unmodifizierten Fasern mit HS und BDNF kam, erreichte mindestens den Wert der Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu überleben praktisch keine SGNs in Gegenwart von Überständen, die von völlig unbeladenen oder aber lediglich mit HS beladenen Fasern stammen. Als Grund für die niedrige Überlebensrate der SGNs unter diesen Bedingungen kann der niedrige pH-Wert der Überstände nach 70 Tagen aufgrund des hydrolytischen Abbaus der Fasern gesehen werden. Dazu stellt Abbildung 65 die gemessenen pH-Werte der *Release*-Lösungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern dar.

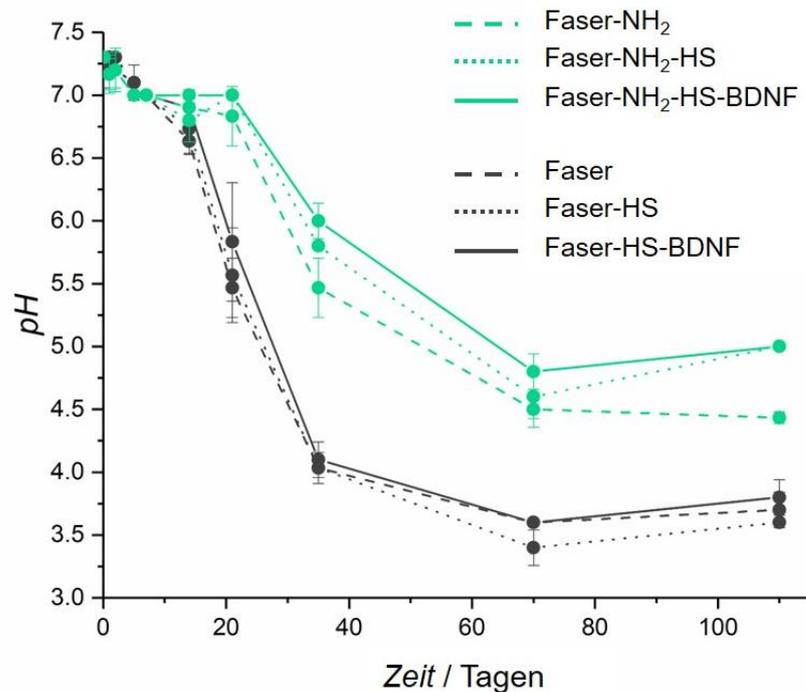


Abbildung 65: Graphische Darstellung der pH-Werte der Release-Lösungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern mit bzw. ohne HS und BDNF. Die pH-Werte aller *Release*-Lösungen sinken mit fortschreitender Zeit ab, wobei die unmodifizierten Fasern ein stärker saures Milieu erzeugen als die amino-modifizierten Fasern.

Ähnlich zu den Degradationsversuchen (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 41) zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die pH-Werte aller *Release*-Lösungen mit fortschreitender Zeit absinken. Es ist zu erkennen, dass sowohl HS als auch BDNF keinen Einfluss auf den umgebenden pH-Wert ausüben. Während des Degradationsprozesses werden saure Produkte wie (Hydroxy)-Carbonsäuren in die Lösung freigesetzt und senken den pH-Wert.^[299,426] Phenolrot, ein pH-Wert-Indikatorfarbstoff, der im Kulturmedium für die Spiralganglienzellen enthalten ist, zeigt eine Farbänderung von rot nach gelb. Es ist bekannt, dass neuronale Zellen in saurem Medium nicht lange überleben und eine gut gepufferte physiologische Umgebung mit einem neutralen pH-Wert benötigen.^[446] Aufgrund des sehr geringen pH-Wertes der unmodifizierten Fasern nach 70 Tagen von 3.6 können die SGNs hier somit nicht überleben. Dieser Effekt kann bei den amino-modifizierten Fasern nicht beobachtet werden, da die basischen Aminogruppen auf der Oberfläche der Fasern, welche vermutlich ebenfalls im Laufe der Zeit freigesetzt werden, den sauren Gruppen entgegenwirken.

Die gemessenen Neuritenlängen der überlebenden SGNs zeigten vergleichbare Werte für alle Proben und liegen zwischen 300 und 500 μm (Abbildung 64 b). Insbesondere gibt es keinen offensichtlichen positiven Einfluss von BDNF auf die Länge der Neuriten. Es ist lediglich zu beobachten, dass die Neuritenlängen der Kontrollen vermehrt signifikant erniedrigt sind gegenüber der Medium-Kontrolle. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Beobachtungen zu einem BDNF-Freisetzungssystem auf Basis nanoporöser Silica-Nanopartikel.^[59] Im Allgemeinen ist bekannt, dass BDNF einen starken neuroprotektiven Einfluss hat, der dem Abbau von Neuronen entgegenwirkt.^[44,59,447]

Die vorliegenden Ergebnisse liefern eine Grundlage für spätere Anwendungen von BDNF-beladenen Fasern. Insgesamt übt das aus beiden Fasertypen freigesetzte BDNF eine deutliche neuroprotektive Wirkung auf SGNs aus. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an BDNF einen Einfluss auf die SGN-Überlebensrate hat. Nichtsdestotrotz haben auch kleinere Mengen an freigesetztem BDNF einen Effekt auf die Überlebensrate der SGN. Außerdem werden die vorliegenden Ergebnisse durch frühere Studien bestätigt. Diese zeigen, dass biologisch aktives BDNF aus Glycosaminoglycan-Strukturen freigesetzt werden kann.^[27,97] Zusätzlich ist eine neuroprotektive Wirkung von geringen Mengen (ng/pg Bereich) an freigesetztem BDNF gegenüber SGNs *in vitro* und *in vivo* zu beobachten.^[52,53,59] Auch BDNF, das von Heparin-beschichteten Poly-(L-Glutaminsäure) -Partikeln im Innenohr eines Meerschweinchens abgegeben wurde, führte zu einem verbesserten neuronalen Überleben.^[27]

***In vitro*-Untersuchungen zum neuroregenerativen Effekt der mit BDNF-beladenen Fasern auf SGN-Strangstücke**

Wie in den vorherigen Versuchen erfolgreich gezeigt wurde, dient das BDNF dem Überleben der SGN. Diese Funktion soll es in Zukunft im Rahmen des CIs erfüllen. Zusätzlich ist es das Ziel des vorliegenden Projekts, auch die Neuritenausprossung der SGNs zur Oberfläche des Implantats hin anzuregen. Da vergangene Studien darauf hinweisen, dass BDNF zusätzlich das Auswachsen der Neuriten fördert,^[41,43,44,54] wurden weitere Zellkulturuntersuchungen durchgeführt, um diesen Effekt genauer zu analysieren. In diesem Zuge wurde ebenfalls untersucht, inwieweit BDNF einen richtungsweisenden Effekt auf die Neuriten der SGNs ausübt. Wie WARNECKE *et al.*^[102] zeigten, kann sich die simultane Behandlung von SGN-Strangstücken mit HS und BDNF additiv auf den Neuritenauswuchs auswirken, sodass auch dieser Effekt in den vorliegenden *in vitro*-Versuchen untersucht wurde. Dazu wurden SGN-Strangstücke in Anwesenheit von beladenen Fasern kultiviert, wobei verschiedene Versuchsaufbauten verwendet wurden.

Hierbei erfolgten die ersten Untersuchungen in einer Petrischale. Dazu wurden gegenüberliegend an den Rand der Petrischale zwei beschichtete Fasern geklebt. Genutzt wurde hierfür medizinisches Wachs. Es handelte sich bei den verwendeten Fasern um unmodifizierte Polymerfasern. Eine der Fasern war mit BDNF und HS beschichtet, wohingegen die andere Faser lediglich mit HS bedeckt war. Die Mitte der Petrischale wurde mit jeweils 4-5 Spiralganglienstrangstücken besetzt. Da das BDNF, wie zuvor gezeigt, kontinuierlich von den Fasern freigesetzt wird, war es Ziel dieses Versuchsaufbaus, den Effekt des Wirkstoffs auf die SGN-Strangstücke zu untersuchen. Es sollte einerseits herausgefunden werden, ob ein Neuritenauswuchs generiert werden kann. Weiterhin interessierte, ob ein möglicher Konzentrationsgradient des BDNFs das Wachstum der Neuriten in Richtung auf die mit dem Wirkstoff beladene

Faser lenkt. Der zugehörige Versuchsaufbau sowie die resultierenden Zellbilder nach der Kultivierung für 48 h bei 37 °C sind in Abbildung 66 zu sehen.

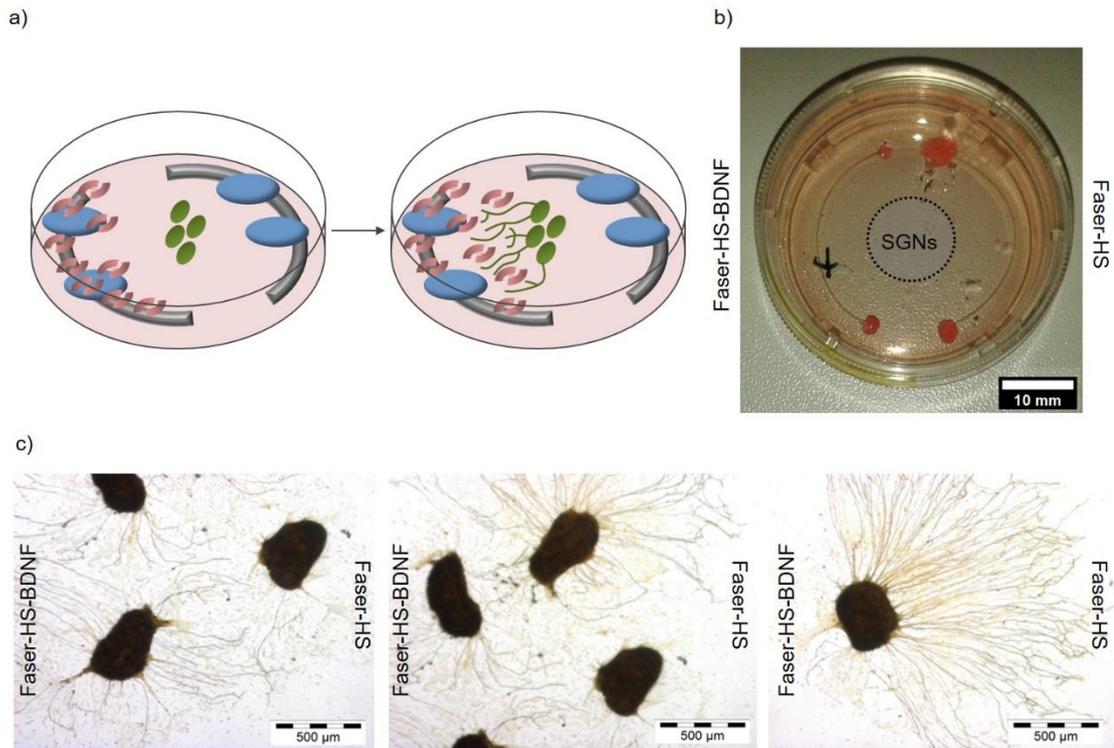


Abbildung 66: Versuchsaufbau der Zellkulturuntersuchungen sowie resultierende Zellbilder. a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit anschließend erwartetem Ergebnis der *in vitro*-Untersuchungen. Neben den unmodifizierten Fasern (grau) sind die Beschichtungen mit HS (blau) und BDNF (rot) zu sehen. Zudem sind in der Mitte des Aufbaus die SGN-Strangstücke (grün) dargestellt. Bei Freisetzung des BDNFs wird eine Neuritenausprossung in Richtung des Konzentrationsgradienten erwartet. Dies ist schematisch im rechten Teil der Abbildung dargestellt. b) Fotografie des tatsächlichen Versuchsaufbaus. c) Repräsentative Fotografien der Ergebnisse der durchgeführten Zellkulturuntersuchungen. Es sind auf allen Bildern ausgewachsene Neuriten zu erkennen, die jedoch keine spezifische Orientierung aufweisen.

Auf den Zellbildern ist deutlich zu erkennen, dass bei allen SGN-Strangstücken Neuriten ausgewachsen sind. Dies kann zum einen auf den Wirkstoff BDNF zurückgeführt werden, welcher das Auswachsen von Neuriten fördert.^[41,43,44,54] Zum anderen kann aber auch das HS die Neuritenausprossung unterstützen.^[102,170,171] Möglicherweise hat sich auch die simultane Behandlung der Strangstücke mit BDNF und HS additiv auf das Neuritenwachstum ausgewirkt.^[102] Entgegen den Erwartungen (siehe Abbildung 66 a) ist jedoch kein Wachstum der Neuriten in Richtung der mit BDNF beschichteten Faser zu beobachten. Anstatt dessen sprießen die Neuriten in alle Richtungen aus. Möglicherweise ist dies auf den zu geringen Effekt des BDNFs, richtungsweisendes Neuritenwachstum zu fördern, zurückzuführen. Schon in vorangegangenen Studien wurde diese Fähigkeit eher dem NT-3 zugeschrieben.^[250,251] Zusätzlich kann die Konzentration des BDNFs zu gering sein, um einen solchen Effekt auszulösen. Weiterhin könnte sich auch einfach wegen der zu schneller Diffusion kein merklicher BDNF-Gradient in Richtung der beladenen Faser aufgebaut haben. Anstatt dessen könnte sich der Wirkstoff schnell in der gesamten Petri-Schale verteilt haben. Unterstützt wurde dies möglicherweise durch die leicht erhöhte Lagerungstemperatur von 37 °C und die damit einhergehende

erhöhte Brownsche Molekularbewegung. Bis auf den anfänglichen Transport werden die Petrischalen während der Inkubation jedoch nicht bewegt. Zudem kann aber auch die zweite, lediglich mit HS beschichtete Faser ebenfalls einen Effekt auf die Neuritenaussprossung ausüben^[102,170,171] und dazu geführt haben, dass die einzelnen Nervenstränge in alle Richtungen ausgewachsen sind. Aufgrund dessen wurden die vorangegangenen Versuche nicht mit den amino-modifizierten Fasern wiederholt. Anstatt dessen wurde ein modifizierter Zelltest angeschlossen, um den möglichen, richtungsweisenden Effekt des BDNFs sowie die Rolle des HS spezifischer zu untersuchen. Hierbei wurde lediglich eine Faser in eine dafür vorgesehene Teflonhalterung gespannt. Diese war später in der Petrischale an der Seite platziert. Hierdurch konnten die einzelnen Versuche vergleichbarer durchgeführt werden. Hinzu kam, dass der Effekt jeder einzelnen Modifizierung auf die SGN-Strangstücke getrennt voneinander beobachtet werden konnte und es keine gegenseitigen Beeinflussungen gab. Auch diesmal wurde die Petrischale in der Mitte mit 4-5 Strangstücken beschichtet und für 48 h bei 37 °C kultiviert. Der Versuchsaufbau sowie die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen mit den beschichteten sowie unbeschichteten un- und amino-modifizierten Polymerfasern sind in Abbildung 67 dargestellt.

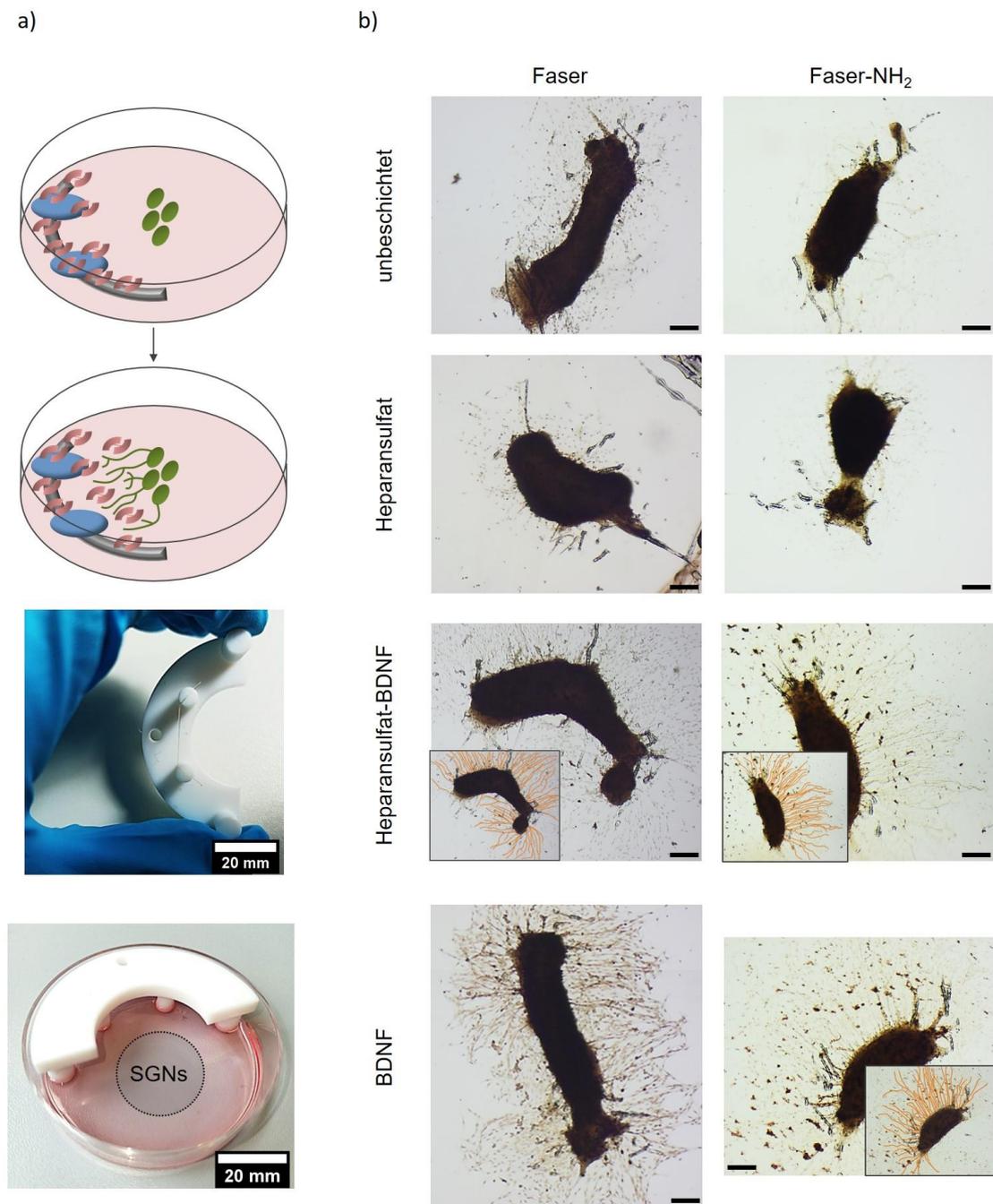


Abbildung 67: Versuchsaufbau der Zellkulturuntersuchungen sowie resultierende Zellbilder. a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit dem erwarteten Ergebnis der *in vitro*-Untersuchungen (oben). Neben der Faser (grau) sind die Beschichtungen mit HS (blau) und BDNF (rot) zu sehen. Zudem sind in der Mitte des Aufbaus die SGN-Strangstücke (grün) dargestellt. Bei Freisetzung des BDNFs wird eine Neuritenausprossung in Richtung des Konzentrationsgradienten erwartet. Zudem ist die Teflonhalterung mit eingesetzter Faser in der Zellkulturschale zu sehen (unten). b) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ergebnisse der durchgeführten Zellkulturuntersuchungen. Es sind die Ergebnisse für die un- sowie die amino-modifizierten Fasern mit bzw. ohne Beschichtung dargestellt (Maßstab: 200 µm). Da die Färbung der Neuriten bei einigen Bildern kaum zu erkennen ist, wurden diese manuell nachgezeichnet. Die modifizierten Aufnahmen sind den zugehörigen Originalbildern angehängt. Entsprechend des schematischen Aufbaus (a, oben) befindet sich die Faser jeweils auf der linken Seite des SGN-Strangstückes. Die Fotografien der Strangstücke, welche in Anwesenheit von BDNF-Fasern (mit /ohne HS) kultiviert wurden, zeigen viele ausgewachsene Neuriten. Diese weisen jedoch keine spezifische Orientierung auf.

Auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturuntersuchungen ist jeweils 1 Strangstück, welches in Anwesenheit der (un)beschichteten un- bzw. amino-modifizierten Faser kultiviert wurde, abgebildet. Hierbei ist zu erkennen, dass auf den Zellbildern der un- sowie

amino-modifizierten Fasern ohne BDNF kaum bzw. keine Neuriten ausgewachsen sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Aufnahmen der Strangstücke, welche in Anwesenheit der BDNF-Fasern kultiviert wurden, eine große Anzahl an ausgewachsenen Neuriten. Da bei einigen dieser Bilder die Anfärbung der Neuriten sehr schwach ausfällt und diese daher kaum zu erkennen sind, wurden die Neuritenfasern im Nachhinein manuell nachgezeichnet. So können genauere Aussaugen zu den Bildern getroffen werden. Die modifizierten Aufnahmen mit den visualisierten Neuriten sind den ursprünglichen Bildern angehängt. Somit zeigen die Aufnahmen den positiven Effekt des von den Fasern freigesetzten BDNFs auf die neuronale Regeneration.^[41,43,44,54] In vorangegangenen Studien zeigten SCHULZE *et al.*^[102] ebenfalls, dass der verwendete Wachstumsfaktor die Aussprossung der Neuriten von SGN-Strangstücken fördert. Im Gegensatz dazu weist das HS allein in den vorliegenden Versuchen keinen Effekt auf das Auswachsen der Neuriten auf, obwohl Studien belegen, dass auch das Glykosaminoglykan neuroregenerativ wirken kann.^[102,170,171] Möglicherweise liegt die in unseren Versuchen vorhandene Konzentration des HS, das ja kovalent an die Faser angebunden und nur in sehr geringem Maße freigesetzt wurde, nicht im effektiven Wirkungsbereich. SCHULZE *et al.*^[102] zeigten, dass HS allein nur eine sehr geringe Wirkung auf das Auswachsen der Neuriten ausübt. Sie nutzen jedoch mindestens $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ an HS, wohingegen von der vorliegenden Faser nach vorangegangenen Experimenten lediglich $\approx 10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des Biomoleküls nach 2 Tagen freigesetzt (siehe Abbildung 51) und so den SGNs zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich konnten SCHULZE *et al.*^[102] in ihren Untersuchungen den additiven Effekt von HS und BDNF auf die Anzahl der ausgewachsenen Neuriten präsentieren. Dieser kann in den vorliegenden Zellkulturuntersuchungen nicht festgestellt werden. Möglicherweise liegt dies wiederum an der äußerst geringen Menge des Glykosaminoglykans. Im Gegensatz zu den $\approx 10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ HS in den vorliegenden Versuchen haben SCHULZE *et al.*^[102] in ihren Versuchen zum additiven Effekt $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ an HS eingesetzt. Möglicherweise müssen die Neuriten, wie im weiteren Verlauf des Projekts angedacht, direkt an den Fasern entlangwachsen, um einen Effekt des HS zu erfahren. Auch aufgrund der unterschiedlichen Art der BDNF-Freisetzung von den Fasern mit bzw. ohne HS hätte vermutet werden können, dass die Wirkung auf die Zellen verschieden ausfällt. Während die Fasern mit Glykosaminoglykan länger andauernd kontinuierlich BDNF freisetzen, wird von den Fasern ohne HS gleich zu Anfang fast die gesamte Menge des Wachstumsfaktors in einem *burst-Release* abgegeben. Möglicherweise fällt die Freisetzung in dem veränderten Medium sowie in der Zellkulturanordnung anders aus, als dass sie im Eppendorf-Tube in PBS stattgefunden hat. Zukünftige *Release*-Untersuchungen unter veränderten Bedingungen könnten hier Aufschluss geben. Es kann weiterhin vermutet werden, dass die Gesamtmenge an freigesetztem BDNF bzw. der Unterschied in der Menge an abgegebenen BDNF zwischen den beiden Fasertypen (mit bzw. ohne HS) zu gering ist, um eine veränderte Wir-

kung auf die SGNs auszuüben, auch da die Versuchsdauer kurz ist und der im Prinzip vorteilhafte lang anhaltende Release von den HS-beschichteten Fasern gar nicht zum Tragen kommt. Während laut ELISA von den unmodifizierten Fasern mit HS innerhalb von 48 h in etwa 1 ng an BDNF abgegeben wurden, zeigten die Versuche der unmodifizierten Fasern ohne HS einen Wert von 1.8 ng an freigesetztem BDNF an. Von den amino-modifizierten Fasern mit HS wurden in der Zeit 1 ng BDNF abgegeben, wohingegen die Fasern ohne HS 0.8 ng an BDNF freisetzen (siehe Abbildung 59). Möglicherweise würde ein stärkerer Effekt zu erkennen sein, wenn eine größere Menge an Fasern verwendet wird. Da sich der Unterschied in der BDNF-Freisetzung erst nach einer längeren Zeit deutlicher aufzeigt (ab Tag 10) wären zudem langanhaltende Zellkulturuntersuchungen bis zu 60 Tagen von Interesse, die allerdings mit SGNs kaum zu verwirklichen sind. So könnte die durch HS hervorgerufene veränderte BDNF-Freisetzung ebenfalls in den Zellkulturuntersuchungen sichtbar werden. Als zusätzlicher Aspekt ist die biologische Aktivität von BDNF zu nennen. Da HS stabilisierend wirkt,^[93–96,160,179–181] kann vermutet werden, dass in diesen Fällen auch biologisch aktiveres BDNF von den Fasern freigesetzt und den Zellen zur Verfügung gestellt wird. Die Wirkung müsste ebenfalls steigen. Da die Versuche jedoch lediglich eine Inkubationszeit von 2 d aufweisen und BDNF erst nach 7 d merklich an biologischer Aktivität verliert,^[165] kann vermutet werden, dass zu diesem Zeitpunkt kaum ein Unterschied in der Aktivität des Proteins auszumachen ist.

Wenn nun die Ergebnisse verglichen werden, welche mit den un- und amino-modifizierten BDNF-beladenen Fasern erhalten wurden, ist lediglich ein sehr geringer Unterschied zu erkennen. Die erhaltenen Zellkulturaufnahmen zeigen sehr ähnliche Resultate. Es erscheint, als ob bei den unmodifizierten Fasern geringfügig mehr Neuriten ausgewachsen sind als es bei den amino-modifizierten Fasern der Fall ist. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass von den unmodifizierten Fasern mehr BDNF freigesetzt wird (siehe Abbildung 59). Somit ist zu vermuten, dass eine größere Menge des Wachstumsfaktors einen stärkeren neuroregenerativen Effekt ausübt. Da der Unterschied in der freigesetzten BDNF Menge von den un- und amino-modifizierten Fasern laut ELISA (siehe oben) jedoch sehr gering ausfällt, ist auch nur ein geringfügig anderer Effekt gegenüber den Zellen zu beobachten. Um diesen Effekt sowie die vorliegende *Release*-Situation genauer zu untersuchen, wären, wie schon genannt, ebenfalls zusätzliche Freisetzunguntersuchungen sowie eine Nutzung von größeren Faser-Mengen sowie eine längere Inkubationszeit sinnvoll. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass es immer zu einer spontanen Aussprossung von Neuriten kommen kann, welches in der Vergangenheit des Öfteren beobachtet wurde. Weiterhin hat auch die Größe des Strangstückes einen Einfluss auf die Anzahl der aussprossenden Neuriten. Je größer das Strangstück ist, umso höher ist die Anzahl der Zellsoma, aus denen Neuriten sprießen können. Somit können die vorangegangenen Annahmen lediglich vermutet werden. Die vorliegenden Ergebnisse liefern insofern zwar bedeutsame, letztlich aber lediglich qualitative Aussagen.

Weiterhin zeigt das BDNF trotz seiner neuroregenerativen Wirkung in den vorliegenden Untersuchungen keinen richtungsweisenden Effekt auf die ausgewachsenen Neuriten. Dies geht mit vorangegangenen Untersuchungen einher, welche diesen Effekt eher dem NT-3 als dem BDNF zuschreiben.^[250,251] Gegebenenfalls hat sich der Wirkstoff jedoch auch zu sehr in der Zellkulturschale verteilt, sodass sich kein Gradient ausbildete, in dessen Richtung die Neuriten wachsen konnten. Möglicherweise liegt aber auch hier der Grund in der zu geringen Menge des verwendeten BDNFs. Aufgrund dessen wurden modifizierte Zellkulturuntersuchungen angeschlossen, in denen die Konzentrationen der Biomoleküle vergrößert wurde. Hierzu wurden anstatt einer Faser gleich 5 Fasern pro Versuch verwendet. Eingespannt in einer dafür vorgesehene Teflonhalterung wurden sie in eine Abteilung einer 6-Well-Platte gelegt. Aufgrund der geringeren Größe der neuen Zellkulturschale wurde lediglich 1/3 des ursprünglichen Volumens an Zellkulturmedium hinzugefügt. Zusammen mit der größeren Anzahl an Fasern müsste sich die Konzentration der Biomoleküle um das 15-fache erhöht haben. Zusätzlich wurde eine längere Inkubationszeit von 72 h gewählt, sodass die Strangstücke für eine längere Zeit mit den Biomolekülen in Kontakt kommen. Nun wurde untersucht, inwieweit sich dies auf die 4-5 SGN-Strangstücke, welche auf der anderen Seite des Wells platziert wurden, auswirkte. Dazu sind der Aufbau der Zellkulturuntersuchungen sowie die erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 68 dargestellt.

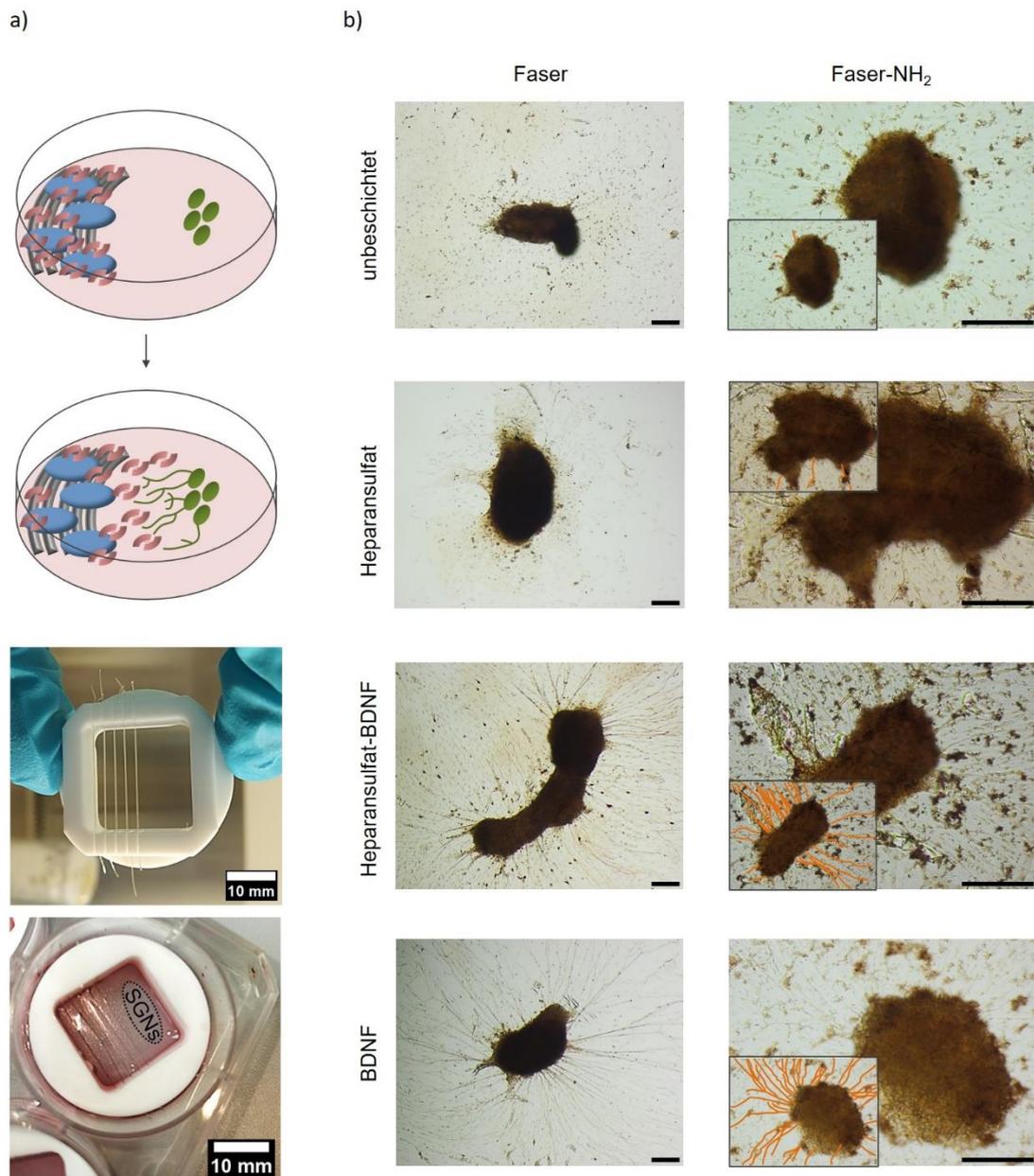


Abbildung 68: Versuchsaufbau der Zellkulturuntersuchungen sowie resultierende Zellbilder. a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Darstellung des erwarteten Ergebnisses der *in vitro*-Untersuchungen (oben). Neben den 5 Fasern (grau) sind die Beschichtungen mit HS (blau) und BDNF (rot) zu sehen. Zudem sind in der Mitte des Aufbaus die SGN-Strangstücke (grün) dargestellt. Bei Freisetzung des BDNFs wird eine Neuritenausprossung in Richtung des Konzentrationsgradienten erwartet. Zudem ist die Teflonhalterung mit eingesetzten Fasern in der Zellkulturschale zu sehen (unten). b) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ergebnisse der durchgeführten Zellkulturuntersuchungen (Maßstab: 200 µm). Es sind die Ergebnisse der un- sowie amino-modifizierten Fasern mit bzw. ohne Beschichtung dargestellt. Da die Färbung der Neuriten bei einigen Bildern kaum zu erkennen ist, wurden diese manuell nachgezeichnet. Die modifizierten Aufnahmen wurden an die zugehörigen Originalbilder angehängt. Entsprechend des schematischen Aufbaus (a, oben) befinden sich die Fasern jeweils auf der linken Seite des SGN-Strangstückes. Die Fotografien der Strangstücke, welche in Anwesenheit von BDNF-Fasern (mit /ohne HS) kultiviert wurden, zeigen ausgewachsene Neuriten. Diese weisen jedoch keine spezifische Orientierung auf.

Die Fotografien der Zellkulturuntersuchungen zeigen jeweils ein Strangstück, welches in Anwesenheit der fünf (un)beschichteten un- sowie amino-modifizierten Fasern kultiviert wurde. Entsprechend des schematischen Aufbaus waren die Fasern jeweils auf der linken Seite der Strangstücke platziert. Da die Anfärbung der Strangstücke bei den Versuchen mit den amino-modifizierten Fasern sehr schwach ausfällt und zusätzlich viele Zellreste im Medium farblich

markiert wurden, wurden die zugehörigen lichtmikroskopischen Aufnahmen mit einer höheren Vergrößerung aufgenommen. Zusätzlich wurden die ausgewachsenen Neuriten im Nachhinein farblich markiert, damit sie besser zu erkennen sind und genauere Aussagen über die Bilder getätigt werden können. Die modifizierten Aufnahmen wurden den Original-Bildern angehängen. Insgesamt ähneln sich die Ergebnisse beider Fasertypen sehr. Auf den Bildern der unbeschichteten und mit HS beschichteten Fasern sind kaum Neuriten aus den SGN-Strangstücken ausgewachsen. Dahingegen zeigen die Aufnahmen der Strangstücke, welche in Anwesenheit der BDNF-Fasern kultiviert wurden, eine große Anzahl an ausgewachsenen Neuriten. In Anlehnung an die vorherigen Versuche zeigt dies wiederum den neuroregenerativen Effekt des BDNFs auf die SGN-Strangstücke.^[41,43,44,54] Ähnlich zu den vorherigen Experimenten kann auch hier kein gerichtetes Wachstum der Neuriten zu den Fasern beobachtet werden. Möglicherweise kann dem BDNF somit kein richtungsweisender Effekt zugeschrieben werden,^[250,251] oder aber seine Konzentration ist immer noch zu gering, um dies zu beobachten. Möglicherweise konnte sich aber auch, wie zuvor schon beschrieben, aufgrund von Durchmischungen kein BDNF-Gradient ausbilden. Weiterhin konnte trotz der erhöhten Konzentration der Biomoleküle auch im Rahmen dieser Zellkulturuntersuchungen kein Effekt des HS auf das Auswachsen der Neuriten beobachtet werden, obwohl ihm diese Eigenschaft zugeschrieben wird.^[102,170,171] Sehr wahrscheinlich ist die Konzentration von freigesetztem Glykosaminoglykan noch deutlich zu gering, um eine Wirkung zu zeigen. Während die Arbeitsgruppe um WARNECKE^[102] einen Effekt des HS auf die Aussprossung der Neuriten bei einer verwendeten Konzentration von mindestens $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ beobachten konnte, können nach vorangegangenen Untersuchungen von den 5 Fasern im Rahmen dieser Arbeit nach 3 Tagen lediglich $\approx 75 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an HS freigesetzt und den SGNs zur Verfügung gestellt werden (siehe Abbildung 51). Dies kann wiederum als Grund angesehen werden, warum kein Unterschied in der Neuritenausprossung zu erkennen ist, wenn die Strangstücke in Anwesenheit der BDNF- oder der BDNF-HS-Fasern kultiviert wurden. Wie zuvor erwähnt, konnte in vorangegangenen Untersuchungen ein additiver Effekt der beiden Biomoleküle auf die Neuritenausprossung gezeigt werden, wobei hier sogar $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verwendet wurden.^[102] Es ist denkbar, dass die Neuriten für eine effektivere Behandlung, wie angedacht, direkt an den beschichteten Polymerfasern entlangwachsen müssen. Auf diese Weise kommen sie stärker mit dem HS in Kontakt, da dieses hauptsächlich fest an der Faseroberfläche anhaftet (siehe Kapitel 4.2). Die Versuche legen nahe, dass auch trotz der größeren Menge an verwendeten Fasern der Unterschied in der BDNF-Freisetzung zwischen den mit bzw. ohne HS beschichteten Fasern zu gering ist, um eine veränderte Zellwirkung zu zeigen. Wie zuvor beschrieben wären hier weitere Modifizierungen der Zellkulturuntersuchungen sinnvoll. Werden die Aufnahmen der Strangstücke, welche mit den BDNF-beschichteten un- sowie amino-modifizierten Fasern kultiviert wurden, miteinander verglichen, so ist auch hier kaum ein Unterschied zu erkennen.

Die Aufnahmen deuten darauf hin, dass im Falle der unmodifizierten Fasern geringfügig mehr Neuriten aus den Strangstücken auswachsen als im Falle der amino-modifizierten Fasern. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass von den unmodifizierten Fasern mehr BDNF freigesetzt wird (siehe Abbildung 59) als von den amino-modifizierten Fasern. Somit unterstützen die erhaltenen Ergebnisse die zuvor aufgestellte Vermutung, dass eine größere Menge an BDNF einen stärkeren Effekt auf die Anzahl der ausgewachsenen Neuriten ausübt. Die Freisetzung des Wirkstoffes von den Fasern müsste jedoch noch einmal in der vorliegenden Anordnung genauer untersucht werden, um das System besser verstehen zu können. Insgesamt müssen aber auch hier die Effekte der spontanen Neuritenausprossung sowie der Größe der Strangstücke mitberücksichtigt werden. Ebenfalls wie bereits oben konstatiert, sind die bisher beschriebenen Ergebnisse lediglich qualitativer Natur.

Quantifizierung der *in-vitro*-Untersuchungen zum neuroregenerativen Effekt der mit BDNF-beladenen Fasern auf SGN-Strangstücke mittels Sholl-Analyse

Um im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen auch quantitative Aussagen tätigen zu können, wurde ein weiterer Zelltest angeschlossen. Hierfür wurden die Strangstücke sowie die ausgewachsenen Neuriten im Nachhinein mit einem Fluoreszenzfarbstoff grün markiert. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden anschließend Bilder aufgenommen, bei denen eine stärkere Visualisierung sowie Abhebung der SGNs und ihrer Neuriten vom Hintergrund zu beobachten ist. Ziel war es, die übrigen Zellen in der Suspension unsichtbar zu machen, sodass sie die weitere Bearbeitung der Bilder nicht stören. Im Anschluss daran wurden die Bilder mithilfe des Computerprogramms IMAGEJ und der Sholl-Analyse quantifiziert. Es handelt sich hierbei um eine einheitliche Methode, bei der konzentrische Kreise um den Mittelpunkt des Strangstücks gelegt und die Schnittpunkte der Neuriten mit diesen berechnet werden. Neben der Anzahl der ausgewachsenen Neuriten wird dabei zudem ihre Länge untersucht. Weiterhin werden die beiden Messwerte kombiniert, woraus sich die mittlere Neuritenaktivität ergibt. Auf diese Weise kann eine Gesamtaussage über die mittlere Aktivität der Neuriten eines SGN-Strangstückes erhalten werden. Zusätzlich zu den beschichteten sowie unbeschichteten Fasern wurde ebenfalls eine Kalibrationsreihe angefertigt, bei der verschiedene Mengen an BDNF zu den SGN-Strangstücken hinzugegeben und der jeweilige Effekt auf die neuronale Regeneration beobachtet wurde. Dies dient der Einordnung der Ergebnisse, welche mithilfe der Fasern erhalten wurden.

Um die Methode der Sholl-Analyse auf die vorliegenden Proben anzuwenden, musste diese zunächst für das vorliegende System etabliert werden. Ziel war es, herauszufinden, ob die computergestützte Methode zuverlässig ist und dieselben Ergebnisse liefert wie die Auszählung der einzelnen Neuriten per Hand. Dies wurde anhand exemplarischer Aufnahmen vollzogen. Dazu stellt Abbildung 69 die einzelnen Schritte dieses Prozesses beispielhaft an einem Strangstück dar. Es ist zunächst zu erkennen, dass die Fluoreszenzfärbung des Strangstückes

und der Neuriten erfolgreich verlaufen ist. Es sind zudem keine weiteren Zellen der Suspension angefärbt worden. Die ausgewachsenen Neuriten wurden anschließend per Hand ausgezählt. Es handelt sich um 26 aussprossende Nervenstränge, welche zur besseren Visualisierung mit einem roten Punkt markiert wurden (Abbildung 69 a). Mit Hilfe des Programms IMAGEJ wurde die Fluoreszenzaufnahme anschließend in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt, bei dem das Strangstück sowie dessen Neuriten hell hervorgehoben werden. Ein entsprechendes *Plugin* vollzieht anschließend die Sholl-Analyse (Abbildung 69 b und c). Rot markiert werden zunächst die vom Programm erkannten Neuriten (Abbildung 69 b). Anschließend werden konzentrische Kreise (hellblau) mit einem gleichbleibenden Abstand (5 Pixel) um die Mitte des Strangstückes gelegt und die Anzahl der Schnittpunkte mit den detektierten Neuriten berechnet (Abbildung 69 c). Die erhaltenen Werte entsprechen der Anzahl an Neuriten, welche sich in einem gewissen Abstand zur Mitte des Strangstückes befinden. Dies wird anschließend von dem Programm graphisch dargestellt (Abbildung 69 d). Aus den absoluten Werten (grau) wird zudem ein polynomialer Fit nach folgender Formel erstellt (blau):

$$f(x) = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 + fx^5 + gx^6 + hx^7 + ix^8 \quad (2)$$

$x = \text{Variable}; a, b, c, d, e, f, g, h, i = \text{Konstanten}$

Im Folgenden wird sich lediglich auf die aus dem polynomialen Fit erhaltenen Werte bezogen, um konstantere Ergebnisse zu erhalten. Für die Auswertung der Daten werden zusätzlich drei Kreise der Sholl-Analyse gesondert betrachtet (hellblau, Abbildung 69 b). Sie sind ebenfalls im vorliegenden Graphen dargestellt (hellblau, Abbildung 69 d). Der innere blaue Kreis umrundet in etwa das vorliegende Strangstück (10 Pixel Offset). Mit seiner Hilfe soll untersucht werden, wie viele Neuriten aus dem Strangstück herausprosseln. Per Hand wird ebenfalls ausgezählt, welche Menge an Nervensträngen direkt aus dem Strangstück herauswächst. Mithilfe des Programms wurden 25 Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem betrachteten konzentrischen Kreis erhalten, was wiederum 25 aussprossenden Neuriten entspricht. Dieser Wert stimmt sehr gut mit demjenigen überein, welcher durch das Auszählen per Hand erhalten wurde (26 Neuriten). Wie auch schon in Abbildung 69 b zu sehen, müssen sowohl zusätzlich mitgezählter Debris sowie nicht erkannte oder unterbrochene Neuriten bei der Auswertung mit berücksichtigt werden. Als Grund hierfür kann die mangelnde Ausleuchtung der Bilder angesehen werden. Da sich bei den Methoden (Ausählung per Hand vs. computergestützte Sholl-Analyse) jedoch auch für weitere SGN-Strangstück-Bilder mit unterschiedlich vielen Neuriten ebenfalls gute Übereinstimmungen ergeben, wird die computergestützte Sholl-Analyse als gut geeignet betrachtet, um im Rahmen dieser Arbeit ihre Anwendung zu finden. Die zusätzlichen Daten sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 82). Überdies wurden im Rahmen der Sholl-Analyse zwei weitere Kreise hervorgehoben, welche im gleichen Abstand voneinander

entfernt liegen. Der äußere Kreis umfasst die längsten Neuriten und liefert das Maß der maximalen Neuritenlänge (angegeben in μm). Der mittlere Kreis dient einerseits dazu, das Verzweigungsverhalten der Neuriten mit fortschreitender Länge anzuzeigen (Verzweigungsaktivität). Andererseits wird hieran das Maß der mittleren Neuritenaktivität erhoben. Diese wird hier definiert als das Produkt der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis und seinem Radius (r_2).⁹ Dieser Kreis stellt eine von äußeren Faktoren weitgehend unabhängige Größe dar. Die Individualität eines Experiments wird jedoch durch die Verwendung des tatsächlichen Radius erfasst, anders als bei Maßzahlen, die nur die Anzahl der Schnittpunkte mit den Kreisen berücksichtigen. Die Radien des inneren sowie des äußeren Kreises sind entweder von der Größe des Strangstückes oder vom ausgewählten Bildausschnitt sowie dem Auge des Betrachters abhängig; da diese Radien letztlich auch den Radius des mittleren Kreises bestimmen, gehen diese Unsicherheiten naturgemäß auch in die Bestimmung der mittleren Neuritenaktivität ein. Um einen weiteren Wert für die mittlere Neuritenaktivität zu erhalten, welcher weniger von der Größe des Strangstückes abhängt, wird daher eine modifizierte Berechnung dieser Größe angeschlossen. Die mittlere normierte Neuritenaktivität berechnet sich ebenfalls aus dem Produkt der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis, hier wird aber mit der Differenz der Radien des mittleren und inneren Kreises ($r_2 - r_1$) multipliziert. Die erhaltenen Werte beider Maßzahlen werden miteinander verglichen und in Beziehung zu den übrigen Messwerten gesetzt. Insgesamt können auf diese Weise alle Ergebnisse der einzelnen Proben miteinander verglichen werden, ohne jedes Mal den gesamten Graphen mit einer großen Datenmenge zu betrachten. Da die Neuriten auf den Originalzellbildern mit bloßem Auge kaum zu erkennen sind, werden im Folgenden lediglich die bearbeiteten Bilder nach Durchlauf der Sholl-Analyse dargestellt. Die zugehörigen Originalaufnahmen sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 84, Abbildung 85, Abbildung 86).

⁹ Untersuchungen zur geeigneten Nutzung der Methode zur Berechnung der mittleren Neuritenaktivität im Rahmen dieser Arbeit (Anhang, siehe Abbildung 83).

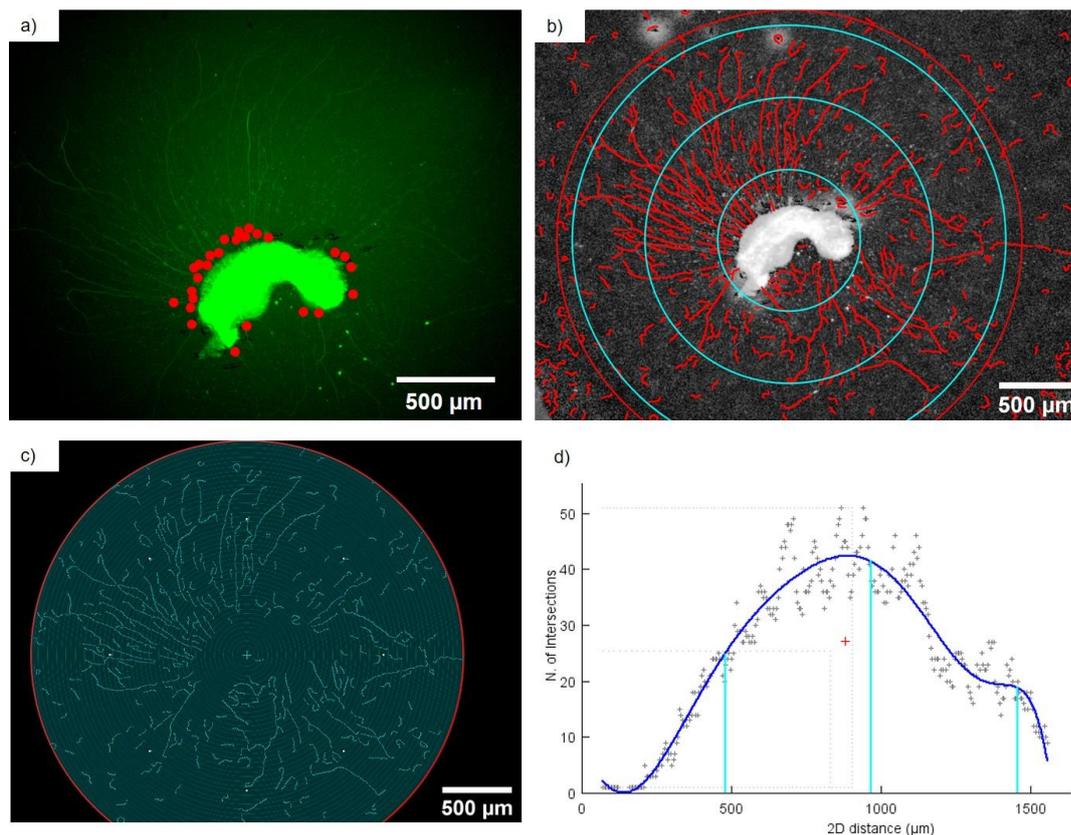


Abbildung 69: Methodenetablierung der Sholl-Analyse. Anhand einer beispielhaften Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme eines SGN-Strangstückes wird die computergestützte Sholl-Analyse erläutert: a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines SGN-Strangstückes mit ausgewachsenen Neuriten. Jeder Neurit ist mit einem roten Punkt markiert. b) Schwarz-Weiß-Bild des Strangstückes mit markierten Neuriten (rot), nachdem es mittels IMAGEJ die Sholl-Analyse durchlaufen hat. Es sind zudem der äußere Kreis der Analyse (rot) sowie drei hervorgehobene konzentrische Kreise (hellblau) abgebildet. c) Bearbeitetes Bild des SGN-Strangstückes mit allen konzentrischen Kreisen (hellblau) der Sholl-Analyse sowie äußerer Grenze (rot). Es sind die Schnittpunkte der einzelnen Kreise mit den zuvor detektierten Neuriten markiert. d) Graphische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt der Analyse mit polynomialem Fit. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. Wenn die Anzahl der Schnittpunkte mit der Anzahl der aus dem Strangstück aussprossenden Neuriten gleichgesetzt wird, wachsen laut polynomialem Fit 25 Neuriten aus. Verglichen mit der Auszählung per Hand (26 Neuriten) stimmen die Daten hinreichend gut überein, um die Methode im Rahmen der Arbeit auf die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen anzuwenden.

Nachdem herausgefunden wurde, dass die vorliegende Methode im Rahmen dieser Arbeit ihre Anwendung finden kann, wurde sich zunächst auf die Erstellung einer Kalibrationsreihe konzentriert. Dazu wurden verschiedene Mengen an BDNF zu den SGN-Strangstückes gegeben und diese unter den zuletzt genannten Bedingungen kultiviert. Dazu zeigt Abbildung 70 stellvertretend pro Kondition jeweils ein mithilfe der Sholl-Analyse ausgewertetes Zellbild. Weiterhin sind die quantitativ ausgewerteten Daten zur Anzahl sowie Länge der Neuriten in Abhängigkeit der zugegebenen BDNF-Mengen grafisch in Abbildung 71 dargestellt. Ergänzend stellt Tabelle 6 die zugehörigen Daten vergleichend dar.

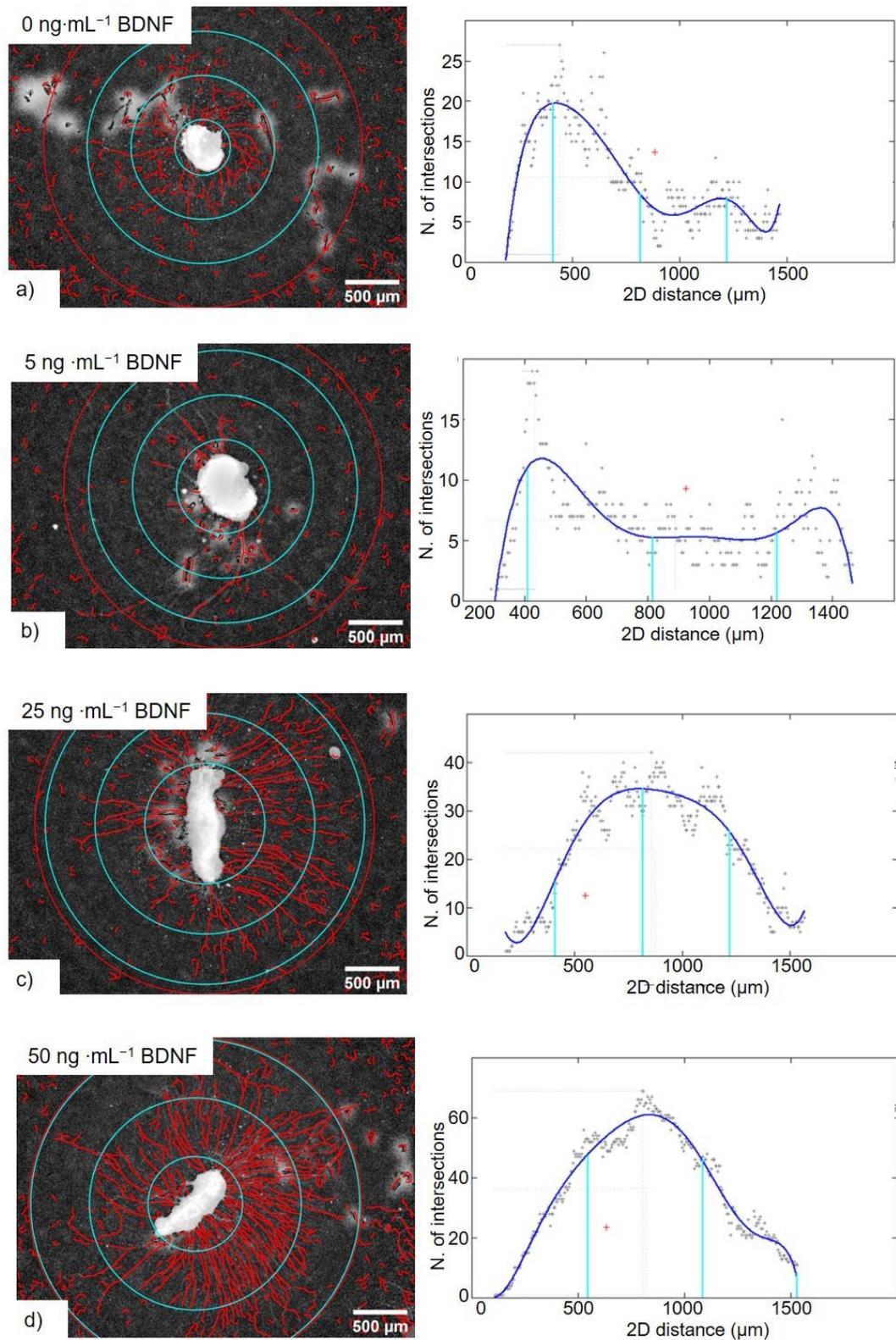


Abbildung 70: Exemplarische, mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse ausgewerteten Zellbilder der SGN-Strangstücke mit verschiedenen Mengen an zugegebenem BDNF (0-50 ng·mL⁻¹) sowie die zugehörigen Verteilungskurven der Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt der Analyse mit graphisch dargestelltem polynomialen Fit. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. Es ist zu erkennen, dass eine größere Menge an BDNF eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervorruft. Dies bedeutet eine Erhöhung der Neuritenausprossung. Auch die maximale Länge der Neuriten scheint leicht anzusteigen, wenn mehr BDNF hinzugegeben wird.

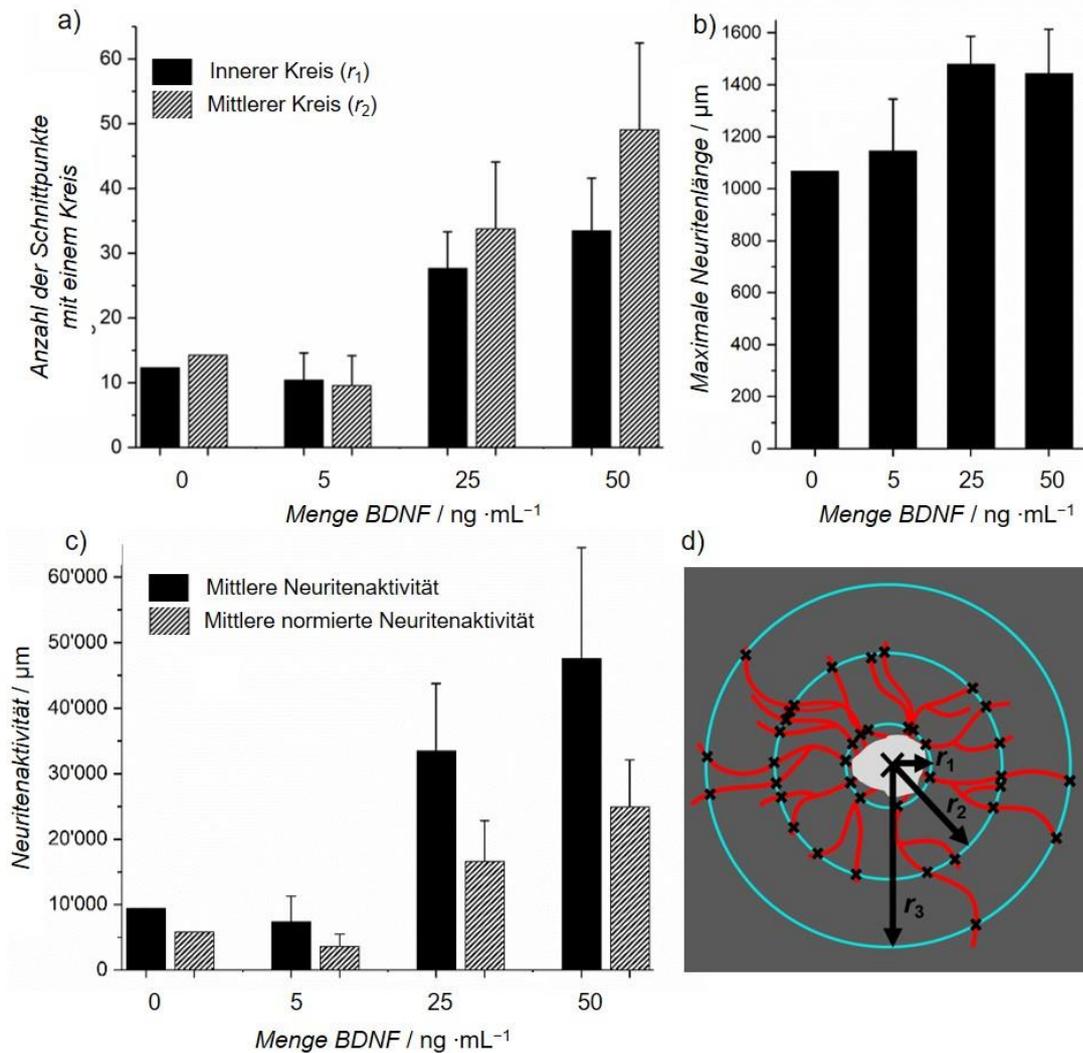


Abbildung 71: Kalibrationsreihe quantitativ ausgewertet mittels Sholl-Analyse (siehe Verteilungskurven Abbildung 70). a): Grafische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf den inneren Kreis (ausgefüllt) sowie mittleren Kreis (gestrichelt) in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an BDNF (0-50 ng). b): Anhand des äußeren Kreises bestimmte maximale Neuritenlänge für die Konditionen. c) Graphische Darstellung der mittleren Neuritenaktivität (ausgefüllt) sowie der mittleren normierten Neuritenaktivität (gestrichelt) für jede Kondition. d) Schematische Darstellung eines mittels Sholl-Analyse ausgewerteten Zellkulturversuchs mit einem SGN-Strangstück (weiß). Es sind sowohl die Schnittpunkte der aussprossenden Neuriten (rot) mit den einzelnen konzentrischen Kreisen (blau) sowie die Abstände dieser zum Mittelpunkt des Strangstückes (hell grau) mittels Pfeilen (r_1, r_2, r_3) dargestellt. Eine größere Menge an BDNF ruft eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervor. Dies entspricht einer Erhöhung der Neuritenausprossung. Zudem steigt die maximale Länge der Neuriten leicht an, wenn mehr BDNF hinzugegeben wird. Auch die mittlere Neuritenaktivität steigt entsprechend an, wenn mehr BDNF hinzugegeben wird. Da die Kondition bezüglich 0 ng·mL⁻¹ lediglich ein auszuwertendes Zellbild hervorbrachte, sind hier keine Fehlerbalken vorhanden.

Tabelle 6: Vergleich der quantitativen Ergebnisse aus der Sholl-Analyse zur Beschreibung der Kalibrationsreihe. Es ist die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf einen konzentrischen Kreis dargestellt. Dies entspricht der Anzahl der ausgesprossenen Neuriten. Zudem sind die maximalen Neuritenlängen der verschiedenen Konditionen aufgelistet. Weiterhin sind die mittleren Neuritenaktivitäten dargestellt. Da die Kondition bezüglich $0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ lediglich ein auszuwertendes Zellbild hervorbrachte, sind hier keine Fehler vorhanden.

Messgröße	ausgewählter Kreis	Menge an zugegebenem BDNF / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		0	5	25	50
<i>Anzahl der Schnittpunkte mit einer Kreis / a.u.</i>	Kreis _{Innen} (r_1)	12±0	10±4	28±6	33±8
	Kreis _{Mitte} (r_2)	14±0	10±5	34±10	49±13
<i>Maximale Neuritenlänge / μm</i>	Kreis _{Außen} (r_3)	1067±0	1144±200	1478±108	1443±170
<i>Mittlere Neuritenaktivität $\cdot 10^2 / \mu\text{m}$</i>	Kreis _{Mitte} (r_2)	94±0	73±40	334±103	476±169
<i>Mittlere normierte Neuritenaktivität $\cdot 10^2 / \mu\text{m}$</i>	Kreis _{Mitte} – Kreis _{Innen} (r_2-r_1)	58±0	36±19	166±62	248±73

Sowohl anhand der exemplarisch ausgewählten Bilder als auch anhand der quantitativen Auswertung ist zu erkennen, dass eine vermehrte Zugabe an BDNF die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf die ausgewählten Kreise erhöht. Während ohne BDNF sowie mit $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des Biomoleküls ≈ 10 Schnittpunkte mit dem inneren Kreis detektiert wurden, steigen die Zahlen bei $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF auf ca. 28 und bei $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf ungefähr 33 Schnittpunkte an. Dies geht einher mit der Menge an aussprossenden Neuriten. Somit bestätigen die Ergebnisse quantitativ, dass BDNF die Neuritenaussprossung von SGN-Strangstücken fördert.^[41,43,44,54] Weiterhin ist anhand der zugehörigen Grafik erkennbar, dass sich die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis (gestrichelt) gegenüber ersterem (ausgefüllt) leicht erhöht. Dies lässt sich durch die Verzweigung der Neuriten mit fortschreitender Länge begründen. Weiterhin zeigen sowohl die Bilder als auch die numerischen Daten, dass die maximale Neuritenlänge bei einer höheren BDNF Menge ansteigt, wenngleich die Abhängigkeit nur schwach ist. Während die maximale Neuritenlänge ohne BDNF bei ca. $1066 \mu\text{m}$ liegt, steigt die Zahl bei Zugabe von $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF auf ungefähr $1144 \mu\text{m}$ und bei 25 bzw. $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des Biomoleküls auf $\approx 1450 \mu\text{m}$ an. Dementsprechend steigt auch die mittlere Neuritenaktivität an, wenn eine größere Menge an BDNF hinzugegeben wird. Während ohne Wachstumsfaktor ein Wert von $94 \cdot 10^2 \mu\text{m}$ sowie bei einer

Zugabe von $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF eine mittlere Aktivität der Neuriten von ca. $73\cdot 10^2 \mu\text{m}$ erhalten wurde, steigen diese auf $334\cdot 10^2 \mu\text{m}$ bzw. $476\cdot 10^2 \mu\text{m}$ an, wenn 25 bzw. $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF hinzugefügt werden. Die Ergebnisse aus den Berechnungen der mittleren normierten Neuritenaktivität des Strangstückes folgen demselben Trend. Ob die Normierung der mittleren Neuritenaktivität einen Vorteil bei der Auswertung ergibt, lässt sich anhand dieser Daten nicht sagen. Insgesamt hat unter Berücksichtigung der Standardabweichungen erst die Zugabe ab 25 ng BDNF einen Einfluss sowohl auf die Anzahl der aussprossenden Neuriten als auch auf die maximale Neuritenlänge bzw. die sich daraus ergebende mittlere Neuritenaktivität. Auch LIN *et al.* fanden heraus, dass eine BDNF-Zugabe von 25 bzw. $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ die Neuritenlänge erhöht.^[448]

Anschließend wurden die Zellkulturuntersuchungen mit den beschichteten sowie unbeschichteten unmodifizierten Fasern durchgeführt. Aufbau und Durchführung der Experimente entsprachen derjenigen aus Abbildung 68. Mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse wurden die Bilder auf die Anzahl der aussprossenden Neuriten sowie auf ihre Länge hin quantifiziert und die mittleren Neuritenaktivitäten wurden berechnet. Außerdem erfolgt eine Einordnung der Ergebnisse in die zuvor erstellte Kalibrationsreihe. Dazu stellen Abbildung 72 und Abbildung 73 sowie Tabelle 7 die erhaltenen Ergebnisse dar.

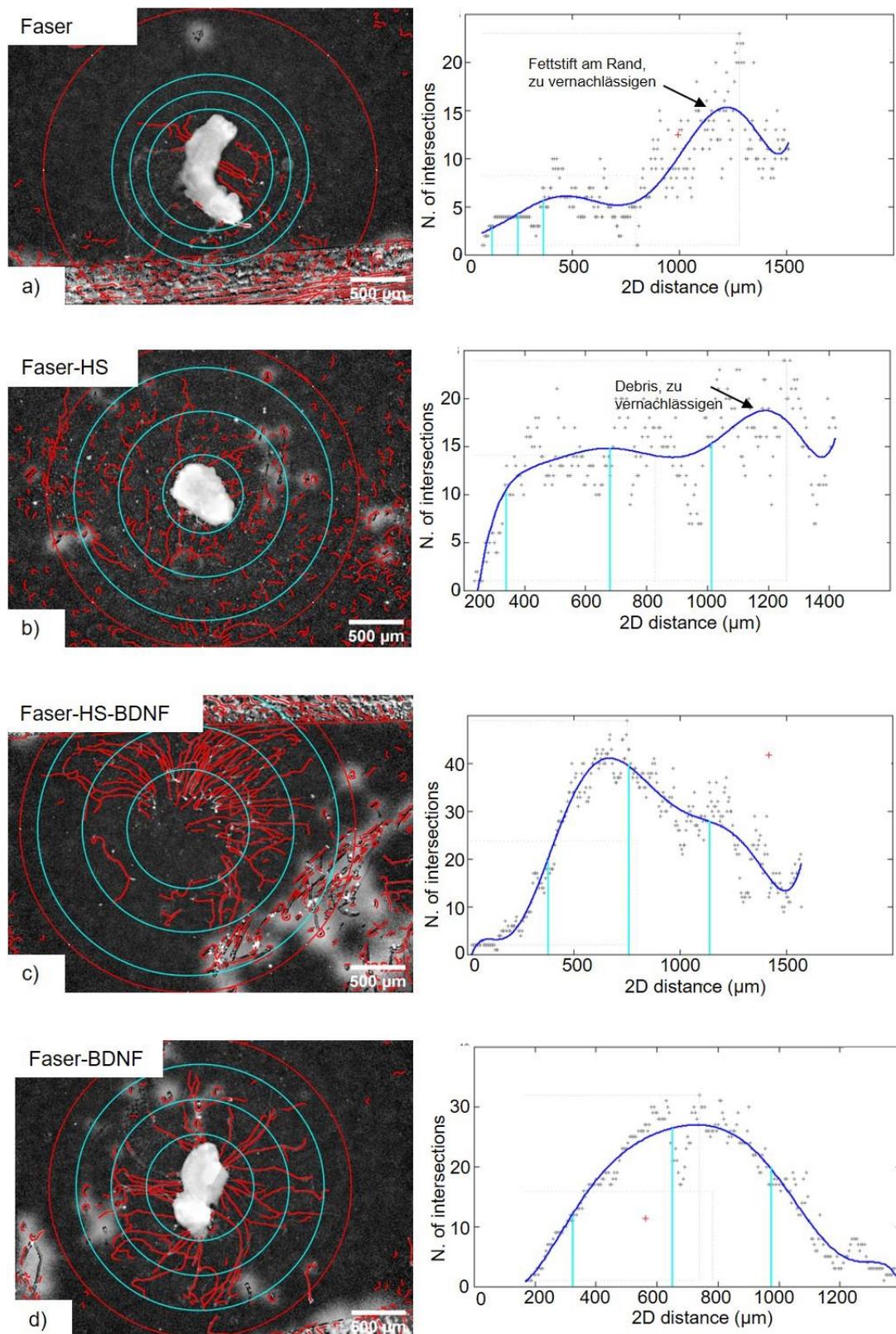


Abbildung 72: Exemplarische, mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse ausgewerte Zellbilder der SGN-Strangstücke, welche zuvor mit den verschiedenen unmodifizierten Fasertypen inkubiert wurden. Es sind die zugehörigen Verteilungskurven der Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt der Analyse abgebildet. Auch der graphisch dargestellte polynomiale Fit ist zu sehen. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. Die Inkubation der SGN-Strangstücke mit BDNF-Fasern ruft eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervor. Dies bedeutet eine Erhöhung der Neuritenausprossung. Zusätzlich deuten die Bilder darauf hin, dass die Biomolekül-beschichteten Fasern die Neuritenlänge fördern.

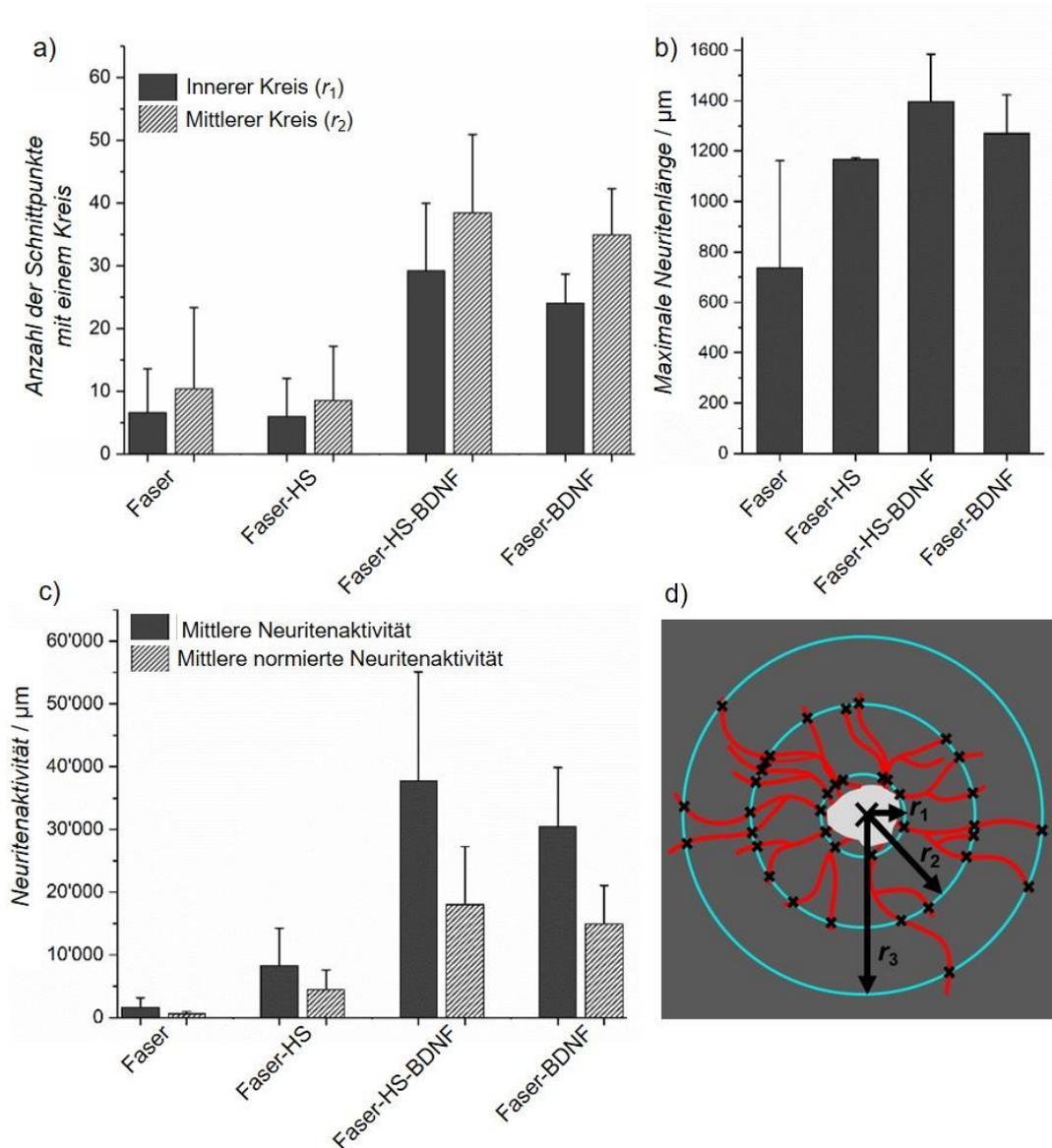


Abbildung 73: Auswertung der Zellkulturuntersuchungen der unmodifizierten Fasern mit den SGN-Strangstücken mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse (siehe Verteilungskurven Abbildung 72). a): Grafische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf den inneren Kreis (r_1 , ausgefüllt) sowie mittleren Kreis (r_2 , gestrichelt) in Abhängigkeit der verschiedenen Fasertypen. b): Anhand des äußeren Kreises (r_3) bestimmte maximale Neuritenlänge pro Kondition. c) Graphische Darstellung der mittleren Neuritenaktivität (ausgefüllt) und der mittleren normierten Neuritenaktivität (gestrichelt) der verschiedenen Fasertypen. d) Schematische Darstellung eines mittels Sholl-Analyse ausgewerteten SGN-Strangstückes. Es sind sowohl die Schnittpunkte der aussprossenden Neuriten (rot) mit den einzelnen konzentrischen Kreisen (blau) sowie die Abstände dieser zum Mittelpunkt des Strangstückes (hell grau) mittels Pfeilen (r_1 , r_2 , r_3) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Inkubation der SGN-Strangstücke mit BDNF-Fasern eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervorruft. Dies bedeutet eine Erhöhung der Neuritenausprossung. Die Biomolekül-beschichteten Fasern fördern die Neuritenlänge sowie die mittlere Neuritenaktivität.

Tabelle 7: Vergleich der quantitativen Ergebnisse aus der Sholl-Analyse zur Beschreibung der Zellkulturuntersuchungen mit den unmodifizierten Fasern. Es ist die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf einen der ausgewählten konzentrischen Kreise dargestellt. Dies entspricht der Anzahl der ausgesprossenen Neuriten. Zudem sind die maximalen Neuritenlängen sowie die mittlere Neuritenaktivität der verschiedenen Konditionen aufgelistet.

Messgröße	ausgewählter Kreis	Faser			
		–	HS	HS-BDNF	BDNF
<i>Anzahl der Schnittpunkte mit einem Kreis / a.u.</i>	Kreis _{Innen} (r_1)	7±7	6±6	29±11	24±5
	Kreis _{Mitte} (r_2)	10±13	9±9	38±12	35±7
<i>Maximale Neuritenlänge / μm</i>	Kreis _{Außen} (r_3)	736±426	1167±6	1395±189	1269±153
<i>Mittlere Neuritenaktivität · 10² / μm.</i>	Kreis _{Mitte} (r_2)	16±15	83±60	378±173	305±94
<i>Mittlere normierte Neuritenaktivität · 10² / μm</i>	Kreis _{Mitte} – Kreis _{Innen} (r_2-r_1)	6±4	44±32	180±93	150±61

Die ausgewerteten Bilder sowie die erhaltenen Daten zeigen, dass aus den Strangstücken, welche mit den unbeschichteten sowie mit HS beschichteten Fasern behandelt wurden, nur wenig Neuriten ausgesprossen sind. Die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten (≈ 6) liegt auf der Höhe der Proben in der Kalibrationsreihe, welche ohne BDNF behandelt wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus den vorherigen Zellkulturuntersuchungen überein und zeigen an, dass HS hier keine neuroregenerative Wirkung ausübt, obwohl ihm dieser Effekt mitunter zugeschrieben wird.^[102,170,171] Wie zuvor erwähnt, ist es möglich, dass die freigesetzte Konzentration des Glykosaminoglykans zu gering ist, um eine Wirkung zu zeigen.^[102] Im Gegensatz dazu zeigen die Proben, welche mit den BDNF-tragenden Fasern behandelt wurden, eine erhöhte Neuritenausprossung (Faser-HS-BDNF ≈ 29 ; Faser-BDNF ≈ 24). Die Quantifizierung der höheren Anzahl an aussprossenden Neuriten in Anwesenheit der BDNF-Fasern unterstützt die zuvor erhaltenen Ergebnisse und weist auf den neuroregenerativen Effekt des BDNFs gegenüber SGNs hin.^[41,43,44,54] Weiterhin ist unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein Unterschied zwischen den Proben auszumachen, welche mit den BDNF-HS-Fasern und mit den BDNF-Fasern ohne HS behandelt wurden. Die erhaltenen Ergebnisse werden durch die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis bestätigt. Die Werte liegen leicht über den Werten des inneren Kreises

und zeigen die Verzweigung der Neuriten an (Faser-HS-BDNF ≈ 38 ; Faser-BDNF ≈ 35). Auch hier kann es sein, dass sich der in der Literatur bereits beobachtete additive Effekt von HS und BDNF auf die Neuritenaussprossung aufgrund zu geringer Mengen des Polysaccharids nicht aufgebaut hat.^[102] Wie zuvor bereits erwähnt, können trotz unterschiedlichen *Release*-Verhaltens die zu geringen Mengen an freigesetztem BDNF bzw. der zu geringe Unterschied in der BDNF-Freisetzung der beiden Fasertypen (mit/ohne HS) nach 3 d als Grund angesehen werden, dass die Wirkung auf die Zellen vergleichbar ausfällt. Auch hier wären zusätzliche *Release*-Untersuchungen unter Zellkulturbedingungen sowie modifizierte Zellkulturuntersuchungen mit einer größeren Menge an Fasern bzw. längeren Inkubationszeit sinnvoll. So könnte die veränderte BDNF-Freisetzung von den HS-Fasern im Gegensatz zu den Fasern ohne HS auch in ihrer Wirkung auf die SGNs sichtbar gemacht werden. Verglichen mit den Ergebnissen aus der Kalibrationsreihe liegen die erhaltenen Daten der BDNF-Fasern im Bereich von $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an zugegebenem Biomolekül. Laut ELISA (Abbildung 59) wurden von den Fasern innerhalb des Inkubationszeitraums von 3 Tagen lediglich $\approx 1.5 \text{ ng}$ an BDNF in das umgebende Medium freigesetzt. Möglicherweise wurde mithilfe des ELISAs nicht die gesamte Menge an BDNF quantifiziert oder aber die Art der Freisetzung spielt hier eine Rolle.

Die Neuriten der SGN-Strangstücke weisen in Anwesenheit der BDNF-beladenen Fasern im Gegensatz zu den Kontrollen eine etwas erhöhte Länge auf. Während die Neuriten der Kontrollen ohne Biomolekül eine Länge von ungefähr $736 \mu\text{m}$ aufweisen, besitzen diejenigen der Proben mit lediglich HS schon eine Länge von $1167 \mu\text{m}$. Dies könnten ein Hinweis sein auf den in der Literatur bereits beschriebenen neuroregenerativen Effekt des Glykosaminoglykans.^[102,170,171] Der erhaltene Wert liegt jedoch im Fehlerbereich der bestimmten Neuritenlänge der unbeschichteten Fasern. Für eine genauere Aussage müsste die Versuchsreihe wiederholt werden. Demgegenüber steigen die Zahlen signifikant an bei den Proben mit BDNF und HS auf $\approx 1395 \mu\text{m}$ sowie lediglich mit BDNF auf $\approx 1269 \mu\text{m}$. Die Werte ähneln denjenigen, welche mit 25 bzw. $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF-Zugabe während der Erstellung der Kalibrationsreihe erhalten wurden. Sie geben einen Hinweis darauf, dass das von den Fasern freigesetzte BDNF die Neuritenlänge der SGNs positiv beeinflusst.^[448] Dementsprechend steigt auch die mittlere Neuritenaktivität an, wenn die SGN-Strangstücke mit beschichteten Fasern inkubiert werden. Während ohne Beschichtung ein Wert von $16\cdot 10^2 \mu\text{m}$ sowie bei Inkubation mit HS-Fasern eine mittlere Aktivität der Neuriten von ca. $83\cdot 10^2 \mu\text{m}$ erhalten wurde, steigt der Wert auf $378\cdot 10^2 \mu\text{m}$ bzw. $305\cdot 10^2 \mu\text{m}$ an, wenn BDNF-Fasern hinzugefügt werden. Die Werte deuten sowohl auf einen möglichen neuroregenerativen Effekt von HS hin und weisen diesen für BDNF nach. Die erhaltenen Ergebnisse aus den Berechnungen der mittleren normierten Neuritenaktivität folgen demselben Trend und unterstützen ebenfalls die restlichen Resultate. Die erhaltenen Werte ähneln wiederum denjenigen, welche durch Zugabe von 25 bzw. $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF während der Erstellung der Kalibrationsreihe erhalten wurden.

Neben den unmodifizierten Fasern wurden zudem die beschichteten amino-modifizierten Fasern auf ihren neuroregenerativen Effekt hin untersucht. Dazu stellen Abbildung 74 und Abbildung 75 sowohl die bearbeiteten Zellbilder mittels computergestützter Sholl-Analyse sowie die Quantifizierung der Neuritenausprossung grafisch dar. Tabelle 8 vergleicht unterstützend die erhaltenen Werte zur Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf einen Kreis sowie zur Länge der Neuriten und zur Neuritenaktivität in Abhängigkeit des Fasertyps.

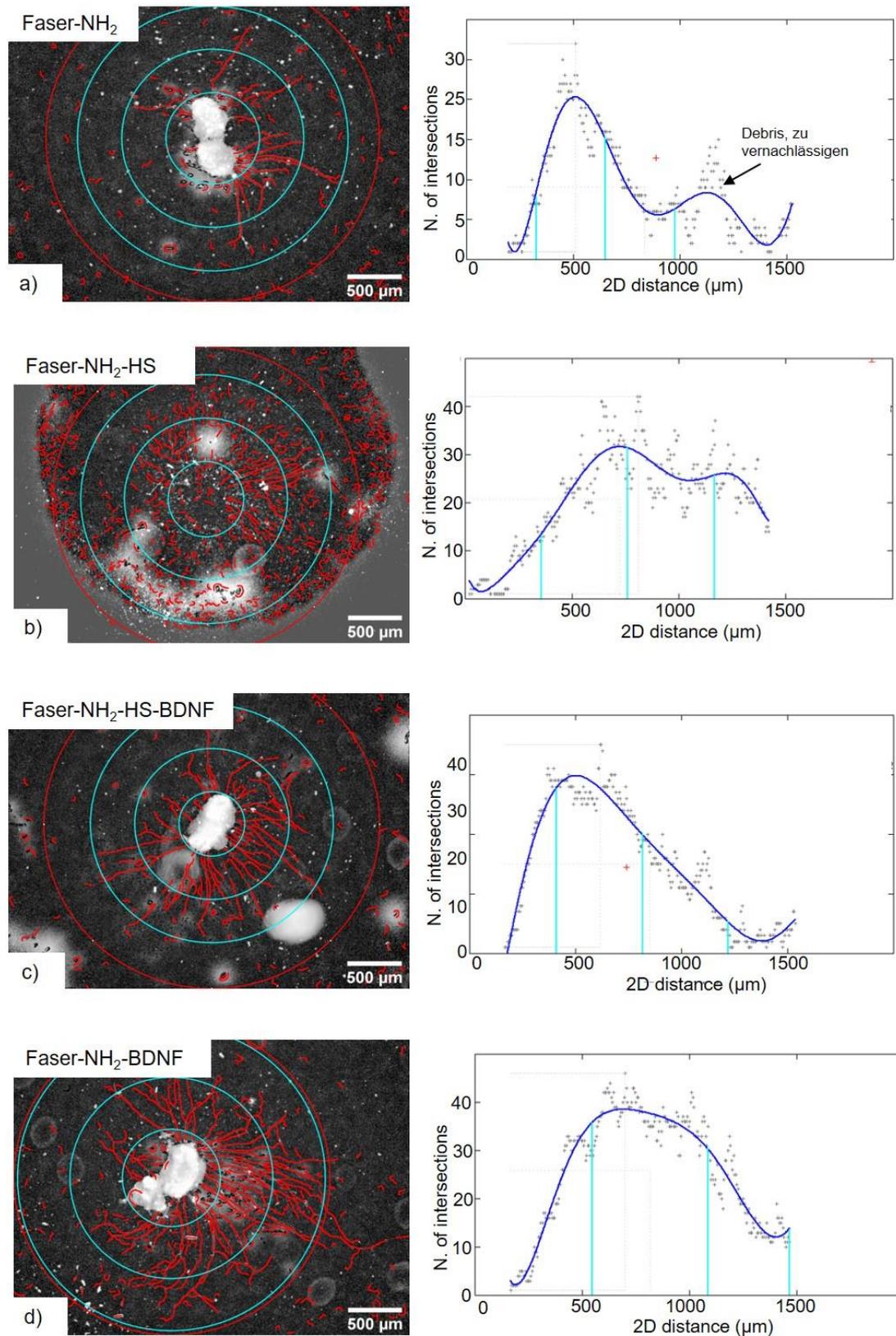


Abbildung 74: Exemplarische, mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse ausgewerte Zellbilder der SGN-Strangstücke, welche zuvor mit den verschiedenen amino-modifizierten Fasertypen inkubiert wurden. Es sind die zugehörigen Verteilungskurven der Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt der Analyse abgebildet. Auch der graphisch dargestellte polynomiale Fit ist zu sehen. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. Die Inkubation der SGN-Strangstücke mit BDNF-Fasern ruft eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervor. Dies bedeutet eine Erhöhung der Neuritenausprossung. Eine Erhöhung der maximalen Neuritenlänge durch die Biomoleküle ist lediglich bei den BDNF-Fasern ohne HS zu erkennen.

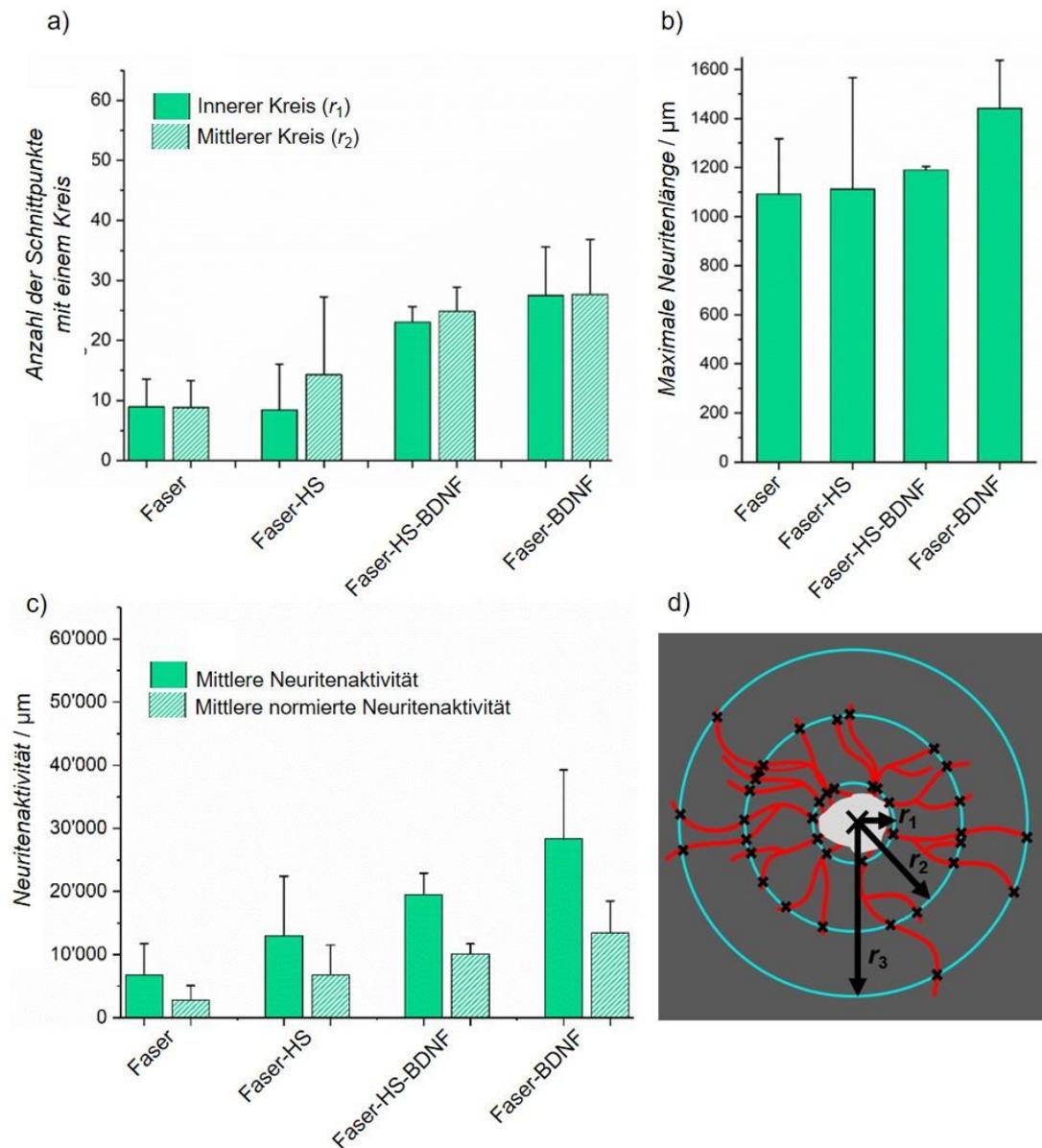


Abbildung 75: Auswertung der Zellkulturuntersuchungen der amino-modifizierten Fasern mit den SGN-Strangstücken mithilfe der computergestützten Sholl-Analyse (siehe Verteilungskurven Abbildung 74). a): Grafische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf den inneren Kreis (r_1 , ausgefüllt) sowie mittleren Kreis (r_2 , gestrichelt) in Abhängigkeit der verschiedenen Fasertypen. b): Anhand des äußeren Kreises (r_3) bestimmte maximale Neuritenlänge pro Kondition. c) Graphische Darstellung der mittleren Neuritenaktivität (ausgefüllt) und der mittleren normierten Neuritenaktivität (gestrichelt). d) Schematische Darstellung eines mittels Sholl Analyse ausgewerteten SGN-Strangstückes. Es sind sowohl die Schnittpunkte der aussprossenden Neuriten (rot) mit den einzelnen konzentrischen Kreisen (blau) sowie die Abstände dieser zum Mittelpunkt des Strangstückes (hell grau) mittels Pfeilen (r_1 , r_2 , r_3) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Inkubation der SGN-Strangstücke mit BDNF-Fasern eine höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den ausgewählten konzentrischen Kreisen hervorruft. Dies bedeutet eine Erhöhung der Neuritenausprossung. Die Neuritenlänge der Proben, welche mit der BDNF-Faser inkubiert wurden, ist gegenüber den restlichen Proben leicht erhöht. Die mittlere Neuritenaktivität erhöht sich, wenn die SGNs mit Biomolekül-Fasern in Kontakt kommen.

Tabelle 8: Vergleich der quantitativen Ergebnisse aus der Sholl-Analyse zur Beschreibung der Zellkulturuntersuchungen mit den amino-modifizierten Fasern. Es ist die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf einen konzentrischen Kreis dargestellt. Dies entspricht der Anzahl der ausgesprossenen Neuriten. Zudem sind die maximalen Neuritenlängen sowie die mittleren Neuritenaktivitäten der verschiedenen Konditionen aufgelistet.

Messgröße	ausgewählter Kreis	Faser-NH ₂			
		–	HS	HS-BDNF	BDNF
<i>Anzahl der Schnittpunkte mit einem Kreis / a.u.</i>	Kreis _{Innen} (r_1)	9±5	8±8	23±3	27±8
	Kreis _{Mitte} (r_2)	9±5	14±13	25±4	28±9
<i>Maximale Neuritenlänge / μm</i>	Kreis _{Außen} (r_3)	1091±226	1112±453	1189±15	1441±197
<i>Mittlere Neuritenaktivität · 10² / μm</i>	Kreis _{Mitte} (r_2)	68±50	129±95	195±34	283±109
<i>Mittlere normierte Neuritenaktivität · 10² / μm</i>	Kreis _{Mitte} – Kreis _{Innen} (r_2-r_1)	27±23	68±47	101±16	135±50

Die Bilder sowie die erhaltenen Daten zeigen in Anlehnung an die Versuche der unmodifizierten Fasern, dass aus den Strangstücken, welche mit den unbeschichteten sowie mit HS beschichteten Fasern behandelt wurden, nur wenige Neuriten aussprossen (≈ 8.5). Auch hier liegt die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten auf der Höhe der Proben in der Kalibrationsreihe, welche ohne BDNF behandelt wurden. Unterstützend zu den bereits beschriebenen Zellkulturuntersuchungen zeigen die Resultate an, dass HS hier keine neuroregenerative Wirkung ausübt.^[102,170,171] Obwohl ihm dieser Effekt zugeschrieben wird, kann es sein, dass die freigesetzte Konzentration des Glykosaminoglykans zu gering ist, um eine Wirkung zu zeigen.^[102] Im Gegensatz dazu zeigen auch die Versuche mit den amino-modifizierten Fasern, dass die Freisetzung von BDNF zu einer erhöhten Neuritenaussprossung führt. Dies zeigt sich in der erhöhten Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf den inneren (Faser-NH₂-HS-BDNF ≈ 23 ; Faser-NH₂-BDNF ≈ 27) sowie mittleren Kreis (Faser-NH₂-HS-BDNF ≈ 25 ; Faser-NH₂-BDNF ≈ 28) in der Sholl-Analyse. Hier spiegelt sich der neuroregenerative Effekt des BDNFs gegenüber den SGNs wieder.^[41,43,44,54] Die leicht erhöhten Werte, welche mit zunehmendem Abstand vom Mittelpunkt erhalten wurden, lassen auf die Verzweigung der Neuriten schließen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist jedoch kein Unterschied zwischen den BDNF-Proben mit bzw. ohne HS auszumachen. Trotz

dessen wird in der Literatur ein additiver Effekt der beiden Biomoleküle auf die Neuritenausprossung beschrieben. Möglicherweise liegt dies wiederum, wie bereits beschrieben, an der zu geringen Konzentration des Polysaccharids.^[102] Ähnlich zu den Ergebnissen der unmodifizierten Fasern können trotz unterschiedlichen *Release*-Verhaltens die zu geringe Gesamtmenge an abgebenem BDNF sowie der zu minimale Unterschied in der BDNF-Freisetzung der beiden Fasertypen (mit/ohne HS) nach 3 d Grund dafür sein, dass die Wirkung auf die SGNs vergleichbar ausfällt. Auch in diesem Fall wären zusätzliche *Release*-Untersuchungen unter Zellkulturbedingungen sowie modifizierte Zellkulturuntersuchungen mit einer größeren Menge an Fasern bzw. einer längeren Inkubationszeit hilfreich. Hierdurch könnte die veränderte BDNF-Freisetzung von den HS-Fasern im Gegensatz zu den Fasern ohne HS auch in ihrer Wirkung auf die SGNs gezeigt werden. Insgesamt liegt die Anzahl der ausgewachsenen Neuriten der BDNF-Proben leicht unter dem Wert von 28^{10} Schnittpunkten, welcher durch Zugabe von $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des Biomoleküls bei Erstellung der Kalibrationsreihe erhalten wurde. Die Menge an freigesetztem BDNF beträgt hier laut ELISA jedoch lediglich $\approx 1 \text{ ng}$. Wie zuvor schon beschrieben, ist es möglich, dass der ELISA nicht die komplette Menge des BDNFs detektiert hat. Möglicherweise hat jedoch auch die Art der Freisetzung einen Einfluss. Die Werte aus den Zellkulturuntersuchungen mit den amino-modifizierten Fasern liegen leicht unter den quantifizierten Anzahlen aus den Versuchen mit den unmodifizierten Fasern. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass von den amino-modifizierten Fasern weniger BDNF freigesetzt wird als von den unmodifizierten Fasern, welches anschließend einen neuroregenerativen Effekt auf die SGNs ausüben kann. Da dieser Unterschied jedoch sehr gering ausfällt, ist auch die Wirkung auf die SGNs sehr ähnlich. Um die vorliegende *Release*-Situation sowie den daraus entstehenden neuroregenerativen Effekt genauer zu untersuchen, wären weitere Freisetzungsexperimente unter Zellkulturbedingungen hilfreich. Bezogen auf die maximale Länge der Neuriten sind lediglich die Werte der Proben leicht erhöht, welche mit den BDNF-Fasern ohne HS in Kontakt kamen (Faser-BDNF $\approx 1440 \mu\text{m}$; restliche Proben $\approx 1100 \mu\text{m}$). Die Daten geben einen Hinweis darauf, dass das von den Fasern freigesetzte BDNF einen neuritenverlängernden Effekt auslöst.^[448] Dieser fällt geringer aus als bei den unmodifizierten Fasern. Auch hier kann der Grund wiederum darin liegen, dass von den amino-modifizierten Fasern weniger BDNF freigesetzt wird als von den unmodifizierten Fasern (Abbildung 59).

Entsprechend der erhaltenen Ergebnisse steigt auch die mittlere Neuritenaktivität an, wenn die SGN-Strangstücke mit beschichteten Fasern inkubiert werden. Während ohne Beschichtung ein Wert von in etwa $68\cdot 10^2 \mu\text{m}$ sowie bei Inkubation mit HS-Fasern eine mittlere Aktivität der Neuriten von ca. $129\cdot 10^2 \mu\text{m}$ erhalten wurde, steigt der Wert auf $195\cdot 10^2 \mu\text{m}$ bzw.

¹⁰ bezogen auf den inneren Kreis (bzw. 34 für den mittleren Kreis)

$283 \cdot 10^2 \mu\text{m}$ an, wenn BDNF-Fasern hinzugefügt werden. Die Werte deuten sowohl auf den neuroregenerativen Effekt von HS als auch von BDNF hin. Die erhaltenen Ergebnisse aus den Berechnungen der mittleren normierten Neuritenaktivität folgen demselben Trend und unterstützen ebenfalls die restlichen Resultate. Die Werte liegen leicht unter den Ergebnissen aus der Zugabe von $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ an BDNF während der Erstellung der Kalibrationsreihe. Somit liegen sie unter denjenigen der unmodifizierten Fasern. Damit unterstützen sie die bereits erhaltenen Resultate.

Wie zuvor schon beschrieben zeigen sowohl die Versuche der un- als auch der amino-modifizierten Fasern keinen richtungsweisenden Effekt des BDNFs, obwohl ihm dieser mitunter zugeschrieben wird.^[250,251] Die Neuriten sprießen gleichermaßen in alle Richtungen aus, obwohl das Strangstück gegenüber den gebündelten Fasern platziert wurde (zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 68). Möglicherweise ist die Konzentration des Biomoleküls dafür zu gering oder aber es fand zuvor eine zu starke Durchmischung des Mediums statt, sodass sich kein BDNF-Gradient ausbilden konnte. Bei der Auswertung der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass das Computerprogramm Debris als Neuriten erkennt (Abbildung 72b) oder aber Neuriten nicht durchgängig markiert. Auch das Ablösen von Strangstücken (Abbildung 72 c) wirkt sich auf die erhaltenen Ergebnisse aus.

Insgesamt müssen bei der Interpretation der Ergebnisse einige Fehlerquellen beachtet werden. Durch eine unzureichende Belichtung der Fluoreszenzaufnahmen einiger Strangstücke wurden mittels Sholl-Analyse mitunter Neuriten detektiert, welche eigentlich keine sind. Sie stellen lediglich ein Untergrundrauschen dar, den sogenannten Debris. Daraus ergibt sich in der späteren Sholl-Analyse ein falsch-positives Ergebnis. Zudem werden einige Neuriten nicht durchgängig vom Programm erkannt und detektiert. Hiedurch entsteht ein falsch-negatives Ergebnis in der späteren Auswertung. Auch durch eine zu große Unschärfe sowie Verschmierungen auf einigen Bildern werden diese Phänomene ausgelöst. Je nach Stärke des auftretenden Phänomens kann dieses einen höheren Effekt auf die spätere Bearbeitung ausüben. Um die Bildqualität zu erhöhen könnte in Zukunft sowohl die Aufnahmetechnik der Fluoreszenzbilder als auch die Färbung der SGNs optimiert werden, um diese stärker vom Hintergrund abzuheben.^[449] Hinzu kommt, dass die einzelnen Strangstücke verschiedene Größen aufweisen. Es muss berücksichtigt werden, dass aus größeren Strangstücken statistisch mehr Neuriten auswachsen können als aus kleineren Strangstücken. In Zukunft könnten alle erhaltenen Daten auf die Größe der Strangstücke bezogen werden, um sie miteinander zu vergleichen. Da sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch einige Strangstücke von der Zellkulturplatte lösten, konnte dieses Verfahren nicht angewandt werden. Die Strangstücke sollen in weiteren Untersuchungen fester an den Untergrund angedrückt werden. Daneben muss bei allen Zellkulturuntersuchungen mit SGN-Strangstücken berücksichtigt werden, dass es auch ohne Wirkstoff zu einer spontanen Neuritenaussprossung kommen kann.

Zusätzlich sollen die verwendeten Auswertemethoden miteinander verglichen werden. Bei der Ermittlung der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten bezogen auf einen Kreis ergibt sich ein absoluter Wert für die Menge an aussprossenden Neuriten pro Strangstück. Dieser ist jedoch, vor allem bezogen auf den inneren Kreis, abhängig von der Größe des jeweiligen Strangstückes. Auch die Bestimmung der maximalen Neuritenlänge generiert einen absoluten Wert. Hier ist das Ergebnis jedoch abhängig vom äußeren Kreis. Dieser wird durch den jeweiligen Beobachter individuell festgelegt und richtet sich zudem nach dem erhaltenen Bildausschnitt. Nichtsdestoweniger stellen die mit den quantitativen Methoden erhaltenen Werte die real vorliegende Situation gut wieder. Hier werden die Anzahl der Neuriten sowie ihre maximale Länge unabhängig voneinander betrachtet. Demgegenüber steht die Berechnung der mittleren Neuritenaktivität. Sie generiert einen Wert, der sowohl die mittlere Länge als auch die Anzahl der aussprossenden Neuriten miteinander kombiniert, um eine Gesamtaussage über die mittlere Aktivität der Neuriten bezogen auf ein Strangstück zu erhalten. Diese Größe stimmt nicht mit der realen Situation überein, weil jedem aussprossenden, detektierten Neurit eine definierte Länge (r_2 bzw. r_2-r_1 im Fall der normierten Variante) zugeordnet wird. Im Gegensatz zu den Größen der ersten Methode sind die hier erhaltenen Werte jedoch unabhängiger von äußeren Faktoren, da sie sich ausschließlich auf den mittleren Kreis beziehen. Um hier zusätzlich die Größe des Strangstückes mit zu berücksichtigen, wurde die mittlere normierte Neuritenaktivität, die sich auf den Abstand zwischen dem mittleren sowie dem ersten Kreise bezieht, einbezogen. Die erhaltenen Ergebnisse folgen dem gleichen Trend wie die Daten, die aus den einfachen Berechnungen generiert wurden, bei denen die Größe des Strangstückes nicht mitberücksichtigt wurde. Eine Differenzierung zwischen der Aussagekraft der mittleren Neuritenaktivität und der mittleren normierten Neuritenaktivität ist anhand der bisher durchgeführten Experimente nicht möglich. Insgesamt geben die durchgeführten Untersuchungen einen deutlichen Hinweis darauf, dass das von den Fasern freigesetzte BDNF die Neuritenaussprossung fördert. Außerdem übt es einen leichten Einfluss auf die maximale Neuritenlänge sowie die mittlere Neuritenaktivität aus. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Effekt des BDNFs auf die SGNs mit zunehmender Menge an Biomolekül ansteigt. In Zukunft sollten die vorliegenden Zellkulturuntersuchungen optimiert sowie wiederholt werden, um ein auf einer größeren Datenlage basierendes gestütztes Ergebnis zu erhalten. Es wäre zudem von Interesse zu untersuchen, inwieweit sich höhere Mengen an BDNF ($>50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) auf die SGNs auswirken.

Für die Anwendung als neuronale Leitstruktur im Rahmen des CIs zeigen diese Versuche insgesamt, dass die beschichteten Polymerfasern nicht nur die Überlebensrate der SGNs erhöhen, sondern auch das Wachstum der Neuriten fördern. Somit können diese letztendlich auf der Elektrodenoberfläche anwachsen, um die Übertragung des elektrischen Signals zu optimieren, wenn auch eine Lenkung der Neuriten möglich wäre. Innerhalb der durchgeführten Studien

konnte allerdings kein solches richtungsabhängiges Wachstum der Neuriten in Richtung eines von den Polymerfasern ausgehenden BDNF-Konzentrationsgradienten beobachtet werden auch wenn dies bereits postuliert wurde.^[35,36,450] Laut XIE *et al.* wird das weiträumige Wachstum von Axonen hippocampaler Neurone entlang eines geordneten Kanalsystems aufgrund eines BDNF-Reservoirs angeregt.^[450] In diesem Zusammenhang konnte bereits die erfolgreiche Führung von SGNs entlang geordneter Strukturen und dessen positive Wirkung auf die Länge der Neuriten gezeigt werden.^[36,57] Während der neuritenverlängernde Effekt des BDNFs im Rahmen dieser Arbeit nur leicht zu erkennen war, konnten andere Studien diesen bereits aufzeigen.^[451,452] In Zukunft kann die Verwendung weiterer Wachstumsfaktoren mit stärkeren Auswirkungen auf das Neuritenwachstum, wie NT-3, in Betracht gezogen werden.^[248–251]

4.3.4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der Fasern ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem für BDNF zu generieren, um nicht nur die Überlebensrate der SGNs zu erhöhen, sondern auch die Aussprossung der Neuriten zu fördern. Als Basismaterial dienten die zuvor mit HS beschichteten Polymerfasern, da das Glykosaminoglykan die Fähigkeit besitzt, Wachstumsfaktoren anzubinden, zu stabilisieren und deren Freisetzung zu kontrollieren.^[93–96,160,179–181]

Mithilfe eines qualitativ, direkt durchgeführten ELISAs wurde zunächst visualisiert, dass BDNF an die un- sowie amino-modifizierten Fasern angebunden werden konnte. Dies war ebenfalls möglich für Fasern, welche zuvor nicht mit HS beschichtet waren. Demgegenüber stellte jedoch ein quantitativ ausgewerteter ELISA unter Nutzung der Inkubations- sowie Waschlösungen heraus, dass BDNF lediglich auf den mit dem Glykosaminoglykan vorbeschichteten Fasern immobilisiert werden konnte. Es konnte nahezu die gesamte Menge von 500 ng an BDNF angebunden werden. Der vorliegende Widerspruch betreffend der Fasern ohne HS ist mit der Sensitivität der Messmethode zu begründen. Demnach können auch schon sehr geringe Mengen an BDNF in dem direkten, qualitativen ELISA zu einem positiven Aus Schlag geführt haben. Diese Mengen waren jedoch zu gering, um mithilfe des ELISAs indirekt über die Inkubations- sowie Waschlösungen bestimmt zu werden. Somit ist davon auszugehen, dass sich lediglich geringe Mengen an BDNF an die un- sowie amino-modifizierten Fasern ohne HS angelagert haben. Das an die mit HS vorbeschichteten Fasern angelagerte BDNF kann zum einen in dem vorliegenden biomimetischen Ansatz durch die Wechselwirkung mit dem Glykosaminoglykan angebunden worden sein.^[93,100,101] Zum anderen können auch elektrostatische WW zwischen dem positiv geladenen BDNF und der negativ geladenen Faser Oberfläche sowie Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe WW zu einer Anlagerung geführt haben.

In der Anwendung im Innenohr soll das BDNF jedoch über einen längeren Zeitraum hinweg von den Fasern freigesetzt werden, um in Kontakt mit den dort ansässigen SGNs zu treten und ihre Überlebensrate zu erhöhen sowie das Aussprossen der Neuriten zu fördern. Anschließend ist es das Ziel, die Neuriten zur Oberfläche des Implantats wachsen zu lassen, um die Übertragung des elektrischen Signals zu optimieren. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass BDNF unter physiologischen Bedingungen (PBS, 37 °C) über einen Zeitraum von 105 d wieder von den Fasern freigesetzt wird. Hierbei zeigen die mit HS vorbeschichteten Fasern eine länger andauernde, kontinuierliche Freisetzung von BDNF mit einer Kinetik 1. Ordnung. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Fasern, welche nicht mit dem Glykosaminoglykan vorbehandelt wurden. Hier wurde von beiden Fasertypen zunächst in einem *burst-Release* ein Großteil des BDNFs abgegeben. Anschließend nähern sich die Kurven einem Plateau an. Insgesamt wurde von den unmodifizierten Fasern (5 Fasern mit jeweils 3 cm Länge in 1 mL PBS) mit HS etwa $9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF abgegeben, wohingegen von den amino-modifizierten Fasern mit HS $3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ freigesetzt wurden. Beide Kurven zeigen an, dass die Freisetzung noch nicht abgeschlossen ist. Demgegenüber wurden von den unmodifizierten Fasern ohne HS $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und von den entsprechenden amino-modifizierten Fasern $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF in das umgebende Milieu abgegeben. Möglicherweise konnten an diese Fasertypen zunächst geringe Mengen an BDNF angebunden werden, die jedoch aufgrund schwacher Wechselwirkungen relativ schnell wieder freigesetzt wurden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen zudem auf eine indirekte Weise die erfolgreiche Beschichtung der Fasern mit HS an. Weiterhin ist der biomimetische Ansatz der Versuche zu erkennen. HS dient als Vertreter der extrazellulären Matrix sowohl der Speicherung als auch der Stabilisierung sowie langsamen Freisetzung des Wachstumsfaktors. Der Grund der geringeren BDNF-Freisetzung von den amino-modifizierten Fasern im Gegensatz zu den unmodifizierten Fasern kann darin liegen, dass die Abgabe des Biomoleküls hier stärker über hydrophobe als über elektrostatische Wechselwirkungen kontrolliert wird. In beiden Fällen kann die Freisetzung ebenfalls durch den Abbau der Fasern beeinflusst werden. Die gelösten Polymerfaser-Bestandteile können zudem die Nachweisbarkeit von BDNF im ELISA beeinflussen.^[442] Möglicherweise fällt somit die tatsächlich freigesetzte Menge an BDNF höher aus als dass sie im ELISA ermittelt wurde. Auch eine mögliche Denaturierung von BDNF-Molekülen während des Beladungs- sowie Freisetzungsvorgangs muss bei der Interpretation der Daten mit berücksichtigt werden.^{[165][443]} Insgesamt unterstützen die Versuche somit vorliegende Studien und zeigen die langanhaltende, biomimetische BDNF-Freisetzung von HS-Fasern.^[27,97,101,380] Da für die Anwendung am CI eine kontinuierliche Behandlung der Neurone mit BDNF nötig ist, um ihr Überleben sowie die Aussprossung von Neuriten zu fördern, wurden mit diesen Fasern im Anschluss Zellkulturexperimente durchgeführt. Neben dem neuroprotektiven sollte ebenfalls der neuroregenerative Effekt des

von den Fasern freigesetzten BDNFs gegenüber den im Ohr ansässigen SGNs untersucht werden.

Zu Anfang konnte gezeigt werden, dass die Glykolsäure, ein Hauptbestandteil der Polymerfasern, keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs ausübt. Somit erscheinen die Fasern geeignet für eine Anwendung hinsichtlich der SGN. Da die Neuriten in direktem Kontakt zu den Fasern zur Oberfläche des Implantats hinwachsen sollen, folgten Zellkulturuntersuchungen, bei denen die verschiedenen Fasertypen direkt mit den SGNs kultiviert wurden. Die Überlebensrate der SGNs wurde erhöht, wenn diese mit den un- sowie amino-modifizierten BDNF-beladenen Fasern in Kontakt kamen. Dies ist auf den neuroprotektiven Effekt des von den Fasern freigesetzten BDNFs zurückzuführen. Da die erhaltenen Überlebensraten (Faser-HS-BDNF $\approx 32\%$, Faser-NH₂-HS-BDNF $\approx 24\%$) im Bereich der Positivkontrolle ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1} \approx 26\%$) liegen, von den Fasern laut ELISA in dieser Zeit jedoch weniger als ein Zehntel an BDNF freigesetzt wird, kann ein synergetisch positiver Effekt aus der Kombination von HS und BDNF auf die Neurone vermutet werden.^[102] Wie bereits erwähnt ist jedoch ebenfalls möglich, dass der ELISA nicht gesamte Menge an freigesetztem BDNF erfasst hat. HS allein übt keinen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs aus.

Da die Zellen jedoch erst mit fortschreitender Zeit Neuriten ausbilden, welche anschließend entlang der Fasern zur Implantatoberfläche hinwachsen, ist zudem die Wirkung von freigesetztem BDNF auf die SGNs von Bedeutung. Somit schlossen sich Zellkulturuntersuchungen an, bei denen die Zellen mit Überständen aus den Freisetzungsexperimenten kultiviert wurden. Auch hier zeigt sich die neuroprotektive Wirkung des von den Fasern freigesetzten BDNFs. Die Überlebensraten der SGN, welche mit den BDNF-Überständen der un- sowie amino-modifizierten Fasern in Berührung kamen, ist gegenüber den Kontrollen erhöht. Dieser Effekt ist sowohl zu Anfang als auch bei Überständen zu sehen, die erst nach 70 d entnommen wurden. Auch hier kann vermutet werden, dass sich der additive Effekt von HS und BDNF positiv auf die Überlebensrate der Neurone ausgewirkt hat.^[102] Zudem konnte gezeigt werden, dass die tatsächlich vorhandene Menge an BDNF einen proportionalen Einfluss auf die Überlebensrate der SGNs ausübt. Hierbei müssen jedoch ebenfalls etwaige Verluste der biologischen Aktivität von BDNF nach längerer Zeit berücksichtigt werden.^[442] In Anlehnung an die vorherigen Versuche zeigt HS allein keine neuroprotektive Wirkung auf die SGN. Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass BDNF keinen offensichtlich positiven Einfluss auf die Länge der Neuriten ausübt, wobei diejenigen der Kontrollen ohne Protein vermehrt signifikant erniedrigt sind gegenüber der Medium-Kontrolle.

Anschließend wurde der neuroregenerative Effekt des BDNFs weiter untersucht, da die Neuritenaussprossung der SGNs zur Oberfläche des Implantats hin angeregt werden soll. Es schlossen sich aufeinanderfolgende Zellkulturuntersuchungen an, bei denen die verschiedenen Fasertypen am Rand einer Zellkulturschale befestigt und gegenüberliegend SGN-Strangstücke

positioniert wurden. Nach einer mehrtägigen Inkubationszeit konnte qualitativ sowie mithilfe der Sholl-Analyse ebenfalls quantitativ herausgefunden werden, dass sowohl un- als auch amino-modifizierte BDNF-Fasern die Neuritenaussprossung fördern. Trotz dessen, dass HS mitunter ein neuroregenerativer Effekt zugeschrieben wird, konnte dieser im Rahmen der vorliegenden Versuche fast nicht beobachtet werden.^[102,170,171] Möglicherweise liegt die vorhandene Konzentration an HS j nicht im effektiven Wirkungsbereich.^[102] Weiterhin zeigen die Versuche mit den BDNF-HS-Fasern sowie mit den BDNF-Fasern ohne Glykosaminoglykan dieselben Ergebnisse. Der synergetisch positive Effekt der beiden Biomoleküle auf die Neuritenaussprossung war nicht zu beobachten. Auch dies kann auf eine zu geringe Menge an HS zurückzuführen sein.^[102] Das unterschiedliche Freisetzungsverhalten von BDNF von den Fasern mit bzw. ohne HS müsste zudem ebenfalls Auswirkungen auf die Zellwirkung haben. Da die Inkubationszeit während der Zellkulturuntersuchungen jedoch lediglich 2-3 Tage beträgt und der BDNF-Release der beiden Fasertypen zu Anfang recht ähnlich verläuft, kann der Unterschied in der Menge an freigesetztem BDNF zu gering ausfallen, um eine veränderte Zellwirkung hervorzurufen. Weitere Zellkulturuntersuchungen mit einer größeren Menge an Fasern bzw. längerer Inkubationszeit würden hier sinnvoll erscheinen. Der Einfluss von HS auf die Freisetzung von BDNF ist vor allem nach längerer Zeit zu beobachten. Zudem würden weitere Freisetzungsversuche unter Zellkulturbedingungen weiteren Aufschluss geben. Möglicherweise ist hier ein leicht verändertes Verhalten zu sehen. Die quantitative Sholl-Analyse zeigt zudem, dass die Anzahl aussprossender Neuriten mit steigender BDNF-Konzentration zunimmt.^[41,43,44,54] Trotz dessen, dass von den BDNF-Fasern lediglich Mengen im geringen ng-Bereich freigesetzt werden konnten, liegt die Anzahl an ausgewachsenen Neuriten auf vergleichbarer Höhe der Proben, welche mit 25 bzw. 50 ng·mL⁻¹ BDNF behandelt wurden. Es kann vermutet werden, dass im ELISA nicht die gesamte Menge an freigesetztem BDNF detektiert wurde. Möglicherweise spielt auch die Art der Freisetzung eine Rolle. Zusätzlich zeigt die Sholl-Analyse die Verzweigung der Neuriten mit zunehmendem Abstand vom Strangstück an. Es ist weiterhin zu beobachten, dass auch die maximale Neuritenlänge mit zunehmender BDNF-Konzentration ansteigt.^[448] Die längsten Neuriten der Proben, welche mit den un- sowie amino-modifizierten BDNF-Fasern behandelt wurden, sind jedoch im Vergleich zu ihren Kontrollen nur leicht erhöht. Möglicherweise liegt dies an der zu geringen BDNF-Konzentration. Weiterhin wurde aus den Daten ein Wert für die mittlere Neuritenaktivität generiert, welcher sich aus dem Produkt der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem zweiten Kreis und seinem Radius (r_2) errechnen lässt. Zudem wurde die normierte mittlere Neuritenaktivität als eine von der Größe des Strangstücks unabhängige Maßzahl eingeführt. Die erhaltenen Werte bilden sowohl die Anzahl als auch die Länge an aussprossenden Neuriten ab, sodass eine Gesamtaussage zur mittleren Aktivität der aussprossenden Neuriten pro Strangstück erhalten wird. Die Ergebnisse sind unabhängig von äußeren Faktoren und gehen einher mit

den zuvor quantifizierten Resultaten, wenngleich sie dem HS einen leichten neuroregenerativen Effekt zuschreiben, welcher in den vorherigen Untersuchungen nicht wirklich gesehen wurde. Insgesamt komplettieren sie die Gesamtaussage der Zellkulturuntersuchungen. Alles in allem muss bei der quantitativen Auswertung jedoch beachtet werden, dass eine zu geringe Ausleuchtung der Bilder sowie Abhebung der Strangstücke vom Hintergrund die anschließende Auswertung beeinflusst. Dazu gehört ebenfalls der Einfluss unterschiedlich großer Strangstücke sowie eine spontan auftretende Neuritenausprossung.

Für die Anwendung der neuronalen Leitstruktur im Rahmen des CIs ist es zudem von Bedeutung, dass die Neuriten in Richtung des BDNF-Konzentrationsgradienten zur Oberfläche des Implantats hin gelenkt werden, um schließlich dort anzuwachsen. Die vorliegenden Versuche zeigen jedoch kein gerichtetes Wachstum der Neuriten. Möglicherweise ist die Konzentration an BDNF zu gering oder es liegt eine zu große Durchmischung im Medium vor, sodass sich kein Konzentrationsgradient aufgebaut hat. In Zukunft können modifizierte Zellkulturuntersuchungen angeschlossen werden, bei denen u. a. die Menge an BDNF erhöht wird. Auch die Nutzung alternativer Wachstumsfaktoren, wie NT-3, welchem eine stärkere Wirkung auf das Neuritenwachstum zugeschrieben wird, kann in Betracht gezogen werden.^[248–251] Generell kann zudem an der Fluoreszenzmarkierung der Wachstumsfaktoren gearbeitet werden, um einen möglichen Gradienten sichtbar zu machen. Vorherige Arbeiten von Dr. NADESCHDA SCHMIDT beschäftigten sich bereits damit, BDNF mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren.^[165,450]

4.4 Ausrüstung der Polymerfasern mit Laminin als neuronales Adhäsionsmolekül

Nachdem die SGNs im Rahmen des CIs durch BDNF erfolgreich zum Überleben angeregt sowie deren Neuritenausprossung gefördert wurde, sollen die Neuriten entlang der polymeren, biodegradierbaren Leitstruktur zur Oberfläche des Implantats hinwachsen, um in Kontakt mit diesem die Übertragung des elektrischen Signals zu optimieren. Zur Unterstützung sollen die Fasern mit Laminin beschichtet werden. Als neuronales Adhäsionsmolekül dient das Laminin dem Wachstum der Neuriten entlang der neuronalen Leitstruktur.^[68–71] Ähnlich dem HS soll es dauerhaft stabil auf der Oberfläche der Fasern anhaften, um seine Funktion langanhaltend auszuüben. Somit beschäftigen sich die folgenden Kapitel sowohl mit der Immobilisation als auch mit der stabilen Anhaftung des Biomoleküls auf den un- sowie amino-modifizierten Polymerfasern. In der späteren Anwendung ist es denkbar, Fasern sowohl mit HS und Laminin

als auch mit Laminin allein einzusetzen. Trotz der Bindungsstellen des Laminins für Glykosaminoglykane, wie HS, wird im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, wie sich Laminin allein an die Fasern anbinden lässt.

4.4.1 Immobilisation von Laminin auf den Polymerfasern

Zunächst wurde die Anbindung von Laminin an die un- sowie amino-modifizierten Fasern untersucht. Um die Funktionsfähigkeit des Moleküls gegenüber den SGNs ganzheitlich nutzen zu können, wurde untersucht, inwieweit sich Laminin durch eine einfache Adsorption an die Fasern anlagert. Eine kovalente Anbindung kann möglicherweise dazu führen, dass die Moleküle einen Teil ihrer biologischen Aktivität verlieren.^[343,367] Dazu wurden sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern für eine Stunde bei 37 °C in einer Laminin-Lösung ($c_{\text{LAM}} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in PBS (+0.1 % BSA) inkubiert. Anschließend wurden die Fasern mit dem reinen Lösungsmittel gewaschen und analysiert.

Qualitativer ELISA

Zunächst diente ein qualitativer, Laminin-spezifischer ELISA auf den Fasern selber zur Überprüfung der Immobilisation des Biomoleküls. Dazu wurden die einzelnen Lösungen des ELISA-Kits direkt zu den Fasern in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die restliche Durchführung entsprach dem gängigen Protokoll. Fotografien der Proben nach Zugabe der *TMB color developing*-Lösung sind in Abbildung 76 zu sehen. Bei Anwesenheit von Laminin ist die Lösung für eine enzyminduzierte Blaufärbung verantwortlich.



Abbildung 76: Fotografien der un- sowie amino-modifizierten Fasern, welche mit Laminin behandelt wurden sowie deren Kontrollen, nachdem sie in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß einem direkten, Laminin-spezifischen ELISA unterzogen wurden. Die auftretende Blaufärbung der Lösung weist auf die erfolgreiche Immobilisierung des Biomoleküls an beide Fasertypen hin.

Neben den ELISA-Lösungen zeigen die vorliegenden Fotografien ebenfalls die darin enthaltenen Fasern. Diese sind nur unzureichend zu erkennen. Alle Proben, welche zuvor mit Laminin behandelt wurden, weisen eine Blaufärbung der Lösung auf, wohingegen die Fotografien der Kontrollen keine Färbung zeigen. Da die zu beobachtende blaue Färbung als Indikator für einen positiv verlaufenden ELISA-Test zu betrachten ist, welcher die Anwesenheit von Laminin anzeigt, kann geschlussfolgert werden, dass auf beiden Fasertypen erfolgreich Laminin immobilisiert wurde. Somit konnte mithilfe des Verfahrens die Anbindung des Biomoleküls visualisiert werden. Es können jedoch keine Aussagen über die Mengen des angebundenen

Laminin getätigt werden. Da bereits beobachtet wurde, dass größere Mengen an Laminin einen stärkeren Effekt auf Neurone ausüben,^[69,70] wäre es für die spätere Anwendung im Rahmen der neuronalen Leitstruktur unterstützend, eine Quantifizierung des immobilisierten Laminin vorzunehmen. Dies erfolgte mithilfe eines indirekten ELISAs unter Verwendung der Inkubationslösungen. Der verwendete Laminin-Typus konnte jedoch nicht in ausreichenden Mengen von dem zugehörigen spezifischen ELISA detektiert werden. Der ELISA ist somit im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendbar. In Zukunft soll ein kompatibles Laminin-ELISA-Paar gefunden und angewandt werden. Zusätzlich wurde mit fluoreszenzmarkiertem Laminin gearbeitet. Ebenfalls über die indirekte Vermessung der Inkubationslösungen mittel Fluoreszenzspektroskopie sollte die Menge des angebondenen Biomoleküls quantifiziert werden. Dies war jedoch nicht möglich, da die erhaltenen Daten einer zu großen Schwankung unterlagen. In Zukunft könnten die Versuche mit einem alternativen, fluoreszenzmarkiertem Laminin wiederholt werden.

Einfluss von Laminin auf die Kristallisation von PBS

Als unterstützende Nachweismethode wurde die Kristallisation von PBS auf den Fasern mit bzw. ohne Laminin untersucht. Nachdem die Fasern in der Laminin-Lösung inkubierten, wurden sie lediglich getrocknet und anschließend mithilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen auf ihre Oberflächenstruktur hin überprüft. Da als Lösungsmedium PBS verwendet wurde, sollte herausgefunden werden, ob es bei Anwesenheit von Laminin auf den Fasern in einer anderen Struktur auskristallisiert. Die zugehörigen Aufnahmen sind in Abbildung 77 dargestellt.

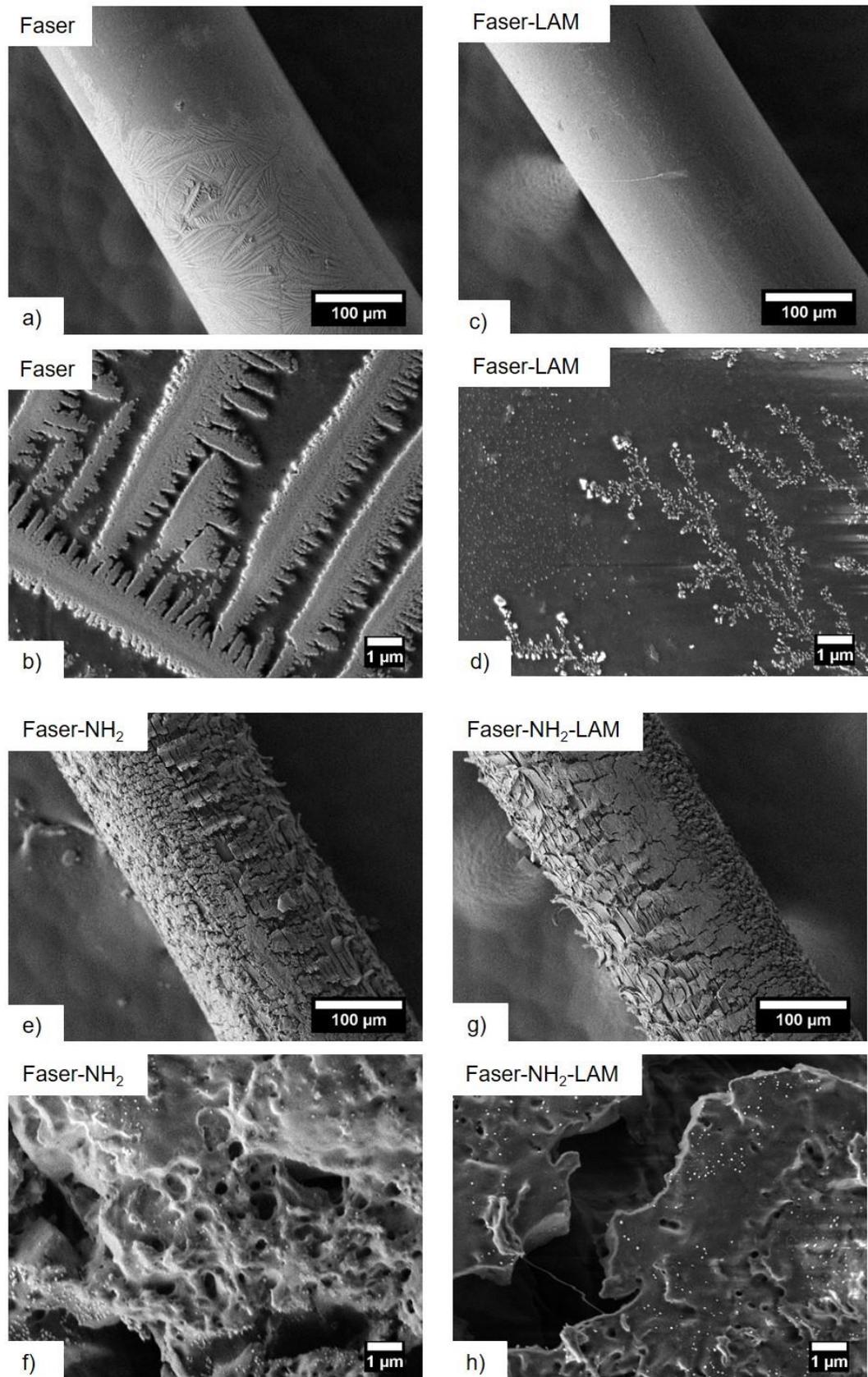


Abbildung 77: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in zwei verschiedenen Vergrößerungen der un- sowie amino-modifizierten Fasern, nachdem sie mit Laminin behandelt wurden sowie deren Kontrollen: a) und b): unmodifizierte Faser; c) und d): unmodifizierte Faser mit Laminin; e) und f): amino-modifizierte Faser; g) und h): amino-modifizierte Faser mit Laminin. Die Fasern wurden nach Entnahme aus der PBS-haltigen Inkubationslösung getrocknet sowie vermessen. Es ist auskristallisiertes PBS auf den Fasern zu erkennen, wobei sich bei den unmodifizierten Fasern verschiedene Strukturen ergeben haben.

Die vorliegenden REM-Aufnahmen zeigen zusätzliche, helle Stellen auf der Faseroberfläche, welche aufgrund der Inkubation der Fasern in einer PBS-Lösung als auskristallisierte Natrium- oder Kaliumsalze der Phosphate (Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat) sowie Chloride gedeutet werden können. Während sich auf den unmodifizierten Fasern großflächige Muster ergeben (a-d), weisen die amino-modifizierten Fasern lediglich einzelne Punkte auf (e-h). Es ist anzunehmen, dass die aufgeraute Struktur der Fasern einer Auskristallisation des PBS in bestimmten Formen bzw. Mustern entgegenwirkt. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich auf den unmodifizierten Fasern ohne Laminin ein breiteres Muster entwickelt hat als auf den zugehörigen Fasern mit Laminin. Hier ist ein anderes, filigraneres Muster zu erkennen. Zudem zeigen die Aufnahmen, dass sich die entstandenen Strukturen großflächig über die Faseroberfläche verteilen. Hieraus kann gedeutet werden, dass die Oberfläche der unmodifizierten Fasern ebenfalls großflächig mit Laminin beschichtet wurde. Der Wirkstoff übt einen Einfluss auf die Kristallisation der Phosphate/Chloride aus. Es ist bekannt, dass Schichten aus Polycarbonsäuren, wie PGA/PCL, und Peptiden, wie sie in Laminin vorkommen, die Kristallisation von anorganischen Salzen, wie Phosphaten, beeinflussen.^[453-456] Neben dem Strukturtyp werden zudem die Größe, die Form sowie die Organisation der Kristallite gesteuert.^[455] Wie auch in dem vorliegenden Experiment zu sehen ist, konnten SCHINKE *et al.*^[457] zeigen, dass Glykoproteine einer Kristallisation von Phosphaten entgegenwirken. Mithilfe der vorliegenden REM-Aufnahmen kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Beschichtung der amino-modifizierten Fasern mit Laminin erfolgreich verlaufen ist. Da der Grund allerdings in der rauen Oberflächenbeschaffenheit der Probe vermutet wird, kann zusammen mit den Ergebnissen aus dem qualitativen ELISA für beide Fasertypen eine erfolgreiche Adsorption des Laminin vermutet werden.

Wechselwirkung von Laminin mit der Faseroberfläche

Das Biomolekül kann verschiedene Wechselwirkungen mit den Polymerfasern eingehen. Aufgrund seiner Natur als Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 13 % kann Laminin auf vielfältige Weise Wasserstoffbrückenbindungen mit den funktionellen Gruppen auf der Faseroberfläche eingehen. So können sich diese zwischen den Amino-, Alkohol- und Säuregruppen aus den Protein- sowie Kohlenhydratanteilen des Laminins und den Carbonsäure-, Alkohol- sowie Aminogruppen auf der Faseroberfläche ausbilden.^[69,103,104,219] Zusätzlich weist Laminin mit einem isoelektrischen Punkt bei pH = 5 in PBS, welches selbst einen pH-Wert von 7.4 aufweist, eine negative Nettoladung auf und kann auf diese Weise elektrostatische Wechselwirkungen mit ggf. positiv geladenen Aminogruppen auf der Faseroberfläche eingehen.^[220] Zusätzlich enthält die *Coiled-Coil*-Struktur des Laminins ebenfalls hydrophobe Anteile, um diese zu stabilisieren.^[223,224] Diese Anteile können somit hydrophobe Wechselwirkungen mit den hydrophoben, polymeren Anteilen der Fasern eingehen. Die verschiedenen

Wechselwirkungen des Laminins mit der Oberfläche der un- sowie amino-modifizierten Fasern sind schematisch in Abbildung 78 dargestellt.

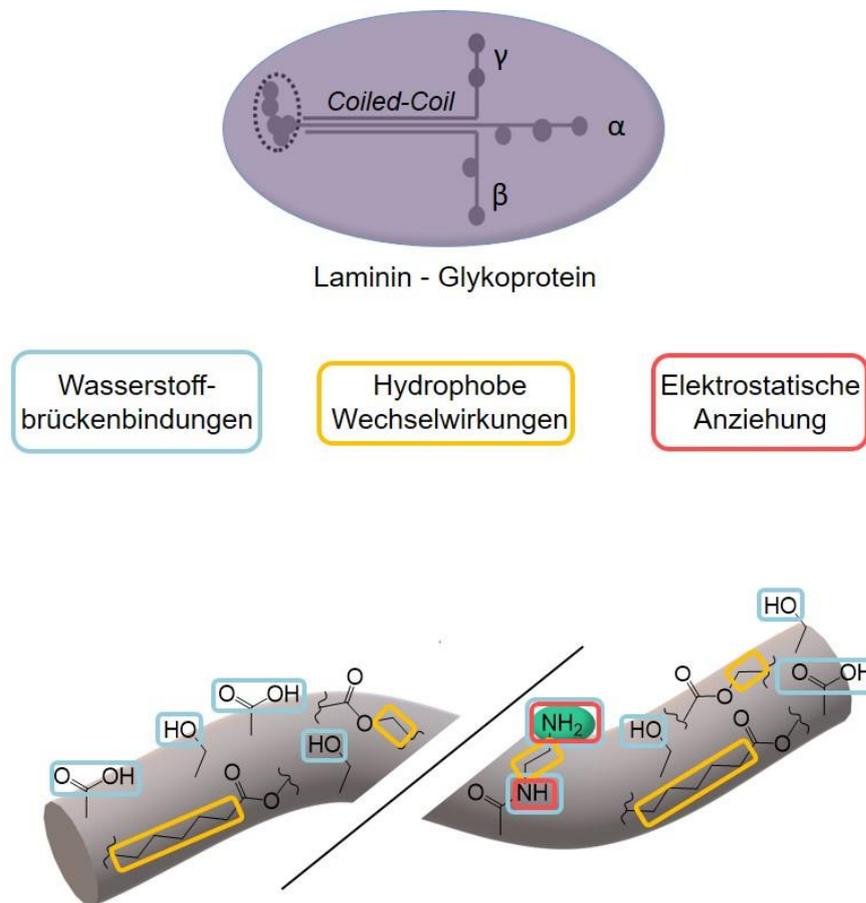


Abbildung 78: Schematische Darstellung der attraktiven Wechselwirkungen zwischen Laminin (vgl. Abbildung 13)^[68] und den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der unmodifizierten (links) sowie amino-modifizierten (rechts) Polymerfasern.^[69,103,104,219,220,223,224]

Vergleichend konnten in der Vergangenheit ebenfalls Polymere wie PLA,^[257] PLGA^[256] sowie PCL^[276] adsorptiv mit Laminin beschichtet werden. Zudem unterstützten basische Aminogruppen die Adsorption des Biomoleküls.^[394,395] Hierdurch konnte in *in vitro* Untersuchungen die neuronale Adhäsion sowie Neuritenausprossung erhöht werden.^[106,256,394] Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, um das Biomolekül erfolgreich durch Adsorption auf die Fasern aufzubringen. Mithilfe seiner vermutlich erhaltenen biologischen Aktivität soll das Laminin somit in seiner späteren Anwendung am CI als neuronales Adhäsionsmolekül das Wachstum der Neuriten zur Implantatoberfläche unterstützen.

4.4.2 Stabilität des angebundenen Laminin

Für die Anwendung der Fasern als neuronale Leitstruktur im Rahmen des CIs, welche mithilfe von Laminin als Adhäsionsmolekül das Wachstum der Neuriten entlang ihrer Strukturen fördern sollen, ist eine zeitlich stabile Immobilisation des Biomoleküls auf den Fasern nötig. Somit wurde nach der erfolgreichen Anbindung des Biomoleküls auf der Faseroberfläche zudem getestet, ob dieses auch über einen längeren Zeitraum stabil anhaftet. Dazu wurden die beschichteten Fasern einem Freisetzungsexperiment unterzogen. Dieses fand unter physiologischen Bedingungen statt, um die Umgebung im Innenohr des Menschen nachzuahmen. Während des Experiments wurden fünf Fasern in jeweils 1 mL PBS (+0.1 % BSA) bei 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurde die Lösung entnommen, eingefroren und durch eine frische Lösung ersetzt sowie der Vorgang wiederholt. Wie zuvor beschrieben, war eine quantitative Bestimmung des Laminin mittels ELISA nicht möglich, sodass für diese Versuche fluoreszenzmarkiertes Laminin verwendet wurde. Es wurde durch Fluoreszenzspektroskopie in den *Release*-Lösungen detektiert. Dazu stellt Abbildung 79 graphisch die freigesetzten Mengen an Laminin von den un- sowie amino-modifizierten Fasern über einen Zeitraum von 105 Tagen dar.

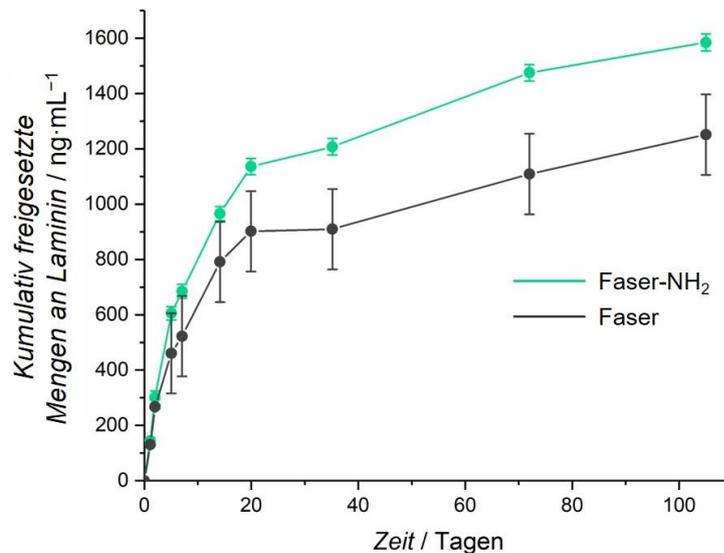


Abbildung 79: Graphische Darstellung der kumulativ freigesetzten Mengen an fluoreszentem Laminin über einen Zeitraum von 105 d in PBS (+ 0.1 % BSA). Es sind Freisetzungskurven der unmodifizierten (grau) sowie amino-modifizierten Fasern (grün) gezeigt, welche zuvor mit Laminin beschichtet wurden. Von beiden Fasertypen wird kontinuierlich Laminin freigesetzt, wobei die *Release*-Kurve nach einem Zeitraum von 21 d abflacht. Nachweisgrenze des fl. Laminin: 5.5 ng·mL⁻¹, Bestimmungsgrenze des fl. Laminin: 16.4 ng·mL⁻¹.¹¹

Sowohl von den un- als auch von den amino-modifizierten Fasern wird über den betrachteten Zeitraum kontinuierlich Laminin freigesetzt. Beide *Release*-Kurven zeigen eine Freisetzung

¹¹ Die Bindung zwischen LAM und dem Rhodamin wird unter den gegebenen Bedingungen als stabil angesehen, da eine kovalente Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes an das Biomolekül erfolgte.^[461]

mit einer Kinetik erster Ordnung, welche durch die Diffusion des Laminin von den Polymerfasern hervorgerufen wird. Dabei ist die Diffusion abhängig von der Konzentration des Wirkstoffes. Zudem kann sich dieses Freisetzungsprofil auch durch die Auflösung der Fasern und der daraus resultierenden Abgabe des Laminin entwickeln.^[436] Insgesamt wurden von den unmodifizierten Fasern 1251.5 ± 145.6 ng an Laminin freigesetzt. Von den amino-modifizierten Fasern wurde mit 1584.8 ± 30.9 ng eine größere Menge an Laminin abgegeben. Möglicherweise adsorbierte der abgegebene Wirkstoff lediglich über schwache Wechselwirkungen an den Fasern und wurde aufgrund dessen wieder freigesetzt. Wie zuvor beschrieben, kann das Laminin jedoch ebenfalls durch die Auflösung der Fasern in das umgebende Medium abgegeben werden.^[255,287] Dies würde zudem erklären, warum von den amino-modifizierten Fasern mehr Wirkstoff freigesetzt wird als von den unmodifizierten Fasern. Wie schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, degradieren die amino-modifizierten Fasern schneller als die unmodifizierten Fasern. Zudem löst sich die Modifizierung, welche auch eine Wechselwirkung mit dem Laminin eingehen kann, von der Faser ab und bewirkt dadurch eine gleichzeitige Freisetzung des Wirkstoffes. Insgesamt zeigen die Ergebnisse durch den *Release* von Laminin, dass dieses zuvor, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, erfolgreich angebunden wurde. Aufgrund der eingesetzten Mengen konnten höchstens 5000 ng an Laminin auf den Fasern immobilisiert worden sein. Somit wurden mindestens 25.0 ± 2.9 % an Laminin von den unmodifizierten und 31.7 ± 0.6 % des Wirkstoffes von den amino-modifizierten Fasern wieder abgegeben. Bei einer vollständigen Beladung der Fasern mit dem Wirkstoff wären somit nach 105 Tagen Freisetzung immer noch in etwa 70 % des Laminin auf den Fasern immobilisiert, sodass eine stabile Anbindung des Wirkstoffes an die Fasern vermutet werden kann. Da jedoch nicht bekannt ist, auf welchen Wert sich die tatsächliche Beladungsmenge beläuft, kann der prozentuale Anteil des freigesetzten Laminin von der Gesamtmenge an angelagertem Biomolekül höher ausfallen. Eine zeitliche Stabilität des angebundenen Laminins kann nur vermutet werden. Weitere Untersuchungen zur Menge des angebundenen Laminins wären in diesem Fall unterstützend. Vergleichbare Ergebnisse zu dieser Arbeit liefert die Arbeitsgruppe um LENZA *et al.*^[395] Sie konnten erfolgreich Laminin auf Oberflächen mit OH- oder NH₂-Gruppen adsorbieren und bestätigten, dass 99 % des eingesetzten Biomoleküls (19.8 µg) auf den Oberflächen angelagert wurde. Zudem konnten sie eine stabile Anbindung des Biomoleküls beobachten. Vergleichbar zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit wurde der Wirkstoff kontinuierlich, mit einer *Release*-Kinetik 1. Ordnung, abgegeben. Ausgelöst worden sei die Freisetzung des Laminin durch die degradierende Matrix. In Anlehnung an die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sind nach 30 Tagen noch 60-70 % des Laminin auf dem Substrat vorhanden, weswegen eine Langzeit-Anwendung des Materials im biomedizinischen Bereich postuliert wird. Zusätzlich zeigen die Untersuchungen, dass die angewendete Immobilisationsmethode der einfachen Adsorption die Konformation und damit wahrscheinlich auch die biologische

Aktivität des Laminin nicht beeinflussen. Somit geben die erhaltenen Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit einen ersten Hinweis darauf, dass Laminin möglicherweise stabil auf der Faser-oberfläche angebunden wurde. Weiterhin kann vermutet werden, dass das Laminin dabei seine biologische Aktivität beibehält, um das Wachstum der Neuriten auf ihrem Weg entlang der neuronalen Leitstruktur zur Implantatoberfläche hin als Adhäsionsmolekül zu unterstützen. Nach dem vorliegenden Berechnungsmodell wären somit nach 105 Tagen immer noch $\approx 3.5 \mu\text{g}$ (70 %) des Laminin auf den Fasern immobilisiert. Untersuchungen ergeben, dass jedoch schon $1.5 \pm 0.54 \mu\text{g}$ an adsorbiertem Laminin ausreichen, um neuronales Wachstum zu fördern.^[257] Laufende Untersuchungen demonstrieren den positiven Effekt von angebundenem Laminin auf Faseroberflächen auf den Neuritenauswuchs von SGNs entlang der Faseroberfläche.^[440] Um die vorliegenden Vermutungen zu bestätigen, können in der Zukunft weitere Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung des angelagerten Laminins an die Fasern mithilfe von kompatiblen ELISA-Kits sowie Zellkulturuntersuchungen durchgeführt werden. Alternativ kann das Laminin zudem kovalent an die Fasern angebunden werden, was neben einer stabilen Immobilisation jedoch ebenfalls eine Verringerung der biologischen Aktivität zur Folge haben kann.^[343,367,440] Eine natürlichere Methode würde in der Immobilisation des Laminins auf den mit HS-beschichteten Fasern liegen, da Laminin am Ende seines langen Armes eine Bindungsstelle für verschiedene Proteoglycane aufweist.^[69,233]

4.4.3 Zusammenfassung

Um die Neuriten der SGNs in der menschlichen Cochlea anzuregen entlang der Polymerfasern zur Oberfläche des CIs zu wachsen, werden diese mit dem neuronalen Adhäsionsmolekül Laminin beschichtet. Das Biomolekül soll stabil auf der Oberfläche der Fasern anhaften, um langanhaltend seine Funktion ausüben zu können. Dazu wurden sowohl die un- als auch die amino-modifizierten Fasern in einer Laminin-Lösung inkubiert, damit dieses durch verschiedene Wechselwirkungen an der Faseroberfläche adsorbiert. Mithilfe der verwendeten Methode soll die biologische Aktivität des Biomoleküls erhalten bleiben. Visualisiert werden konnte die erfolgreiche Adsorption des Laminin an beide Fasertypen mithilfe eines qualitativen, Laminin-spezifischen ELISAs. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PBS auf den unmodifizierten Fasern, welche zuvor mit Laminin behandelt wurden, in einem anderen Muster auskristallisierte als auf den Kontrollfasern. Dies kann auf eine erfolgreiche Immobilisation des Biomoleküls auf den Fasern zurückzuführen sein. Laminin hat somit eine Wirkung auf die Kristallisation des PBS auf der Oberfläche. Der Effekt war nicht auf den amino-modifizierten Fasern zu beobachten, da die aufgeraute Struktur einer geordneten Kristallisation entgegenwirkt. Zusammengefasst wird jedoch vermutet, dass Laminin erfolgreich auf beiden Fasertypen immobilisiert wurde. Für quantitative Untersuchungen kann in der Zukunft ein kompatibles Laminin-ELISA-Paar unterstützend wirken. Weiterhin zeigten *Release*-Experimente, dass

geringe Mengen an Laminin über einen Zeitraum von 105 Tagen von beiden Fasertypen freigesetzt wurden. Dies geschah kontinuierlich mit einer Kinetik 1. Ordnung. Hierfür erfolgte die Verwendung von Fluoreszenz-markiertem Laminin. Möglicherweise wurde von den amino-modifizierten Fasern eine größere Menge an Laminin in das umgebende Lösungsmittel abgegeben (Faser: $\approx 1.3 \mu\text{g}$, Faser-NH₂: $\approx 1.6 \mu\text{g}$), da sich diese Fasern in PBS schneller auflösen und so eine schnellere Freisetzung des Biomoleküls veranlassen. Bei einer vollständigen Beladung der Fasern mit Laminin wären demnach $\approx 70\%$ des Biomoleküls am Ende der Freisetzungsexperimente auf den Fasern vorhanden. Da jedoch keine Quantifizierung der angebondenen Mengen an Laminin erfolgte, kann eine zeitlich stabile Anbindung lediglich vermutet werden. Unterstützend zeigen vorangegangene Untersuchungen, dass Laminin durch eine einfache Adsorption stabil auf einer Matrix aufgebracht werden kann^[395] und schon in geringen Mengen neuronales Wachstum,^[257] auch entlang einer Faseroberfläche,^[440] fördern kann. Somit zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine erfolgreiche Möglichkeit auf, Polymerfasern für eine Anwendung als neuronale Leitstruktur mit Laminin zu beschichten. Alternativ kann Laminin unter Berücksichtigung eines möglichen Verlusts an biologischer Aktivität in Zukunft ebenfalls kovalent an die Fasern angebunden werden.^[343,367,440] Weiterhin ist es möglich, das Biomolekül an die mit HS-beschichteten Fasern über eine natürliche Bindungsstelle im Laminin anzubinden.^[69,233]

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer neuronalen Leitstruktur für die Neuroprotektion und –regeneration. Die durchgeführten Studien fanden dabei im Hinblick auf die Optimierung des Cochlea-Implantats statt. Mithilfe der zu entwickelnden Struktur sollen der Elektroden-Nervenkontakt und damit einhergehend die Leistung des Implantats verbessert werden. Als Grundlage dienen biodegradierbare Polymerfasern, welche, senkrecht auf der Oberfläche der CI-Elektrode aufgebracht, die Gerüststruktur des Nervenleitsystems durch die *scala tympani* hindurch bilden sollen. Die Arbeit hat zwei Schwerpunkte: Einerseits die Modifizierung dieser Fasern durch eine Aminolyse und die tiefgehende Charakterisierung der un- und der amino-modifizierten Fasern; andererseits die Beschichtung der Fasern mit unterschiedlichen Biomolekülen aus der ECM sowie Wachstumsfaktoren. Die Aufgabe dieser Moleküle ist es, sowohl das Überleben der dort ansässigen SGNs sowie deren Neuritenausprossung entlang der Leitstruktur zur Oberfläche des Implantats hin zu fördern, indem sie eine natürliche Umgebung für die Zellen kreieren. Moleküle der ECM umfassen HS sowie Laminin, wohingegen als Wachstumsfaktor BDNF gewählt wurde. Die neuronale Leitstruktur bietet zudem die Option in folgenden Studien durch weitere Wirkstoffe ergänzt zu werden, sodass letztendlich ein *Drug Delivery*-System bereitgestellt werden kann, welches bewirkt, dass die Neuriten auf der Oberfläche der CI-Elektrode anwachsen und ausreichend stimuliert werden. Die Gerüststruktur wird somit nicht mehr benötigt und kann vollständig vom Körper abgebaut werden.

Als Basis der hier zu entwickelnden neuronalen Leitstruktur wurde biodegradierbares Nahtmaterial bestehend aus Polyglykolsäure (PGA) und Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) gewählt, welches bereits unter dem Namen Glycolon® bekannt ist. Die aus der Charakterisierung der Fasern erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Anteil an PGA in den Polymerfasern höher ausfällt. Dies konnte allerdings lediglich qualitativ bestimmt werden. Um die ausgewählten Wirkstoffe mit verschiedenen Eigenschaften adäquat anbinden zu können, wurden neben den unmodifizierten Fasern auch solche mit frei zugänglichen Aminogruppen verwendet. Diese wurden hergestellt, indem die unmodifizierten Fasern einer Aminolyse mittels Ethylendiamin nach ZHU *et al.*^[353] unterzogen wurden. Die kovalente Anbindung von Ethylendiamin hatte sowohl die Verkleinerung des Durchmessers der Fasern als auch die Aufrauung der Faseroberfläche zur Folge. Laut anderer Studien kann sich letzterer Aspekt in der biomedizinischen Anwendung positiv auf die Adhäsion der Neuriten entlang der Leitstruktur auswirken.^[56,423] Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Oberflächenladung der aminolysierten Fasern zu positiveren Werten verschoben hat ($\Delta \zeta \approx 10$). Die Menge der eingeführten Aminogruppen wurde über die C/N-Elementaranalyse abgeschätzt und beläuft sich auf

0.620 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$. Einer ähnlichen Studie zufolge wurden genügend NH_2 -Gruppen generiert, um einen positiven Einfluss auf die Anbindung von Wirkstoffen auszuüben.^[422] In Zukunft kann die quantitative Bestimmung der angebotenen Aminogruppen mit weiteren Untersuchungen, wie z. B. dem Ninhydrintest^[410] oder mit dem Farbstoff Orange II^[458] optimiert werden. Dann kann auch der Einfluss von variierenden Reaktionsparametern auf den Gehalt an eingeführten NH_2 -Gruppen untersucht werden. Außerdem ist es möglich, alternative Diamine, wie z.B. das längere 1,6-Hexandiamin anzubinden.^[410] Die längere Alkylkette könnte stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit den ausgewählten Wirkstoffen eingehen und so deren Anlagerung beeinflussen. Zudem wird der Abstand zur Faseroberfläche vergrößert. Somit könnte einer sterischen Behinderung der Biomoleküle untereinander entgegengewirkt bzw. ihnen mehr Platz verschaffen werden. Die beschriebenen Ansätze dienen dazu, die Anbindung der Biomoleküle zu optimieren und somit die Anwendung der Fasern als neuronale Leitstruktur zukünftig zu verbessern.

Wie zu Anfang beschrieben, soll die entwickelte Faserstruktur nach der erfolgreichen Regeneration der SGNs vom Körper abgebaut werden. Vorliegende Ergebnisse der *in vitro* Degradationsversuche der Fasern zeigen, dass sich das Material nach 14 Wochen in PBS durch eine hydrolytische Esterspaltung fast vollständig zersetzt. Sowohl IR- als auch pH-Wert-Messungen des umgebenden Lösungsmittels lassen darauf schließen. Der pH-Wert nimmt mit fortschreitender Zeit ab, was sich auf die aus dem PGA-Anteil entstehenden sauren Degradationsprodukte zurückführen lässt. Da der Durchmesser der Fasern während der Lagerung in PBS abnahm, wird eine Oberflächendegradation vermutet.^[80] Aufgrund von Rissen quer und längs zur Faserrichtung, die mit der Zeit entstanden, kann jedoch ebenfalls ein *Bulk*-Erosionsprozess stattgefunden haben.^[80,273,426] Mithilfe zukünftiger XRD/DSC Messungen an den Fasern kann dies genauer untersucht werden. Während der Degradation werden die amino-modifizierten Fasern schneller abgebaut als die unmodifizierten Fasern. Während erstere schon nach 10 Wochen in kleinen Bruchstücken vorliegen, sind letztere erst nach 14 Wochen zerteilt vorzufinden. Zurückgeführt werden kann dies auf die bereits beschädigte Oberflächenstruktur der aminolysierten Fasern. Zusätzlich löst sich ein Teil der basischen Oberflächenmodifikation ab. IR-Messungen zeigen eine Abnahme bzw. das Verschwinden der Amid-Banden aus den Spektren der amino-modifizierten Fasern mit deren fortschreitender Lagerung in PBS an. Außerdem sinkt der pH-Wert der umgebenden Lösung in diesem Fall weniger stark ab als dies bei den unmodifizierten Fasern geschieht. In Zukunft kann mit Hilfe der zuvor erwähnten Analysemethode untersucht werden, wie viele Aminogruppen nach unterschiedlichen Degradationsdauern auf der Oberfläche verbleiben. Dies sollte sich parallel auch mit der oberflächenempfindlichen Röntgen-Photonenspektroskopie untersuchen lassen. Aufgrund der späteren biomedizinischen Anwendung würden zusätzliche *in vivo* Degradationsversuche Aufschluss darüber

geben, wie sich der Abbau der Fasern im Körper verhält. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass es sich bei beiden Fasertypen um geeignete Basismaterialien für eine biodegradierbare Leitstruktur handelt.

Um diese beiden Fasertypen für ihre Anwendung im Hinblick auf das Cochlea-Implantat auszurüsten, wurde zunächst daran gearbeitet, HS fest auf die Oberfläche aufzubringen. Es soll die ECM imitieren und im Rahmen einer Matrixtherapie eine natürliche Zellumgebung imitieren.^[88,91,102] Es wurde ausgewählt, da aus der Literatur bereits bekannt war, dass es der neuronalen Regeneration dient^[102,169] und in der Lage ist, Wachstumsfaktoren wie BDNF anzubinden, zu stabilisieren und wiederum kontrolliert freizusetzen.^[93–96,160,179–181] Um zunächst ein besseres Verständnis für das Verhalten von HS in unterschiedlichen Lösungsmitteln zu erlangen und damit die Anbindung des Biomoleküls an die Fasern besser untersuchen zu können, wurden zu Anfang Messungen mittels DLS durchgeführt. Dabei wurden im sauren Milieu höhere dynamische Radien ($d \approx 200$ nm) bestimmt als im basischen Milieu ($d \approx 50$ nm). Möglicherweise führt die geringere Ladung des HS in der sauren Umgebung zu einer stärkeren Aggregation. Anschließend wurde an der kovalenten Anbindung von HS an beide Fasertypen, un- sowie aminomodifiziert, gearbeitet. Es wurde in MES-Puffer bei pH 4 gearbeitet. Lediglich unter Zuhilfenahme des Kupplungsreagenz EDC sowie Stabilisators NHS konnte HS an die Fasern angebunden werden, wie qualitativ nachgewiesen werden konnte. ZP-Messungen geben einen Hinweis darauf, dass die Oberflächenchemie auf beiden Faseroberflächen vom HS dominiert wird und wohl vergleichbare Mengen des Moleküls angebunden werden konnten. Die ZP-Kurven der beiden Fasersorten mit HS zeigen im vorliegenden pH-Wertbereich ein sehr ähnliches Verhalten. Weiterhin wird daher vermutet, dass der Anteil der COOH- sowie NH₂-Gruppen im HS, welche an der kovalenten Bindung zur Faseroberfläche beteiligt sind, gering ist im Vergleich zu der Gesamtzahl an verfügbaren Gruppen. Das Molekül sollte daher noch genug reaktive Gruppen aufweisen, um einen Großteil seiner biologischen Aktivität für eine spätere Wechselwirkung mit weiteren Molekülen oder auch Zellen zu behalten.^[86] Dass die Polymermoleküle jeweils nur über wenige Gruppen angebunden sind, gibt diesen auch konformative Freiheiten wie sie ähnlich in der ECM vorhanden sein sollten; diese sind ebenfalls wichtig für ein „naturnahes“ Verhalten des HS. Mithilfe der Adsorption von positiv geladenen, amino-modifizierten NPSNPs konnte visualisiert werden, welche Bereiche der Faser mit dem negativ geladenen HS beschichtet wurden. Die Partikel haben sich in größeren Agglomeraten auf der beschichteten Faseroberfläche angelagert. Allerdings zeigten die verschiedenen Versuche zur Dekoration der Faseroberflächen mit unterschiedlichen und unterschiedlich geladenen Nanopartikeln nicht ganz einheitliche Ergebnisse. Zukünftige Studien sollten sich mit der Quantifizierung von HS auf den Fasern beschäftigen, um die vorliegenden Ergebnisse zu ergänzen. Der bereits erfolgreich qualitativ angewendete TB-Test könnte hierzu quantitativ ausgewertet werden.^[380] Auch die Nutzung von fluoreszentem HS kann in Zukunft

Hinweise darauf geben, welche Mengen des Biomoleküls angebunden werden. So wäre eine Modifizierung der Synthese denkbar, indem die Fasern vorzeitig mit EDC/NHS aktiviert und anschließend separat mit dem fluoreszenzmarkierten HS behandelt werden.^[257,438,439] Mithilfe spektroskopischer Analyse der Inkubationslösung kann dann herausgefunden werden, wie viel fl. HS aus der Lösung angebunden wurde. Hierbei wird das zu detektierende Signal nicht durch EDC/NHS gestört.^[440] Liegt eine ausreichende Methodik zur Quantifizierung vor, so kann zudem der Einfluss der Reaktionsparameter auf die Menge an angebundenem Biomolekül untersucht werden.

Für die spätere Anwendung der Fasern als neuronale Leitstruktur ist es von Bedeutung, dass HS stabil auf deren Oberfläche anhaftet, um dauerhaft lokal seine Wirkung auszuüben. So haben Freisetzungsexperimente unter physiologischen Bedingungen (PBS, 37 °C) gezeigt, dass von beiden Fasertypen innerhalb von 105 d lediglich 250 ng an HS¹² in das umgebende Lösungsmittel abgegeben wurden. Dabei wurde beobachtet, dass die unmodifizierten Fasern mehr HS freisetzen als die amino-modifizierten Fasern. Es kann vermutet werden, dass dies an den geringeren Wechselwirkungen zwischen dem Biomolekül und der Oberfläche der unmodifizierten Fasern liegt. Es konnte mithilfe von ZP-Messungen sowie Anlagerungsversuchen von Nanopartikeln herausgefunden werden, dass HS auf beiden Fasertypen nach 21 d erhalten bleibt, die Fasern jedoch degradieren. Die Oberflächenchemie beider Fasertypen wird laut ZP-Messungen immer noch von HS dominiert. Möglicherweise schützt das Glykosaminoglykan die Fasern vor einer stärkeren Degradation. Somit lassen die erhaltenen Ergebnisse vermuten, dass in den ersten 21 d lediglich adsorptiv angelagertes HS in das umgebende Lösungsmittel freigesetzt wurde. Anschließend bleibt kovalent angebundenes HS auf der Faseroberfläche erhalten. Das ECM-Molekül HS kann den Neuriten somit als fester Bestandteil der neuronalen Leitstruktur auf ihrem Weg zur Implantatoberfläche unterstützen. Zusätzlich können die Erkenntnisse aus den Arbeiten von DR. N. SCHMIDT mit den aktuellen Daten kombiniert werden, indem NPs mit eingelagertem Wirkstoff an die Fasern adsorbieren und so ein neuartiges *Drug Delivery* System etabliert wird. Von den NPs konnten schon große Mengen an BDNF freigesetzt werden, welche einen positiven Effekt auf die SGNs zeigten.^[59]

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Wachstumsfaktor BDNF in das neuronale Leitsystem zu integrieren, um sowohl die Überlebensrate der SGNs zu erhöhen als auch die Aussprossung der Neuriten zu fördern. Dafür wurde ein Implantat-assoziiertes Freisetzungssystem für BDNF etabliert. In einem biomimetischen Ansatz dienen die zuvor mit HS beschichteten Fasern als Plattform. Das Glykosaminoglykan besitzt die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren anzubinden, zu stabilisieren und deren Freisetzung zu kontrollieren.^[93–96,160,179–181] BDNF selbst wird innerhalb

¹² Für diese Untersuchungen wurde fluoreszenzmarkiertes HS (fl. HS) verwendet. Es folgte eine spektroskopische Analyse der *Release*-Lösungen.

eines gesunden Ohres von den existierenden Haarzellen geliefert und entfaltet seine Wirkung während des axonalen sowie dendritischen Wachstums der SGNs.^[43] Laut Literatur erhöht BDNF die Überlebensrate der SGN^[67], fördert ihre synaptische Plastizität sowie die Neurotransmission^[54], die Neurogenese und das Auswachsen von Neuriten.^[41,43,44,54] Zunächst wurde somit daran gearbeitet, das BDNF auf den Fasern zu immobilisieren. Unter Nutzung eines spezifischen ELISAs konnte sowohl visualisiert als auch quantifiziert werden, dass der Wachstumsfaktor erfolgreich an die un- sowie amino-modifizierten Fasern mit HS angebunden werden konnte. Es wurde nahezu die gesamte Menge von 500 ng BDNF immobilisiert. Die wesentliche Funktion von HS zeigte sich zudem darin, dass lediglich sehr geringe, kaum messbare Mengen an BDNF auf den Fasern ohne HS-Vorbeschichtung immobilisiert wurden. Dies unterstreicht die Bedeutung des biomimetischen Ansatzes dieser Arbeit.

Um in der Anwendung im Innenohr mit den dort ansässigen SGNs in Kontakt zu kommen und seine Wirkung zu entfalten, soll das BDNF über einen längeren Zeitraum von den Fasern freigesetzt werden. Unter physiologischen Bedingungen ergab sich, dass der Wachstumsfaktor über einen Zeitraum von 105 d in einer kontinuierlichen, länger andauernden Freisetzung mit einer Kinetik 1. Ordnung wieder von den HS-Fasern abgegeben wird. Während von den unmodifizierten Fasern in etwa $9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF freigesetzt werden, lösten sich von den amino-modifizierten Fasern ca. $3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF. Beide Kurven zeigen zudem an, dass die Freisetzung noch nicht abgeschlossen ist. Auch innerhalb dieser Experimente zeigt sich die Rolle von HS als Vertreter der extrazellulären Matrix, um nicht nur die Speicherung sowie Stabilisierung, sondern auch die langsame Freisetzung des Wachstumsfaktors zu kontrollieren. Von den Fasern ohne HS werden im Gegensatz dazu relativ schnell in den ersten 5 Tagen geringe Mengen an BDNF in einem *initial-burst-Release* abgegeben (Faser: $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, Faser-NH₂: $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Die vorliegenden Experimente zeigen, dass insgesamt von den amino-modifizierten Fasern im Gegensatz zu den unmodifizierten Fasern geringere Mengen an BDNF freigesetzt werden. Dies kann damit begründet werden, dass die Abgabe des Biomoleküls hier stärker über hydrophobe als über elektrostatische Wechselwirkungen kontrolliert wird. Neben dem Abbau der Fasern muss zudem eine mögliche Denaturierung der BDNF-Moleküle sowie der Einfluss von BSA während des Beladungs- sowie Freisetzungsvorgangs bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.^[165,442,443] Insgesamt kann BDNF in einem biomimetischen Ansatz langanhaltend von den mit HS vorbeschichteten Fasern freigesetzt werden, so dass diese den Anforderungen im Rahmen des CIs genügen, um die dort ansässigen SGNs kontinuierlich mit dem Wirkstoff zu behandeln. Somit schlossen sich Zellkulturuntersuchungen an, um sowohl den neuroprotektiven als auch den neuroregenerativen Effekt des BDNFs zu testen.

Zunächst können die Polymerfasern aufgrund der durchgeführten Zellkulturuntersuchungen als geeignet für eine Anwendung hinsichtlich der SGNs eingeordnet werden, da ein Hauptbestandteil der Fasern, die Polyglykolsäure, keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen ausübt. Da die Neuriten entlang der beschichteten Fasern zur Oberfläche des Implantats wachsen sollen, ist es einerseits von Bedeutung, in welcher Weise sich der direkte Kontakt auf die SGNs auswirkt. Andererseits bilden die einzelnen Zellen jedoch erst mit fortschreitender Zeit Neuriten aus, sodass auch die Wirkung von freigesetztem BDNF auf diese untersucht werden sollte. In beiden Fällen zeigt sich der neuroprotektive Effekt des Wachstumsfaktors. Die Überlebensraten der Zellen, welche in Kontakt zu den BDNF-haltigen Überständen aus der Freisetzungstudie standen, waren gegenüber den Kontrollen (unbeschichtet, mit HS beschichtet) erhöht. Hierbei wurden für die BDNF-haltigen Proben Überlebensraten von ca. 20 % erhalten, wohingegen bei den Kontrollen lediglich 5 % der SGNs überlebten. Da die erhaltenen Überlebensraten auf der Höhe der Positivkontrolle ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ an BDNF) liegen, von den Fasern in der vorliegenden Zeit jedoch nur wenige ng pro mL freigesetzt werden, kann ein synergetisch positiver Effekt von HS und BDNF vermutet werden.^[102] Auch geringe Mengen an freigesetztem BDNF nach 70 d erhöhten die Überlebensrate der SGNs. Hierbei ist zu erwähnen, dass die tatsächlich vorhandene Menge an BDNF einen proportionalen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen ausübt. HS allein zeigt keine neuroprotektive Wirkung. Bezüglich der Neuritenlänge ist anhand der vorliegenden Versuche offensichtlich kein positiver Effekt von BDNF auszumachen. Die gemessenen Neuritenlängen der BDNF-Proben liegen auf der gleichen Höhe wie die der Positivkontrolle sowie die der Mediumkontrolle. Alle Neuriten besitzen hier eine ungefähre Länge von $400 \mu\text{m}$. Die Neuritenlängen der Kontrollfasern (unbeschichtet, mit HS beschichtet) sind jedoch signifikant erniedrigt gegenüber der Mediumkontrolle.

Da die Neuritenaussprossung der SGNs zur Oberfläche des Implantats hin angeregt werden soll, folgten weitere Zellkulturuntersuchungen zum neuroregenerativen Effekt des BDNFs. Innerhalb einer Zellkulturschale wurden SGN-Strangstücke auf der einen und beschichtete Fasern auf der anderen Seite platziert. Nach mehrtägiger Inkubationszeit konnte sowohl qualitativ als auch quantitativ mithilfe der Sholl-Analyse festgestellt werden, dass die mit BDNF beschichteten Fasern die Neuritenaussprossung fördern. Im Gegensatz dazu zeigt HS keinen wirklichen neuroregenerativen Effekt. Während in Anwesenheit der BDNF-Fasern in etwa 26 Neuriten pro Strangstück auswuchsen, sind aus den Strangstücken, welche mit den Kontrollfasern (unbeschichtet, mit HS beschichtet) inkubiert wurden, im Mittel lediglich ca. 8 Neuriten ausgesprossen. Auch konnte kein synergetisch positiver Effekt von HS und BDNF auf die Neuritenaussprossung beobachtet werden. Möglicherweise liegt die vorhandene Konzentration an HS unter dem effektiven Wirkungsbereich,^[102] weil dieses ja kovalent angebunden ist

und nur in sehr geringen Mengen freigesetzt wird. Trotz unterschiedlichem BDNF-Freisetzungsverhalten von den Fasern mit bzw. ohne HS sind keine Auswirkungen hinsichtlich der Zellwirkung zu erkennen. Als Grund hierfür kann die geringe Inkubationszeit von 2-3 Tagen angesehen werden. Der BDNF-Release beider Fasertypen verläuft zu Anfang recht ähnlich, sodass der Unterschied in der Menge an freigesetztem BDNF zu gering ausfällt, um eine veränderte Zellwirkung hervorzurufen. Zukünftige Zellkulturuntersuchungen mit einer größeren Menge an Fasern bzw. längerer Inkubationszeit würden möglicherweise eine veränderte Zellwirkung erzeugen. Der Einfluss von HS auf die BDNF-Abgabe ist vor allem nach längerer Zeit zu beobachten. Auch Freisetzungsversuche unter Zellkulturbedingungen würden einen weiteren Aufschluss über die vorliegende Situation geben. Weiterhin konnte die quantitative Sholl-Analyse zeigen, dass die Anzahl an auswachsenden Neuriten mit steigender BDNF-Konzentration zunimmt.^[41,43,44,54] Hierbei liegen die erhaltenen Werte der BDNF-Fasern auf vergleichbarer Höhe der Proben, welche mit 25 bzw. 50 ng·mL⁻¹ BDNF behandelt wurden. Von den Fasern werden jedoch lediglich geringe Mengen im ng-Bereich freigesetzt. Möglicherweise übt die Art der Freisetzung ebenfalls einen Einfluss aus. Darüber hinaus steigt auch die maximale Neuritenlänge mit zunehmender BDNF-Konzentration an.^[448] In diesem Zuge liegen die Werte der Proben, welche mit den un- sowie amino-modifizierten BDNF-Fasern behandelt wurden, im Vergleich zu ihren Kontrollen (unbeschichtet, mit HS beschichtet) jedoch nur leicht erhöht vor. Im Falle der unmodifizierten BDNF-Fasern stieg die maximale Neuritenlänge im Mittel auf ca. 1330 µm. Die zugehörigen Kontrollen erzeugen eine maximale Neuritenlänge von ungefähr 950 µm. Bei den amino-modifizierten Fasern ergeben sich für die BDNF-Fasern Längen von ca. 1315 µm, wohingegen die Kontrollen eine maximale Neuritenlänge von 1100 µm erzeugen. Eine zu geringe BDNF-Konzentration könnte hier der Grund sein. Auch die weiteren eingeführten Maßzahlen, die mittlere Neuritenaktivität und die mittlere normierte Neuritenaktivität, die beide sowohl die Anzahl der aussprossenden Neuriten sowie deren Länge abbilden, zeigen den neuroregenerativen Effekt des BDNFs und unterstützen die erhaltenen Ergebnisse. Sie schreiben allerdings dem HS einen leichten neuroregenerativen Effekt zu, welcher mithilfe der anderen Bestimmungen nicht wirklich zu beobachten war. Die mittleren Neuritenaktivitäten sind Maßzahlen, die unabhängiger sind von äußeren Faktoren, da sie sich hauptsächlich auf den mittleren Kreis in der Sholl-Analyse beziehen (welcher automatisch generiert wird) und nicht nur die Anzahl der Schnittpunkte mit den Neuriten beinhaltet, sondern auch ein Maß für deren Längen. Die Gesamtaussage zur mittleren Aktivität der aussprossenden Neuriten komplettiert die Auswertung der Zellkulturuntersuchungen. Um die quantitative Auswertung der Zellbilder jedoch weiter zu optimieren, müsste in Zukunft jedoch sowohl die Ausleuchtung sowie Abhebung der Strangstücke vom Hintergrund verbessert werden.^[449] Da sich einige Strangstücke von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst haben, müssten diese in weiteren Experimenten stärker fixiert werden. Für

einen besseren Vergleich der Proben untereinander müsste zudem die Auswirkung der Strangstückgröße auf das Neuritenverhalten berücksichtigt werden. Insofern wäre es vorteilhaft, wenn sich die Strangstücke von vornherein mit möglichst einheitlicher Größe präparieren ließen. Für die einheitliche Festlegung des inneren Kreises, die in die Auswertung eingeht, wäre es darüber hinaus von Vorteil, wenn die Strangstücke möglichst rund wären. Noch nicht berücksichtigt wurde eine mögliche Abhängigkeit der Aktivität der SGNs von ihrer ursprünglichen Position im Strangstück, also ob diese beispielsweise eher vom basalen oder vom apicalen Ende der Cochlea stammen.

Um die im vorhergehenden Absatz beschriebenen quantitativen Aussagen zum Verhalten der Ganglienstrangstücke treffen zu können, war es notwendig, die für einzelne Neuronen etablierte Sholl-Analyse im Hinblick auf die hier durchgeführten Experimente weiter zu entwickeln. Dazu wurde zunächst in enger Kooperation mit einem kommerziellen Partner eine Software entwickelt, die eine automatisierte und weitgehend unabhängig vom Experimentator Erstausswertung der erhaltenen Zellkulturbilder erlaubt. Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurden verschiedene Ansätze erprobt, von denen die Vielversprechendsten Eingang in diese Arbeit fanden. Weitere Maßzahlen, die sich auf der Basis der erhaltenen Daten definieren lassen, sind aber denkbar, vielleicht auch solche, die den gesamten Verlauf der Plots wieder spiegeln, in denen die Anzahl der Schnittpunkte gegenüber dem Abstand aufgetragen sind.

Die Neuriten sollen in der Anwendung als neuronale Leitstruktur im Rahmen des CIs zudem in Richtung des BDNF-Konzentrationsgradienten zur Oberfläche der Implantatelektrode hingelenkt werden und schließlich dort anwachsen. Im Rahmen der verschiedenen Versuche konnte jedoch kein gerichtetes Wachstum der Neuriten beobachtet werden. Mögliche Gründe hierfür wurden eingehend diskutiert. In Zukunft können modifizierte Zellkulturexperimente, bei denen u. a. die Menge an BDNF erhöht wird oder aber das BDNF-Reservoir auf spezifische Weisen von den Strangstücken getrennt vorliegt, neue Aufschlüsse geben.^[450] Auch kann an der Fluoreszenzmarkierung von Wachstumsfaktoren gearbeitet werden, um einen möglichen Gradienten sichtbar zu machen.^[165,450] Insbesondere ist im Hinblick auf eine Induktion richtungsabhängigen Neuritenwachstums aber die Nutzung anderer Wachstumsfaktoren angezeigt. So wird NT-3 eine stärkere Wirkung auf das Neuritenwachstum zugeschrieben als BDNF. Es fördert nicht nur die Neuritenaussprossung, sondern unterstützt zudem ein gerichtetes Wachstum der Nervenenden.^[248–251] Mithilfe des Wachstumsfaktors konnten Neuriten in der Cochlea bereits eine Distanz von 12.5 mm überwinden.^[250] Ähnlich zu BDNF wird auch NT-3 innerhalb des Innenohres bereitgestellt. Es besitzt ebenfalls die Funktion, die Überlebensrate der SGNs zu erhöhen.^[67]

Nachdem die Wachstumsfaktoren das Überleben der SGNs verbessert und deren Neuritenaussprossung gefördert haben, sollen die Nervenstränge entlang der Fasern zur Oberfläche der

CI-Elektrode wachsen. Um den Neuriten unterstützende Ankerpunkte auf ihrem Weg zu bieten, sollen die Fasern ebenfalls mit dem neuronalen Adhäsionsmolekül Laminin beschichtet werden. Stabil anhaftend soll es langanhaltend seine Funktion ausüben können. Damit das Biomolekül in Bezug auf die gewünschte Wechselwirkung mit den Zellen seine biologische Aktivität beibehält, soll es adsorptiv auf die Fasern aufgebracht werden. Es konnte qualitativ gezeigt werden, dass Laminin sowohl an die un- als auch an die amino-modifizierten Fasern adsorbiert. Eine Visualisierung erfolgte mittels qualitativem, direkt auf den Fasern durchgeführtem ELISA. In Zukunft können quantitative Untersuchungen mithilfe eines kompatiblen Laminin-ELISA-Paares unterstützend wirken. Um zu überprüfen, ob das Biomolekül stabil auf der Oberfläche der Fasern anhaftet, schlossen sich Freisetzungsexperimente unter physiologischen Bedingungen an. Hierbei wurde fluoreszenz-markiertes Laminin verwendet. Über einen Zeitraum von 105 d können von beiden Fasertypen geringe Mengen an Laminin wieder in das umgebende Lösungsmittel abgegeben werden. Es erfolgte eine kontinuierliche Freisetzung mit einer Kinetik 1. Ordnung. Dass die amino-modifizierten Fasern größere Mengen an Laminin freisetzen als die unmodifizierten Fasern ($\approx 1.6 \mu\text{g}$ gegenüber $\approx 1.3 \mu\text{g}$) kann möglicherweise auf die schnellere Degradation dieser Fasern zurückzuführen sein. Wird eine vollständige Beladung der Fasern mit Laminin angenommen, so wären bei den genannten freigegebenen Mengen am Ende der Freisetzung immer noch $\approx 70\%$ des Biomoleküls auf beiden Fasertypen vorhanden. Eine zeitlich stabile Anbindung von Laminin kann jedoch lediglich vermutet werden, da eine Quantifizierung der angebotenen Mengen nicht erfolgen konnte. In der Literatur konnte bereits eine stabile Anhaftung von Laminin durch einfache Adsorption gezeigt werden.^[395] Schon in nur geringen Mengen fördert es das neuronale Wachstum,^[257] insbesondere auch entlang von Faserflächen.^[440] Die vorliegenden Versuche zeigen somit eine erfolgreiche Möglichkeit auf, die Polymerfasern im Rahmen einer neuronalen Leitstruktur mit Laminin zu beschichten. Unter Berücksichtigung eines möglichen Verlusts an biologischer Aktivität könnte vergleichend getestet werden, inwieweit sich Laminin kovalent anbinden lässt.^[343,367,440] Auch die Immobilisierung auf die mit HS vorbeschichteten Fasern über natürliche Bindungsstellen im Laminin wäre denkbar.^[69,233]

Die vorliegenden Ergebnisse, welche sich primär mit der Anbindung sowie Freisetzung der drei Biomoleküle HS, BDNF und Laminin beschäftigen, bieten die Möglichkeit die Inkubationsbedingungen im Einzelnen anzupassen, um so größere Mengen zu immobilisieren. Somit können in der biomedizinischen Anwendung später eventuell stärkere Effekte gegenüber den SGNs hervorgerrufen werden. Bezogen auf BDNF, bei dem laut ELISA die gesamte Menge immobilisiert werden konnte, wäre es interessant zu erfahren, wie sich eine Erhöhung der Inkubationskonzentration auswirken würde. Weiterhin wurde vielfach in PBS gearbeitet, dem BSA als Stabilisator beigefügt wurde. Da BSA-Moleküle möglicherweise freie Plätze auf den

Fasern besetzen und so die Immobilisierung des eigentlich zu immobilisierenden Proteins beeinflussen können, wäre es zukünftig von Interesse, ähnliche Untersuchungen auch ohne BSA durchzuführen. Die *in vitro*-Untersuchungen zeigen bisher jedoch, dass die BSA-Moleküle keinen negativen Einfluss ausüben. Insbesondere bei der Verwendung von BSA-freiem Laminin wäre zu befürchten, dass dieses intensiv auf den Gefäßoberflächen adsorbiert. Weiterhin wären zudem alternative Medien zu PBS als Freisetzungsmedium denkbar, die die Körperflüssigkeit im avisierten Anwendungsbereich besser simulieren. Möglich wäre hier z.B. die Nutzung einer aCSF-Lösung (*artificial cerebrospinal fluid*), welche der Zusammensetzung der Perilymphe ähnelt.^[459]

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass biodegradierbare Fasern aus PCL und PGA, sowohl in un- als auch in amino-modifizierter Form, als Basismaterialien für eine neuronale Leitstruktur sehr gut geeignet sind. In einem biomimetischen Ansatz ermöglichte die kovalente und somit zeitlich stabile Anbindung von HS die Immobilisierung von BDNF. Es konnte demonstriert werden, dass BDNF anschließend über einen längeren Zeitraum kontinuierlich von den Fasern freigesetzt werden kann. Der Wachstumsfaktor wirkte sowohl neuroprotektiv als auch neuroregenerativ auf die SGNs. In Zukunft könnten die Fasern ebenfalls mit dem alternativen Wachstumsfaktor NT-3 ausgestattet werden, dem ein stärkerer Effekt auf die Neuritenaussprossung zugeschrieben wird. Er fördert zudem das gerichtete Wachstum der Nervenenden, welche somit zur Implantatoberfläche hingelenkt werden könnten.^[248–251] Die ebenfalls erfolgreiche Adsorption des neuronalen Adhäsionsmoleküls Laminin soll den Neuriten auf ihrem Weg entlang der neuronalen Leitstruktur unterstützende Ankerpunkte liefern. In Zukunft könnten die Fasern ebenfalls mit der adhäsionsverhindernden PolySia beschichtet werden, um die Neuriten nicht zu fest auf der neuronalen Leitstruktur anwachsen zu lassen, wobei sie möglicherweise ihr Wachstum beenden. Dies wäre unvorteilhaft, denn ihr eigentliches Ziel ist das Erreichen der Elektrodenoberfläche. Nicht nur durch seinen sterischen Anspruch, sondern auch durch seine negative Ladung wirkt PolySia antiadhäsiv und kann daher die Anzahl der Zell-Anbindungen auf der neuronalen Leitstruktur verringern.^[261] Komplettiert werden kann das vorliegende System in Zukunft durch das neurale Adhäsionsmolekül L1CAM, welches auf die Oberfläche der CI-Elektrode aufgebracht werden soll. Über homophile Bindungen fördert L1CAM die Verankerung der Neuriten auf dem Implantat.^[73–75,267] Besonders eine musterhafte Beschichtung wirkt sich vorteilhaft aus.^[75] Letztendlich wird somit eine ausreichende und differenzierte elektrische Anregung der einzelnen Neuriten generiert, um den Höreindruck mithilfe des Cochlea-Implantats zu verbessern. Gegenüber anderen Ansätzen zur Unterstützung der Neuriten auf ihrem Weg in der *scala tympani* von der Basilar-membran zur Implantatoberfläche, wie z.B. der Verwendung von die Scala auskleidenden Hydrogelen, bieten Fasern einen inhärenten Vorteil, nämlich ihre anisotrope Gestalt (gegenüber den üblicherweise isotropen Hydrogelen). Durch diese Anisotropie wohnt den Fasern

inmanent ein richtungsweisender Charakter inne. Dieser Charakter muss den Neuriten „verständlich“ gemacht werden, was durch die geschickte Platzierung von Biomolekülen auf den Fasern und durch die gezielte, Konzentrationsgradienten aufbauende Freisetzung von Wachstumsfaktoren erreicht werden soll. Diese Arbeit hat die ersten Schritte auf dem Weg zu einer solchen faserbasierten neuronalen Leitstruktur geleistet, einerseits durch die Auswahl und eingehende Charakterisierung geeigneter Faserbasismaterialien, andererseits durch die Immobilisierung verschiedener Biomoleküle, die entweder stationär an die Faser angebunden bleiben (Heparansulfat, Laminin) oder von dieser kontrolliert freigesetzt werden (BDNF).

6 Literatur

- [1] “Bedeutung des Hörens,” can be found at <https://hoerzentrum.eu/bedeutung-des-hoerens/>, **2021**.
- [2] O. B. Wie, A. H. Pripp, O. Tveté, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2010**, *119*, 772–781.
- [3] “Hearing loss is a big worldwide problem,” can be found under <https://www.hear-it.org/hearing-loss-big-worldwide-problem>, **2016**.
- [4] R. F. Schmidt, *Neuro- und Sinnesphysiologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, **1995**.
- [5] E. Skudrzyk, *Die Grundlagen der Akustik*, Springer Wien, Wien, **1954**.
- [6] T. Lenarz, H.-G. Boenninghaus, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, **2012**.
- [7] T. Lenarz, *Cochlea-Implantat: Ein Praktischer Leitfaden für die Versorgung von Kindern und Erwachsenen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, **1998**.
- [8] “Deutscher Gehörlosen-Bund eV,” can be found under www.gehoerlosen-bund.de, **n.d.**
- [9] A. Djourno, *Press. Médicale* **1957**, *65*, 1353–1354.
- [10] A. Djourno, C. Eyries, *Press. Médicale* **1957**, *65*, 1417–1423.
- [11] A. Djourno, D. Kayser, *C. R. Soc. Bioi.* **1958**, *152*, 1433–1434.
- [12] W. F. House, J. Urban, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **1973**, *82*, 504–517.
- [13] “Audiocodierungsstrategien für Cochlea-Implantate,” can be found at <https://www.ostfalia.de/cms/de/pws/lajmi/Forschung/CI/>, **n.d.**
- [14] B. S. Wilson, M. F. Dorman, in *Neuromodulation* (Eds.: E.S. Krames, P. Hunter Peckham, A.R. Rezai), Elsevier, **2018**, pp. 1209–1221.
- [15] T. Stöver, T. Lenarz, *GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* **2009**, *8*, Doc10.
- [16] M. Schaarschmidt, *Dtsch. Arztebl.* **2013**, *110*, 36–39.
- [17] W. Nogueira, L. Litvak, B. Edler, J. Ostermann, A. Büchner, *EURASIP J. Adv. Signal Process.* **2009**, *2009*, 531213.
- [18] G. Berding, F. Wilke, T. Rode, C. Haense, G. Joseph, G. J. Meyer, M. Mamach, M. Lenarz, L. Geworski, F. M. Bengel, et al., *PLoS One* **2015**, *10*, e0128743.

- [19] S. Tolnai, R. Beutelmann, G. M. Klump, *PLoS One* **2017**, *12*, e0175142.
- [20] D. Oetting, V. Hohmann, J.-E. Appell, B. Kollmeier, S. D. Ewert, *Ear Hear.* **2018**, *39*, 664–678.
- [21] D. Oetting, V. Hohmann, J.-E. Appell, B. Kollmeier, S. D. Ewert, *Hear. Res.* **2016**, *335*, 179–192.
- [22] B. C. . Ykocinski, Michael; Cohen, Lawrence T.; Pyman, J. Roland, Thomas Jr.; Treaba, Claudiu; Palamara, R. K. . Dahm, Markus C.; Shepherd, J. Xu, R. S. Cowan, N. L. . Cohen, G. M. Clark, *Am. J. Otol.* **2000**, *21*, 205–211.
- [23] A. Dhanasingh, C. Jolly, *Hear. Res.* **2017**, *356*, 93–103.
- [24] J. Stieghorst, B. N. Tran, S. Haderler, D. Beckmann, T. Doll, *Procedia Eng.* **2016**, *168*, 1529–1532.
- [25] C. Boehler, C. Kleber, N. Martini, Y. Xie, I. Dryg, T. Stieglitz, U. G. Hofmann, M. Asplund, *Biomaterials* **2017**, *129*, 176–187.
- [26] R. K. Shepherd, A. Coco, S. B. Epp, *Hear. Res.* **2008**, *242*, 100–109.
- [27] J. Tan, Y. Wang, X. Yip, F. Glynn, R. K. Shepherd, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3362–3366.
- [28] S. B. Shibata, C. L. Budenz, S. A. Bowling, B. E. Pfingst, Y. Raphael, *Hear. Res.* **2011**, *281*, 56–64.
- [29] M. L. Duan, M. Ulfendahl, G. Laurell, A. S. Counter, I. Pyykkö, E. Borg, U. Rosenhall, *Hear. Res.* **2002**, *169*, 169–178.
- [30] E. E. L. Swan, M. J. Mescher, W. F. Sewell, S. L. Tao, J. T. Borenstein, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1583–1599.
- [31] H. Rask-Andersen, W. Liu, *Neural Regen. Res.* **2015**, *10*, 710.
- [32] B. E. Pfingst, N. Zhou, D. J. Colesa, M. M. Watts, S. B. Strahl, S. N. Garadat, K. C. Schwartz-Leyzac, C. L. Budenz, Y. Raphael, T. A. Zwolan, *Hear. Res.* **2015**, *322*, 77–88.
- [33] A. G. M. Schilder, M. P. Su, H. Blackshaw, L. Lustig, H. Staecker, T. Lenarz, S. Safieddine, C. S. Gomes-Santos, R. Holme, A. Warnecke, *Otol. Neurotol.* **2019**, *40*, 559–570.
- [34] B. S. Wilson, *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* **2017**, *3*, 200–210.
- [35] H. Li, F. Edin, H. Hayashi, O. Gudjonsson, N. Danckwardt-Lillieström, H. Engqvist, H. Rask-Andersen, W. Xia, *Biomaterials* **2017**, *122*, 1–9.

- [36] S. Yilmaz-Bayraktar, J. Schwieger, V. Scheper, T. Lenarz, U. Böer, M. Kreienmeyer, M. Torrente, T. Doll, *Int. J. Artif. Organs* **2020**, *43*, 332–342.
- [37] B. S. Wilson, M. F. Dorman, in *Neuromodulation*, Elsevier, **2018**, pp. 1209–1221.
- [38] G. Nacher-Soler, J. M. Garrido, F. Rodríguez-Serrano, *Arch. Med. Sci.* **2019**, *15*, 957–967.
- [39] W. Singer, R. Panford-Walsh, M. Knipper, *Neuropharmacology* **2014**, *76*, 719–728.
- [40] L. Rüttiger, R. Panford-Walsh, T. Schimmang, J. Tan, U. Zimmermann, K. Rohbock, I. Köpschall, A. Limberger, M. Müller, J.-T. Fraenzer, et al., *Neurobiol. Aging* **2007**, *28*, 586–601.
- [41] S. H. Green, E. Bailey, Q. Wang, R. L. Davis, *Anat. Rec.* **2012**, *295*, 1877–1895.
- [42] Y. A. Barde, D. Edgar, H. Thoenen, *EMBO J.* **1982**, *1*, 549–553.
- [43] K. Kranz, A. Warnecke, T. Lenarz, M. Durisin, V. Scheper, *PLoS One* **2014**, *9*, e92157.
- [44] C. L. Budenz, H. T. Wong, D. L. Swiderski, S. B. Shibata, B. E. Pfungst, Y. Raphael, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8619.
- [45] L. Li, T. Chao, J. Brant, B. O'Malley, A. Tsourkas, D. Li, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *108*, 2–12.
- [46] A. K. Wise, R. Richardson, J. Hardman, G. Clark, S. O'Leary, *J. Comp. Neurol.* **2005**, *487*, 147–165.
- [47] L. N. Gillespie, G. M. Clark, P. F. Bartlett, P. L. Marzella, *J. Neurosci. Res.* **2003**, *71*, 785–790.
- [48] L. N. Gillespie, R. K. Shepherd, *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *22*, 2123–2133.
- [49] W. S. Konerding, H. Janssen, P. Hubka, J. Tornøe, P. Mistrik, L. Wahlberg, T. Lenarz, A. Kral, V. Scheper, *Hear. Res.* **2017**, *350*, 110–121.
- [50] H. Staecker, R. Gabaizadeh, H. Federoff, T. R. Van de Water, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1998**, *119*, 7–13.
- [51] D. Rejali, V. A. Lee, K. A. Abrashkin, N. Humayun, D. L. Swiderski, Y. Raphael, *Hear. Res.* **2007**, *228*, 180–187.
- [52] V. Scheper, A. Hoffmann, M. M. Gepp, A. Schulz, A. Hamm, C. Pannier, P. Hubka, T. Lenarz, J. Schwieger, *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–16.
- [53] A. Warnecke, S. Sasse, G. I. Wenzel, A. Hoffmann, G. Gross, G. Paasche, V. Scheper, U. Reich, K.-H. Esser, T. Lenarz, et al., *Hear. Res.* **2012**, *289*, 86–97.
- [54] C. Géral, A. Angelova, S. Lesieur, *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 127–167.

- [55] Y. Cai, F. Edin, Z. Jin, A. Alexsson, O. Gudjonsson, W. Liu, H. Rask-Andersen, M. Karlsson, H. Li, *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 211–220.
- [56] S. Schlie-Wolter, A. Deiwick, E. Fadeeva, G. Paasche, T. Lenarz, B. N. Chichkov, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 1070–1077.
- [57] B. L. Leigh, K. Truong, R. Bartholomew, M. Ramirez, M. R. Hansen, C. A. Guymon, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 31488–31496.
- [58] A. F. Ryan, J. Wittig, A. Evans, S. Dazert, L. Mullen, *Audiol. Neurotol.* **2006**, *11*, 134–143.
- [59] N. Schmidt, J. Schulze, D. P. Warwas, N. Ehlert, T. Lenarz, A. Warnecke, P. Behrens, *PLoS One* **2018**, *13*, e0194778.
- [60] A. T. Young, N. Cornwell, M. A. Daniele, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1700239.
- [61] T. Endo, T. Nakagawa, T. Kita, F. Iguchi, T.-S. Kim, T. Tamura, I. Koji, Y. Tabata, J. Ito, *Laryngoscope* **2005**, *115*, 2016–2020.
- [62] N. K. Mohtaram, A. Montgomery, S. M. Willerth, *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 022001.
- [63] Y. Wang, A. K. Wise, J. Tan, J. W. Maina, R. K. Shepherd, F. Caruso, *Small* **2014**, *10*, 4244–4248.
- [64] A. K. Wise, J. Tan, Y. Wang, F. Caruso, R. K. Shepherd, *PLoS One* **2016**, *11*, e0164867.
- [65] S. Houshyar, A. Bhattacharyya, R. Shanks, *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 3349–3365.
- [66] P. Senn, M. Roccio, S. Hahnewald, C. Frick, M. Kwiatkowska, M. Ishikawa, P. Bako, H. Li, F. Edin, W. Liu, et al., *Otol. Neurotol.* **2017**, *38*, e224–e231.
- [67] A. K. Wise, C. R. Hume, B. O. Flynn, Y. S. Jeelall, C. L. Suhr, B. E. Sgro, S. J. O’Leary, R. K. Shepherd, R. T. Richardson, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1111–1122.
- [68] M. Aumailley, *Cell Adhes. Migr.* **2013**, *7*, 48–55.
- [69] G. R. Martin, R. Timpl, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 57–85.
- [70] A. Baron-Van Evercooren, H. K. Kleinman, S. Ohno, P. Marangos, J. P. Schwart, M. E. Dubois-Dalcq, *J. Neurosci. Res.* **1982**, *8*, 179–193.
- [71] H. K. Kleinman, F. B. Cannon, G. W. Laurie, J. R. Hassell, M. Aumailley, V. P. Terranova, G. R. Martin, M. DuBois-Dalcq, *J. Cell. Biochem.* **1985**, *27*, 317–325.
- [72] J. Finne, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 11966–11970.
- [73] E. Azemi, C. F. Lagenaur, X. T. Cui, *Biomaterials* **2011**, *32*, 681–692.

- [74] C. L. Kolarcik, D. Bourbeau, E. Azemi, E. Rost, L. Zhang, C. F. Lagenaur, D. J. Weber, X. T. Cui, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3561–3575.
- [75] J. F. Cherry, A. L. Carlson, F. L. Benarba, S. D. Sommerfeld, D. Verma, G. Loers, J. Kohn, M. Schachner, P. V. Moghe, *Biointerphases* **2012**, *7*, 1–16.
- [76] B. J. Copeland, H. C. Pillsbury, *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 157–167.
- [77] T. Endo, T. Nakagawa, T. Kita, F. Iguchi, T.-S. Kim, T. Tamura, K. Iwai, Y. Tabata, J. Ito, *Laryngoscope* **2005**, *115*, 2016–2020.
- [78] A. N. Salt, S. K. Plontke, *Audiol. Neurotol.* **2009**, *14*, 350–360.
- [79] S. Hackelberg, S. J. Tuck, L. He, A. Rastogi, C. White, L. Liu, D. M. Prieskorn, R. J. Miller, C. Chan, B. R. Loomis, et al., *PLoS One* **2017**, *12*, e0180427.
- [80] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, *Polym. Eng. Sci.* **2008**, *48*, 336–44.
- [81] M. Maher, J. Pine, J. Wright, Y.-C. Tai, *J. Neurosci. Methods* **1999**, *87*, 45–56.
- [82] E. J. Frazza, E. E. Schmitt, *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5*, 43–58.
- [83] R. S. Bezwada, D. D. Jamiolkowski, I.-Y. Lee, V. Agarwal, J. Persivale, S. Trenka-Benthin, M. Ermeta, J. Suryadevara, A. Yang, S. Liu, *Biomaterials* **1995**, *16*, 1141–1148.
- [84] J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2335–2346.
- [85] A. Szentivanyi, T. Chakradeo, H. Zernetsch, B. Glasmacher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 209–220.
- [86] H. S. Yoo, T. G. Kim, T. G. Park, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1033–1042.
- [87] J. S. Choi, K. W. Leong, H. S. Yoo, *Biomaterials* **2008**, *29*, 587–596.
- [88] D. L. Rabenstein, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 312–331.
- [89] J. Pieper, T. Hafmans, J. Veerkamp, T. van Kuppevelt, *Biomaterials* **2000**, *21*, 581–593.
- [90] J. S. Pieper, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, L. A. Brouwer, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1689–1699.
- [91] U. Häcker, K. Nybakken, N. Perrimon, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 530–541.
- [92] “Cacicol Augentropfen,” can be found at www.sparmedo.de/produktinfo/cacicol-augentropfen-10039463/, **2019**.
- [93] R. K. Okolicsanyi, L. R. Griffiths, L. M. Haupt, *Dev. Biol.* **2014**, *388*, 1–10.
- [94] E. Ruoslahti, Y. Yamaguchi, *Cell* **1991**, *64*, 867–869.

- [95] D. Gospodarowicz, J. Cheng, *J. Cell. Physiol.* **1986**, *128*, 475–484.
- [96] A. Sommer, D. B. Rifkin, *J. Cell. Physiol.* **1989**, *138*, 215–220.
- [97] S. E. Sakiyama-Elbert, J. A. Hubbell, *J. Control. Release* **2000**, *69*, 149–158.
- [98] C. Y. Chuang, M. S. Lord, J. Melrose, M. D. Rees, S. M. Knox, C. Freeman, R. V Iozzo, J. M. Whitelock, *Biochemistry* **2010**, *49*, 5524–5532.
- [99] J. Schlessinger, I. Lax, M. Lemmon, *Cell* **1995**, *83*, 357–360.
- [100] M. Roghani, D. Moscatellis, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22156–22162.
- [101] J. S. Pieper, T. Hafmans, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, L. A. Brouwer, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 185–194.
- [102] J. Schulze, S. Sasse, N. Prenzler, H. Staecker, A. J. Mellott, A. Roemer, M. Durisin, T. Lenarz, A. Warnecke, *Hear. Res.* **2018**, *368*, 109–122.
- [103] R. Timpl, H. Rohde, P. G. Robey, S. I. Rennard, J.-M. Foidart, G. R. Martin, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9933–9937.
- [104] A. E. Chung, R. Jaffe, I. L. Freeman, J. Vergnes, J. E. Braginski, B. Carlin, *Cell* **1979**, *16*, 277–287.
- [105] E. Bas, M. R. Anwar, S. Goncalves, C. T. Dinh, O. R. Bracho, J. A. Chiossone, T. R. Van De Water, *Neuroscience* **2019**, *410*, 97–107.
- [106] A. Bédier, T. Braschler, O. Peric, G. E. Fantner, S. Mosser, P. C. Fraering, S. Benchérif, D. J. Mooney, P. Renaud, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 301–312.
- [107] WHO, “Deafness and hearing loss,” can be found at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>, **2021**.
- [108] U.-C. C. M. C. C. Münsterland, “Cochlea Implantat,” can be found at klinikum.uni-muenster.de, **n.d.**
- [109] E. Lehnhardt, *Cochlea-Implantat* **1998**, 1–8.
- [110] E. G. Wever, C. W. Bray, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **1936**, *45*, 822–830.
- [111] F. Zöllner, W. D. Keidel, *Arch. für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkd.* **1963**, *181*, 216–223.
- [112] K. Burian, B. Eisenwort, E. Hochmair, I. Hochmair-Desoyer, *Adv Audio* **1984**, *12*, 19–20.
- [113] G. M. Clark, Y. C. Tong, R. Black, I. C. Forster, J. F. Patrick, D. J. Dewhurst, *J. Laryngol. Otol.* **1977**, *91*, 935–945.

- [114] F. B. Simmons, in *Cochlear Implant*. (Eds.: R. Schindler, M. Merzenich), Raven Press, New York, **1985**, pp. 1–7.
- [115] “Aufbau und Funktion des Ohres,” can be found at www.oton-hoerakustik.de, **n.d.**
- [116] L. Voldřich, *Acta Otolaryngol.* **1978**, *86*, 331–335.
- [117] F. J. Dreiling, M. M. Henson, O. W. Henson, *Hear. Res.* **2002**, *166*, 166–180.
- [118] “Corti-Organ,” can be found at <https://www.medizin-kompakt.de/corti-organ>, **n.d.**
- [119] H. Rask-Andersen, W. Liu, E. Erixon, A. Kinnefors, K. Pfaller, A. Schrott-Fischer, R. Glueckert, *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **2012**, *295*, 1791–1811.
- [120] M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso, *Neurowissenschaften*, Springer Spektrum, Berlin, **2018**.
- [121] H. Rahaman, S. Chattopadhyay, S. Chattopadhyay, *Progress in VLSI Design and Test*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, **2012**.
- [122] M. Gani, G. Valentini, A. Sigrist, M.-I. Kós, C. Boëx, *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **2007**, *8*, 69–83.
- [123] “Erstmals direktes Android Streaming bei Cochlea-Implantaten,” can be found at <http://presse-de.cochlear.com/pressreleases/erstmals-direktes-android-streaming-bei-cochlea-implantaten-2932494>, **2019**.
- [124] “FDA approves new cochlear implant with easier access to MRI and expanded connectivity ready for Google’s direct streaming to Android smartphones,” can be found at <https://www.prnewswire.com/news-releases/fda-approves-new-cochlear-implant-with-easier-access-to-mri-and-expanded-connectivity-ready-for-googles-direct-streaming-to-android-smartphones-300869149.html>, **2019**.
- [125] “Achieving Hearing Preservation through Superior Electrode Design,” can be found at <https://www.medel.com/technology-hearing-preservation-prof/>, **n.d.**
- [126] L. K. Holden, J. B. Firszt, R. M. Reeder, R. M. Uchanski, N. Y. Dwyer, T. A. Holden, *Otol. Neurotol.* **2016**, *37*, 1662–1668.
- [127] MED-EL, “SYNCHRONY Surgical Guideline,” **n.d.**
- [128] “What is a CI?,” can be found at <https://www.cic-berlin-brandenburg.de/what-is-a-ci/>, **n.d.**
- [129] N. A. Hardie, R. K. Shepherd, *Hear. Res.* **1999**, *128*, 147–165.
- [130] C. E. Zimmermann, B. J. Burgess, J. B. Nadol, *Hear. Res.* **1995**, *90*, 192–201.
- [131] Y. Zilberstein, M. C. Liberman, G. Corfas, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 405–410.

- [132] L. N. Pettingill, R. T. Richardson, A. K. Wise, S. J. O’Leary, R. K. Shepherd, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2007**, *54*, 1138–1148.
- [133] J. H. Goldwyn, S. M. Bierer, J. A. Bierer, *Hear. Res.* **2010**, *268*, 93–104.
- [134] M. F. Dorman, P. C. Loizou, J. Fitzke, Z. Tu, *J. Acoust. Soc. Am.* **1998**, *104*, 3583–3585.
- [135] J. A. Chikar, J. L. Hendricks, S. M. Richardson-Burns, Y. Raphael, B. E. Pflingst, D. C. Martin, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1982–1990.
- [136] J. Stieghorst, K. Tegtmeier, P. Aliuos, H. Zernetsch, B. Glasmacher, T. Doll, *Phys. status solidi* **2014**, *211*, 1455–1461.
- [137] C. Seifert, J. Thiemann, L. Gerlach, T. Volkmar, G. Paya-Vaya, H. Blume, S. van de Par, in *2017 IEEE Int. Conf. Multimed. Expo*, IEEE, **2017**, pp. 145–150.
- [138] L. Gerlach, G. Paya-Vaya, S. Liu, M. Weisbrich, H. Blume, D. Marquardt, S. Doclo, in *2017 Int. Conf. Embed. Comput. Syst. Archit. Model. Simul.*, IEEE, **2017**, pp. 88–96.
- [139] M. Buhl, A. Warzybok, M. R. Schädler, T. Lenarz, O. Majdani, B. Kollmeier, *Int. J. Audiol.* **2019**, *58*, 231–245.
- [140] U. Reich, P. P. Mueller, E. Fadeeva, B. N. Chichkov, T. Stoeber, T. Fabian, T. Lenarz, G. Reuter, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 146–153.
- [141] M. Vanden Bulcke, K. Baert, E. Beyne, M. Gonzalez, C. Winters, T. Webers, in *2006 Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, IEEE, **2006**, pp. 2811–2815.
- [142] C. Boehler, Z. Aqrawe, M. Asplund, *Bioelectron. Med.* **2019**, *2*, 89–99.
- [143] H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 578.
- [144] M. Rehahn, *Chemie unserer Zeit* **2003**, *37*, 18–30.
- [145] N. Ferrer-Anglada, V. Gomis, Z. El-Hachemi, U. D. Weglikovska, M. Kaempgen, S. Roth, *Phys. status solidi* **2006**, *203*, 1082–1087.
- [146] J. Y. Lee, J. Lee, C. E. Schmidt, *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, 801–810.
- [147] J. D. Yeager, D. J. Phillips, D. M. Rector, D. F. Bahr, *J. Neurosci. Methods* **2008**, *173*, 279–285.
- [148] H. S. Haggerty, H. S. Lusted, *Acta Otolaryngol.* **1989**, *107*, 13–22.
- [149] C. Hadler, P. Aliuos, G. Brandes, A. Warnecke, J. Bohlmann, W. Dempwolf, H. Menzel, T. Lenarz, G. Reuter, K. Wissel, *PLoS One* **2016**, *11*, 1–22.

- [150] J. Zou, J. Asukas, T. Inha, E. Toppila, M. Kellomäki, I. Pyykkö, *Otol. Neurotol.* **2008**, *29*, 714–719.
- [151] D. C. Gheorghe, A.-G. Niculescu, A. C. Bîrcă, A. M. Grumezescu, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1311.
- [152] T. M. Muhsin, A. K. Hachim, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2081–2090.
- [153] G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero, *Molecules* **2015**, *20*, 8856–8874.
- [154] H. Li, C. E. Corrales, A. Edge, S. Heller, *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 309–315.
- [155] D. Rejali, V. A. Lee, K. A. Abrashkin, N. Humayun, D. L. Swiderski, Y. Raphael, *Hear. Res.* **2007**, *228*, 180–187.
- [156] B. E. Pfingst, N. Zhou, D. J. Colesa, M. M. Watts, S. B. Strahl, S. N. Garadat, K. C. Schwartz-Leyzac, C. L. Budenz, Y. Raphael, T. A. Zwolan, *Hear. Res.* **2015**, *322*, 77–88.
- [157] S. M. Willerth, S. E. Sakiyama-Elbert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 325–338.
- [158] D. J. Maxwell, B. C. Hicks, S. Parsons, S. E. Sakiyama-Elbert, *Acta Biomater.* **2005**, *1*, 101–113.
- [159] E. R. Edelman, E. Mathiowitz, R. Langer, M. Klagsbrun, *Biomaterials* **1991**, *12*, 619–626.
- [160] I. D. Dinbergs, L. Brown, E. R. Edelman, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29822–29829.
- [161] W.-W. Yang, E. Pierstorff, *J. Lab. Autom.* **2012**, *17*, 50–58.
- [162] Y. Wang, A. K. Wise, J. Tan, J. W. Maina, R. K. Shepherd, F. Caruso, *Small* **2014**, *10*, n/a-n/a.
- [163] N. Burbliès, Dissertation in Anfertigung, Leibniz Universität Hannover, **n.d.**
- [164] K. D. Kreisköther, Dissertation in Anfertigung, Leibniz Universität Hannover, **n.d.**
- [165] N. Schmidt, Entwicklung von auf Nanoporösen Silica-Nanopartikeln basierenden Implantat-Assoziierten Freisetzungssystemen für Wachstumsfaktoren, Leibniz Universität Hannover, **2019**.
- [166] M. Jahns, Nanoporöse Organosilica-Materialien für biomedizinische Anwendungen, Leibniz Universität Hannover, **2019**.
- [167] T.-J. Strauß, Entwicklung eines neuartigen Nanokompositmaterials für die Freisetzung bioaktiver Substanzen von neuronalen Elektroden, Leibniz Universität Hannover, **2020**.

- [168] P. Behrens, H. C. Schwarz, K. D. Kreisköther, T. Pinkvos, **2020**, Patent, WO 2020/021075.
- [169] U. Lindahl, K. Lidholt, D. Spillmann, L. Kjellén, *Thromb. Res.* **1994**, 75, 1–32.
- [170] J. J. Castellot, R. L. Hoover, P. A. Harper, M. J. Karnovsky, *Am. J. Pathol.* **1985**, 120, 427–435.
- [171] N. Perrimon, M. Bernfield, *Nature* **2000**, 404, 725–728.
- [172] J. A. Marcum, J. B. McKenney, S. J. Galli, R. W. Jackman, R. D. Rosenberg, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **1986**, 250, H879–H888.
- [173] R. V. Iozzo, J. D. San Antonio, *J. Clin. Invest.* **2001**, 108, 349–355.
- [174] R. Sasisekharan, S. Ernst, G. Venkataraman, *Angiogenesis* **1997**, 1, 45–54.
- [175] Y. Chen, T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, R. M. Marks, *Nat. Med.* **1997**, 3, 866–871.
- [176] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, P. G. Spear, *Cell* **1999**, 99, 13–22.
- [177] M. D. Hulett, C. Freeman, B. J. Hamdorf, R. T. Baker, M. J. Harris, C. R. Parish, *Nat. Med.* **1999**, 5, 803–809.
- [178] I. Vlodavsky, Y. Friedmann, M. Elkin, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, M. Bitan, O. Pappo, T. Peretz, I. Michal, et al., *Nat. Med.* **1999**, 5, 793–802.
- [179] S. Tumova, A. Woods, J. R. Couchman, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, 32, 269–288.
- [180] J. Taipale, J. Keski-Oja, *FASEB J.* **1997**, 11, 51–59.
- [181] C. J. Dowd, C. L. Cooney, M. A. Nugent, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5236–5244.
- [182] J. Reiland, A. C. Rapraeger, *J. Cell Sci.* **1993**, 105, 1085–1093.
- [183] A. Linker, P. Hoffman, P. Sampson, K. Meyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, 29, 443–444.
- [184] H. C. Robinson, A. A. Horner, M. Hook, S. Ogren, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 6687–6693.
- [185] H. E. Conrad, *Heparin-Binding Proteins*, Academic Press, New York, **1998**.
- [186] B. Kalaska, J. Miklosz, K. Kamiński, B. Musielak, S.-I. Yusa, D. Pawlak, M. Nowakowska, K. Szczubiałka, A. Mogielnicki, *RSC Adv.* **2019**, 9, 3020–3029.
- [187] A. Molist, M. Romaris, U. Lindahl, J. Villena, M. Touab, A. Bassols, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 254, 371–377.

- [188] M. Lyon, J. T. Gallagher, *Matrix Biol.* **1998**, *17*, 485–493.
- [189] J. D. Esko, U. Lindahl, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 169–173.
- [190] C. Laske, G. W. Eschweiler, *Nervenarzt* **2006**, *77*, 523–537.
- [191] C. Zuccato, E. Cattaneo, *Nat. Rev. Neurol.* **2009**, *5*, 311–322.
- [192] F. Fumagalli, R. Molteni, F. Calabrese, P. F. Maj, G. Racagni, M. A. Riva, *CNS Drugs* **2008**, *22*, 1005–1019.
- [193] A. H. Nagahara, D. A. Merrill, G. Coppola, S. Tsukada, B. E. Schroeder, G. M. Shaked, L. Wang, A. Blesch, A. Kim, J. M. Conner, et al., *Nat. Med.* **2009**, *15*, 331–337.
- [194] T. Nakagawa, Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Yamanaka, A. Tsuchida, M. Taiji, H. Noguchi, K. Nakao, *Int. J. Obes.* **2003**, *27*, 557–565.
- [195] K. Matsumoto, R. K. Wada, J. M. Yamashiro, D. R. Kaplan, C. J. Thiele, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1798–1806.
- [196] E. G. Waterhouse, B. Xu, *Mol. Cell. Neurosci.* **2009**, *42*, 81–89.
- [197] D. K. Binder, S. D. Croll, C. M. Gall, H. E. Scharfman, *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 47–53.
- [198] R. Levi-Montalcini, **1987**, *237*, 1154–1162.
- [199] P. C. Maisonpierre, L. Belluscio, S. Squinto, N. Y. Ip, M. E. Furth, R. M. Lindsay, G. D. Yancopoulos, *Science (80-.)*. **1990**, *247*, 1446–1451.
- [200] F. Hallböök, C. F. Ibáñez, H. Persson, *Neuron* **1991**, *6*, 845–858.
- [201] L. R. Berkemeier, J. W. Winslow, D. R. Kaplan, K. Nikolics, D. V. Goeddel, A. Rosenthal, *Neuron* **1991**, *7*, 857–866.
- [202] R. Götz, R. Köster, C. Winkler, F. Raulf, F. Lottspeich, M. Scharl, H. Thoenen, *Nature* **1994**, *372*, 266–269.
- [203] G. R. Lewin, Y.-A. Barde, *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, *19*, 289–317.
- [204] R. C. Robinson, C. Radziejewski, G. Spraggon, J. Greenwald, M. R. Kostura, L. D. Burtnick, D. I. Stuart, S. Choe, E. Y. Jones, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2589–2597.
- [205] R. C. Robinson, C. Radziejewski, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4139–4146.
- [206] A. Buttstedt, F. Paoletti, E. Schwarz, *BIOSpektrum* **2011**, *17*, 150–153.
- [207] D. K. Binder, H. E. Scharfman, *Growth factors* **2004**, *22*, 123–131.
- [208] P. D. O’Leary, R. A. Hughes, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25738–25744.

- [209] L. F. Reichardt, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1545–1564.
- [210] M. Pattarawarapan, K. Burgess, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5277–5291.
- [211] P. D. O’Leary, R. A. Hughes, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25738–25744.
- [212] N. Q. McDonald, R. Lapatto, J. M. Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, T. L. Blundell, *Nature* **1991**, *354*, 411–414.
- [213] N. Q. McDonald, M. V. Chao, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19669–19672.
- [214] S. J. Allen, J. J. Watson, D. K. Shoemark, N. U. Barua, N. K. Patel, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 155–175.
- [215] S. J. Mowla, H. F. Farhadi, S. Pareek, J. K. Atwal, S. J. Morris, N. G. Seidah, R. A. Murphy, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12660–12666.
- [216] R. Lee, P. Kermani, K. K. Teng, B. L. Hempstead, *Science (80-.)*. **2001**, *294*, 1945–1948.
- [217] H. Rohde, G. Wick, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *102*, 195–201.
- [218] H. K. Kleinman, M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason, G. R. Martin, *Biochemistry* **1982**, *21*, 6188–6193.
- [219] K. von der Saal, *Biochemie*, Springer, Berlin, **2020**.
- [220] U. M. Wewer, G. Taraboletti, M. E. Sobel, R. Albrechtsen, L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5691–5698.
- [221] M. Bruch, R. Landwehr, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 271–279.
- [222] J. Engel, E. Odermatt, A. Engel, J. A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, R. Timpl, *J. Mol. Biol.* **1981**, *150*, 97–120.
- [223] M. Paulsson, R. Deutzmann, R. Timpl, D. Dalzoppo, E. Odermatt, J. Engel, *EMBO J.* **1985**, *4*, 309–316.
- [224] D. P. Barlow, N. M. Green, M. Kurkinen, B. L. Hogan, *EMBO J.* **1984**, *3*, 2355–2362.
- [225] R. Timpl, D. Tisi, J. F. Talts, Z. Andac, T. Sasaki, E. Hohenester, *Matrix Biol.* **2000**, *19*, 309–317.
- [226] M. Aumailley, L. Brucknertuderman, W. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. Jones, *Matrix Biol.* **2005**, *24*, 326–332.
- [227] J. Stetefeld, U. Mayer, R. Timpl, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 644–657.
- [228] M. Paulsson, M. Aumailley, R. Deutzmann, R. Timpl, K. Beck, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *166*, 11–19.

- [229] M. Dziadek, R. Timpl, *Dev. Biol.* **1985**, *111*, 372–382.
- [230] M. Dziadek, M. Paulsson, R. Timpl, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2513–2518.
- [231] G. W. Laurie, J. T. Bing, H. K. Kleinman, J. R. Hassell, M. Aumailley, G. R. Martin, R. J. Feldmann, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 205–216.
- [232] C. N. Rao, I. M. K. Margulies, T. S. Tralka, V. P. Terranova, J. A. Madri, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 9740–9744.
- [233] S. Sakashita, E. Engvall, E. Ruoslahti, *FEBS Lett.* **1980**, *116*, 243–246.
- [234] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [235] S. Fujiwara, H. Wiedemann, R. Timpl, A. Lustig, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *143*, 145–157.
- [236] D. T. Woodley, C. N. Rao, J. R. Hassell, L. A. Liotta, G. R. Martin, H. K. Kleinman, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *761*, 278–283.
- [237] P. D. Yurchenco, E. C. Tsilibary, A. S. Charonis, H. Furthmayr, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 7636–7644.
- [238] S. P. Sugrue, E. D. Hay, *J. Cell Biol.* **1981**, *91*, 45–54.
- [239] J. R. Couchman, M. Hook, D. A. Rees, R. Timpl, *J. Cell Biol.* **1983**, *96*, 177–183.
- [240] A. Grover, G. Andrews, E. D. Adamson, *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 137–144.
- [241] H. Fujiwara, Y. Kikkawa, N. Sanzen, K. Sekiguchi, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17550–17558.
- [242] S. L. Rogers, P. C. Letourneau, S. L. Palm, J. McCarthy, L. T. Furcht, *Dev. Biol.* **1983**, *98*, 212–220.
- [243] D. Pulido, S. A. Hussain, E. Hohenester, *Structure* **2017**, *25*, 530–535.
- [244] J. M. Miller, D. H. Chi, L. J. O’Keeffe, P. Kruszka, Y. Raphael, R. A. Altschuler, *Int. J. Dev. Neurosci.* **1997**, *15*, 631–643.
- [245] M. Ockel, Y. Barde, *Neuroforum* **1995**, *3*, 31–35.
- [246] D. Mahadeo, L. Kaplan, M. V Chaos, B. L. Hempsteadon, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6884–6891.
- [247] M. Sasi, B. Vignoli, M. Canossa, R. Blum, *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2017**, *469*, 593–610.
- [248] Q. Wang, S. H. Green, *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 7938–7949.

- [249] E. J. Bradbury, S. Khemani, V. R. King, J. V. Priestley, S. B. McMahon, *Eur. J. Neurosci.* **1999**, *11*, 3873–3883.
- [250] X. Cao, M. . Shoichet, *Neuroscience* **2003**, *122*, 381–389.
- [251] L. Taylor, L. Jones, M. H. Tuszynski, A. Blesch, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9713–9721.
- [252] P. Liesi, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2505–2511.
- [253] V. Nurcombe, M. Aumailley, R. Timpl, D. Edgar, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 9–14.
- [254] D. Bozyczko, A. F. Horwitz, *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 1241–1251.
- [255] S. Song, Y. C. Shin, S. E. Kim, I. K. Kwon, J. Lee, S. Hyon, D. Han, B. Kim, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5570.
- [256] Y.-C. Huang, C.-C. Huang, Y.-Y. Huang, K.-S. Chen, *J. Biomed. Mater. Res.* **2007**, *82A*, 842–851.
- [257] H. S. Koh, T. Yong, C. K. Chan, S. Ramakrishna, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3574–3582.
- [258] A. Acheson, J. L. Sunshine, U. Rutishauser, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 143–153.
- [259] H. Cremer, R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, et al., *Nature* **1994**, *367*, 455–459.
- [260] H. Tomasiewicz, K. Ono, D. Yee, C. Thompson, C. Goriadis, U. Rutishauser, T. Magnuson, *Neuron* **1993**, *11*, 1163–1174.
- [261] U. Rutishauser, L. Landmesser, *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 422–427.
- [262] R. Sadoul, M. Hirn, H. Deagostini-Bazin, G. Rougon, C. Goriadis, *Nature* **1983**, *304*, 347–349.
- [263] B. A. Cunningham, S. Hoffman, U. Rutishauser, J. J. Hemperly, G. M. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 3116–3120.
- [264] D. Muller, L. Stoppini, C. Wang, J. Z. Kiss, *Neuroscience* **1994**, *61*, 441–445.
- [265] J. Z. Kiss, G. Rougon, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1997**, *7*, 640–646.
- [266] U. Rutishauser, M. Watanabe, J. Silver, F. A. Troy, E. R. Vimr, *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1842–1849.
- [267] M. Dihne, C. Bernreuther, M. Sibbe, W. Paulus, M. Schachner, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 6638–6650.
- [268] D. T. Simon, S. Kurup, K. C. Larsson, R. Hori, K. Tybrandt, M. Goiny, E. W. H. Jager, M. Berggren, B. Canlon, A. Richter-Dahlfors, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 742–746.
- [269] A. Dieter, D. Keppeler, T. Moser, *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, 1–16.

- [270] M. N. Peter, A. Warnecke, U. Reich, H. Olze, A. J. Szczepek, T. Lenarz, G. Paasche, *Neurotox. Res.* **2019**, 204–216.
- [271] A. L. Dellon, S. E. Mackinnon, *Plast. Reconstr. Surg.* **1988**, 82, 849–856.
- [272] W. F. A. Den Dunnen, B. van der Lei, J. M. Schakenraad, E. H. Blaauw, I. Stokroos, A. J. Pennings, P. H. Robinson, *Microsurgery* **1993**, 14, 508–515.
- [273] W. R. Gombotz, D. K. Pettit, *Bioconjug. Chem.* **1995**, 6, 332–351.
- [274] L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **1994**, 12, 689–693.
- [275] L. Y. Santiago, R. W. Nowak, J. P. Rubin, K. G. Marra, *Biomaterials* **2006**, 27, 2962–2969.
- [276] S. Siri, P. Wadbua, V. Amornkitbamrung, N. Kampa, S. Maensiri, *Mater. Sci. Technol.* **2010**, 26, 1292–1297.
- [277] K. Lee, K. U. K. R. O. Yoon, S. I. H. L. Woo, I. S. Choi, *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, 933–937.
- [278] A. Luciani, V. Coccoli, S. Orsi, L. Ambrosio, P. a. Netti, *Biomaterials* **2008**, 29, 4800–4807.
- [279] K. H. Lee, H. Y. Kim, M. S. Khil, Y. M. Ra, D. R. Lee, *Polymer (Guildf)*. **2003**, 44, 1287–1294.
- [280] C. Marrazzo, E. Di Maio, S. Iannace, *Polym. Eng. Sci.* **2008**, 47, 21–25.
- [281] H. Huang, S. Oizumi, N. Kojima, T. Niino, Y. Sakai, *Biomaterials* **2007**, 28, 3815–3823.
- [282] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, S. H. Teoh, *Biomaterials* **2002**, 23, 1169–1185.
- [283] K. Park, Y. M. Ju, J. S. Son, K.-D. Ahn, D. K. Han, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, 18, 369–382.
- [284] F. Natta, J. Hill, W. Carothers, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 1772, 5–7.
- [285] S. Huang, in *Encycl. Polym. Sci. Eng.* (Eds.: F. Mark, N. Bikales, C. Overberger, G. Menges, J. Kroshwitz), John Wiley And Sons, New York, **1984**, pp. 220–243.
- [286] C. G. PITT, *Drugs Pharm. Sci.* **1990**, 45, 71–120.
- [287] M. Labet, W. Thielemans, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3484.
- [288] B. Azimi, P. Nourpanah, M. Rabiee, S. Arbab, *J. Eng. Fiber. Fabr.* **2014**, 9, 74–90.
- [289] M. Okada, *Prog. Polym. Sci.* **2002**, 27, 87–133.

- [290] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 762–798.
- [291] C. K. S. Pillai, C. P. Sharma, *J. Biomater. Appl.* **2010**, *25*, 291–366.
- [292] V. R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, a. Trehan, *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 1–23.
- [293] R. Chandra, R. R., *Progr Polym Sci* **1998**, *23*, 1273–335.
- [294] S. C. Woodward, P. S. Brewer, F. Moatamed, a Schindler, C. G. Pitt, *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, *19*, 437–444.
- [295] a. P. Pêgo, M. J. a. Van Luyn, L. a Brouwer, P. B. van Wachem, A. Poot, D. W. Grijpma, J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67*, 1044–1054.
- [296] T. Barrows, *Clin. Mater.* **1986**, *1*, 233–257.
- [297] W. H. Wong, D. J. Mooney, in *Synth. Prop. Biodegrad. Polym. Used as Synth. Matrices Tissue Eng.*, **1997**, pp. 51–82.
- [298] R. M. Ginde, R. K. Gupta, *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *33*, 2411–2429.
- [299] Y. You, B.-M. Min, S. J. Lee, T. S. Lee, W. H. Park, *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *95*, 193–200.
- [300] G. E. Zaikov, *J. Macromol. Sci. Part C* **1985**, *25*, 551–597.
- [301] S. S. Spearman, I. V. Rivero, N. Abidi, *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, 40224.
- [302] R. M. Aghdam, S. Najarian, S. Shakhesi, S. Khanlari, K. Shaabani, S. Sharifi, *Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124*, 123–131.
- [303] A. Kumar, S. M. Mir, I. Aldulijan, A. Mahajan, A. Anwar, C. H. Leon, A. Terracciano, X. Zhao, T. L. Su, D. M. Kalyon, et al., *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2021**, *109*, 193–200.
- [304] F. A. Paskiabi, E. Mirzaei, A. Amani, M. A. Shokrgozar, R. Saber, R. Faridi-Majidi, *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 1089–1097.
- [305] R. S. Bezwada, D. D. Jamiolkowski, S. W. Shalaby, *Segmented Copolymers of ϵ -Caprolactone and Glycolide*, **1992**, US Patent: 5133739.
- [306] J. H. Park, H. J. Kang, D. Y. Kwon, B. K. Lee, B. Lee, J. W. Jang, H. J. Chun, J. H. Kim, M. S. Kim, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8143–8153.
- [307] “Glycolon,” can be found at <http://www.resorba.com/region/germany/produkte/nahtmaterial/glycolon/>, **n.d.**
- [308] S. Freiberg, X. X. Zhu, *Int. J. Pharm.* **2004**, *282*, 1–18.

- [309] Y.-I. Jeong, R. P. Ȳv, T. Ohno, Y. Yoshikawa, N. Shibata, S. Kato, K. Takeuchi, K. Takada, *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *53*, 1079–1085.
- [310] S. R. Jameela, N. Suma, a Jayakrishnan, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1997**, *8*, 457–66.
- [311] D. E. Katz, A. J. DeLorimier, M. K. Wolf, E. R. Hall, F. J. Cassels, J. E. van Hamont, R. L. Newcomer, M. A. Davachi, D. N. Taylor, C. E. McQueen, *Vaccine* **2003**, *21*, 341–346.
- [312] S. Zhang, H. Uludağ, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1561–1580.
- [313] M. Gou, M. Dai, Y. Gu, X. Li, Y. Wen, L. Yang, K. Wang, Y. Wei, Z. Qian, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 2357–2361.
- [314] J. S. Lee, D. H. Go, J. W. Bae, S. J. Lee, K. D. Park, *J. Control. Release* **2007**, *117*, 204–209.
- [315] J. C. Chappell, J. Song, C. W. Burke, A. L. Klibanov, R. J. Price, *Small* **2008**, *4*, 1769–1777.
- [316] B. X. Fu, B. S. Hsiao, G. Chen, J. Zhou, S. Lin, J. Yuan, I. Koyfman, D. D. Jamiolkowski, E. Dormier, *Chinese J. Polym. Sci.* **2003**, *21*, 159–167.
- [317] K. Krishnanand, B. L. Deopura, B. Gupta, *Polym. Int.* **2013**, *62*, 49–53.
- [318] Q. Meng, J. Hu, *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 131–136.
- [319] M. Mochizuki, T. Hayashi, K. Nakayama, T. Masuda, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2177–2188.
- [320] A. Charuchinda, R. Molloy, J. Siripitayananon, N. Molloy, M. Sriyai, *Polym. Int.* **2003**, *52*, 1175–1181.
- [321] P. Douglas, G. Andrews, D. Jones, G. Walker, *Chem. Eng. J.* **2010**, *164*, 359–370.
- [322] G. Perale, T. Casalini, V. Barri, M. Müller, S. Maccagnan, M. Masi, *J. of Applied Polymer Sci.* **2010**, *117*, 3610–3614.
- [323] S. Arbab, P. Noorpanah, N. Mohammadi, M. Soleimani, *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *109*, 3461–3469.
- [324] K. Tuzlakoglu, I. Pashkuleva, M. T. Rodrigues, M. E. Gomes, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *92A*, 369–377.
- [325] M. R. Williamson, E. F. Adams, A. G. a Coombes, *Eur. Cells Mater.* **2002**, *4*, 62–63.
- [326] M. R. Williamson, A. G. a Coombes, *Biomaterials* **2004**, *25*, 459–465.
- [327] M. R. Williamson, H. I. Chang, a G. a Coombes, *Biomaterials* **2004**, *25*, 5053–5060.

- [328] K. D. Nelson, A. Romero, P. Waggoner, B. Crow, A. Borneman, G. M. Smith, N. E. T. Al, *Tissue Eng.* **2003**, *9*.
- [329] Y. Zhu, Y. Cao, J. Pan, Y. Liu, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2010**, *92*, 508–516.
- [330] X. Y. Sun, L. R. Nobles, H. G. Börner, R. J. Spontak, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1455–1460.
- [331] S. Maretschek, A. Greiner, T. Kissel, *J. Control. Release* **2008**, *127*, 180–187.
- [332] V. P. Shastri, J. C. Sy, a. S. Klemm, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1814–1819.
- [333] S. Chakraborty, I. C. Liao, A. Adler, K. W. Leong, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1043–1054.
- [334] D. Puppi, D. Dinucci, C. Bartoli, C. Mota, C. Migone, F. Dini, G. Barsotti, F. Carlucci, F. Chiellini, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2011**, *26*, 478–492.
- [335] H.-I. Chang, Y.-C. Lau, C. Yan, A. G. A. Coombes, *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, *84A*, 230–237.
- [336] J. G. Merrell, S. W. McLaughlin, L. Tie, C. T. Laurencin, A. F. Chen, L. S. Nair, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2009**, *36*, 1149–1156.
- [337] E. Luong-van, L. Grøndahl, K. Ngiap, K. W. Leong, V. Nurcombe, S. M. Cool, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2042–2050.
- [338] P. J. Buscemi, E. A. Stejskal, D. F. Palme, L. Wang, *Biodegradable Drug Delivery Vascular Stent*, **1994**.
- [339] D. Hegemann, H. Brunner, C. Oehr, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **2003**, *208*, 281–286.
- [340] X. Zhu, S. C. Kerm, M. B. E. Chan-Park, T. L. Seng, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2005**, *73*, 264–274.
- [341] S. C. Baker, N. Atkin, P. a. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson, J. Southgate, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3136–3146.
- [342] H. Park, K. Y. Lee, S. J. Lee, K. E. Park, W. H. Park, *Macromol. Res.* **2007**, *15*, 238–243.
- [343] Z. Ma, W. He, T. Yong, S. Ramakrishna, *Tissue Eng.* **2005**, *11*.
- [344] J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, a. Bharath Kumar, S. Ramakrishna, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *85*, 408–417.
- [345] J. Jia, Y. Y. Duan, J. Yu, J. W. Lu, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *86*, 364–373.

- [346] M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, C. K. Chan, S. Ramakrishna, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 455102.
- [347] F. Yang, J. G. C. Wolke, J. a. Jansen, *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 154–161.
- [348] Y. S. Nam, J. J. Yoon, J. G. Lee, T. G. Park, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10*, 1145–1158.
- [349] X. Yuan, a. F. T. Mak, K. Yao, *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *79*, 45–52.
- [350] H. Sun, S. Önnby, *Polym. Int.* **2006**, *55*, 1336–1340.
- [351] T. I. Croll, A. J. O'Connor, G. W. Stevens, J. J. Cooper-White, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 463–473.
- [352] F. Chen, C. N. Lee, S. H. Teoh, *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 325–332.
- [353] Y. Zhu, M. F. Leong, W. F. Ong, M. B. Chan-Park, K. S. Chian, *Biomaterials* **2007**, *28*, 861–868.
- [354] M. Yoshida, R. Langer, A. Lendlein, J. Lahann, *J. Macromol. Sci. Part C* **2006**, *46*, 347–375.
- [355] J. J. Yoon, H. J. Chung, T. G. Park, *J Biomed Mater Res* **2007**, *83 A*, 597–605.
- [356] a. Lode, a. Reinstorf, a. Bernhardt, C. Wolf-Brandstetter, U. König, M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *86*, 749–759.
- [357] J. S. McGonigle, G. Tae, P. S. Stayton, A. S. Hoffman, M. Scatena, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19*, 1021–1034.
- [358] J. C. Stendahl, L.-J. Wang, L. W. Chow, D. B. Kaufman, S. I. Stupp, *Transplantation* **2008**, *86*, 478–481.
- [359] Y. K. Joung, J. W. Bae, K. D. Park, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 1173–84.
- [360] C. H. Park, K. H. Kim, J. C. Lee, J. Lee, *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 521–528.
- [361] a Delcorte, P. Bertrand, E. Wischerhoff, a Laschewsky, *Langmuir* **1997**, *13*, 5125–5136.
- [362] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, P. Lavalle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12531–5.
- [363] B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, M. Tabrizian, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1564–1571.
- [364] J. Zhang, B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J. C. Voegel, P. Lavalle, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3353–3361.

- [365] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. a. Kotov, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3203–3224.
- [366] K. Müller, J. F. Quinn, A. P. R. Johnston, M. Becker, A. Greiner, F. Caruso, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2397–2403.
- [367] W. Li, Y. Guo, H. Wang, D. Shi, C. Liang, Z. Ye, F. Qing, J. Gong, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 847–854.
- [368] J. R. Keogh, *Ionic Attachment of Biomolecules with a Guanidino Moiety to Medical Device Surfaces*, **1999**, 5928916.
- [369] G. A. Grode, S. J. Anderson, H. M. Grotta, F. R. D., *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* **1969**, *15*, 1.
- [370] R. Barbucci, G. Casini, P. Ferruti, F. Tempesti, *Spec. Polym.* **84** **1985**, *26*, 1349–1352.
- [371] N. Volpi, *Biomaterials* **1999**, *20*, 1359–1363.
- [372] E. L. Æ. L. G. Æ, S. Song, Æ. V. Nurcombe, Æ. S. Cool, *J. Mole* **2007**, *38*, 459–468.
- [373] M. A. Woodruff, S. N. Rath, E. Susanto, L. M. Haupt, D. W. Hutmacher, V. Nurcombe, S. M. Cool, *J. Mol. Histol.* **2007**, *38*, 425–433.
- [374] I. V Yannas, J. F. Burke, P. L. Gordon, C. Huang, R. H. Rubenstein, *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, *14*, 107–132.
- [375] M. Erdtmann, R. Keller, H. Baumann, *Biomaterials* **1994**, *15*, 1043–1048.
- [376] G. Rohman, S. C. Baker, J. Southgate, N. R. Cameron, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 9265.
- [377] C. Schmidt, R. Thull, *Biomaterialen* **2003**, *4*, 11–16.
- [378] “Carbodiimide Crosslinker Chemistry,” can be found under www.thermofisher.com, **2015**.
- [379] I. Kang, O. H. Kwon, Y. M. Lee, Y. K. Sung, *Biomaterials* **1996**, *17*, 841–847.
- [380] S. Singh, B. M. Wu, J. C. Y. Dunn, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2059–2069.
- [381] Y. Ito, M. Sisido, Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.* **1986**, *20*, 1157–1177.
- [382] A. S. Hoffman, G. Schmer, C. Harris, W. G. Kraft, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1972**, *18*, 10–16.
- [383] K. L. Carraway, D. E. Koshland, in *Methods Enzymol.*, **1972**, pp. 616–623.
- [384] D. H. Rich, J. Singh, in *Major Methods Pept. Bond Form.*, Elsevier, **1979**, pp. 241–261.
- [385] V. Scheper, J. Schwieger, A. Hamm, T. Lenarz, A. Hoffmann, *J. Neurosci. Res.* **2019**, *97*, 1414–1429.

- [386] S. L. McGuinness, R. K. Shepherd, *Otol. Neurotol* **2005**, *26*, 1064–1072.
- [387] P. B. Yang, M. J. Seiler, R. B. Aramant, F. Yan, M. J. Mahoney, L. M. Kitzes, H. S. Keirstead, *Exp. Eye Res.* **2010**, *91*, 727–738.
- [388] M. J. Seiler, B. B. Thomas, Z. Chen, S. Arai, S. Chadalavada, M. J. Mahoney, S. R. Sadda, R. B. Aramant, **2008**, *86*, 92–104.
- [389] M. K. Horne, D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, C. L. Parish, *Stem Cells Dev.* **2010**, *19*, 843–852.
- [390] D. Fon, K. Zhou, F. Ercole, F. Fehr, S. Marchesan, M. R. Minter, P. J. Crack, D. I. Finkelstein, J. S. Forsythe, *Biomaterials* **2014**, *35*, 2692–2712.
- [391] Y. Ma, M. Bjo, A. K. Wise, C. Cortez-jugo, E. Revalor, Y. Ju, O. M. Feeney, R. T. Richardson, E. Hanssen, R. K. Shepherd, et al., **2018**, DOI 10.1021/acsami.8b10415.
- [392] X. Yu, G. P. Dillon, R. V. Bellamkonda, *Tissue Eng.* **1999**, *5*, 291–304.
- [393] A. Matsuda, H. Kobayashi, S. Itoh, K. Kataoka, J. Tanaka, *Biomaterials* **2005**, *26*, 2273–2279.
- [394] N. L. Francis, P. M. Hunger, A. E. Donius, B. W. Riblett, A. Zavaliangos, U. G. K. Wegst, M. A. Wheatley, *J. Biomed. Mater. Res.* **2013**, *101*, 3493–3503.
- [395] R. F. S. Lenza, J. R. Jones, W. L. Vasconcelos, L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *67A*, 121–129.
- [396] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 1129–1136.
- [397] Y.-S. Lin, C.-P. Tsai, H.-Y. Huang, C.-T. Kuo, Y. Hung, D.-M. Huang, Y.-C. Chen, C.-Y. Mou, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4570–4573.
- [398] X. Li, Y. Su, S. Liu, L. Tan, X. Mo, S. Ramakrishna, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75*, 418–424.
- [399] K. Besecke, Entwicklung von Freisetzungssystemen Für Biomoleküle Für Regenerative Anwendungen, Leibniz Universität Hannover, **2020**.
- [400] **2008**, 11.
- [401] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. E. Lyman, E. Lifshin, L. Sawyer, J. R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, **2003**.
- [402] M. Mulisch, U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, **2010**.

- [403] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, **2005**.
- [404] “Elementar,” can be found at <https://www.elementar.com/de.html>, **n.d.**
- [405] B. Chu, in *Soft-Matter Charact.* (Eds.: R. Borsali, R. Pecora), Springer, **2008**, pp. 335–376.
- [406] W. I. Goldberg, *Am. J. Phys.* **1999**, *67*, 1152–1160.
- [407] J. Wagner, *Chem.-Ing.-Tech.* **1986**, *58*, 578–583.
- [408] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, **2011**.
- [409] T. (A. P. G. Luxbacher, *The ZETA Guide*, **2014**.
- [410] A. Gloria, F. Causa, T. Russo, E. Battista, R. Della Moglie, S. Zeppetelli, R. De Santis, P. A. Netti, L. Ambrosio, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3510–3521.
- [411] Y. S. Lin, C. L. Haynes, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3979–3986.
- [412] F. C. Macintosh, *Biochem. J.* **1941**, *35*, 776–782.
- [413] D. Tebbe, Funktionalisierung von Titan(dioxid)oberflächen mit kovalent gebundenem und in Depots eingebrachtem Wirkstoff für den Blutkontakt, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2007**.
- [414] P. K. Smith, a K. Mallia, *Anal. Biochem.* **1980**, *473*, 466–473.
- [415] D. Kitz Kramer, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA),” can be found at <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/Enzyme-linked+Immunsorbent+Assay+ELISA/>, **2013**.
- [416] P. Wefstaedt, V. Scheper, T. Lenarz, T. Stöver, *Neuroreport* **2005**, *16*, 2011–2014.
- [417] L. N. Gillespie, G. M. Clark, P. F. Bartlett, P. L. Marzella, *Neuroreport* **2001**, *12*, 275–279.
- [418] D. A. Sholl, *J. Anat.* **1953**, *87*, 387–406.
- [419] T. Ferreira, A. Blackman, J. Oyrer, A. Jayabal, A. Chung, A. Watt, J. Sjöström, D. van Mendel, *Nat. Methods* **n.d.**, *11*, 982–984.
- [420] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. S, B. Schmid, et al., *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.
- [421] I. Wille, J. Harre, S. Oehmichen, M. Lindemann, H. Menzel, N. Ehlert, T. Lenarz, A. Warnecke, P. Behrens, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 776890.
- [422] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, J. Shen, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1312–1319.

- [423] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **2008**, *90*, 128–131.
- [424] H. Günzler, H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie*, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, **2003**.
- [425] G. Kister, G. Cassanas, M. Vert, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1997**, *53*, 1399–1403.
- [426] M. P. Bajgai, K.-W. Kim, D. Chandra Parajuli, Y. C. Yoo, W. D. Kim, M.-S. Khil, H. Y. Kim, *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93*, 2172–2179.
- [427] C. C. Chu, N. D. Campbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1982**, *16*, 417–430.
- [428] C. C. Chu, *J. Biomed. Mater. Res.* **1981**, *15*, 19–27.
- [429] A. K. Gaigalas, J. B. Hubbard, D. H. Atha, R. Lesage, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 355–359.
- [430] M. C. Z. Meneghetti, A. J. Hughes, T. R. Rudd, H. B. Nader, A. K. Powell, E. A. Yates, M. A. Lima, *J. R. Soc. Interface* **2015**, *12*, 20150589.
- [431] S. Zippusch, K. F. W. Besecke, F. Helms, M. Klingenberg, A. Lyons, P. Behrens, A. Haverich, M. Wilhelmi, N. Ehlert, U. Böer, *Regen. Biomater.* **2021**, *8*, 1–12.
- [432] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch Der Anorganischen Chemie*, **2007**.
- [433] A. Satalov, Nanoporous Silica Nanoparticles and Bone Morphogenetic Protein 2 for Bone Regeneration, Leibniz University Hanover, **2017**.
- [434] P. Wittmeyer, Neue Synthesestrategien Zu Kettensteifen Polyelektrolyten Und Deren Lösungseigenschaften, **2004**.
- [435] S. S. Shiratori, M. F. Rubner, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213–4219.
- [436] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.
- [437] J. Budweiser, Hydrolyseverhalten Der Synthetischen Phospholipide DPPG_x (X=1,2,3) Im Vergleich Zu DPPC in Thermosensitiven Liposomen, Ludwig-Maximilians-Universität zu München, **2015**.
- [438] N. E. Zander, J. A. Orlicki, A. M. Rawlett, T. P. Beebe, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 2074–2081.
- [439] T. Wu, D. Li, Y. Wang, B. Sun, D. Li, Y. Morsi, H. El-Hamshary, S. S. Al-Deyab, X. Mo, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3186–3194.
- [440] M. Seegers, Ausrüstung Einer Auf Polymerfasern Basierenden Neuronalen Leitstruktur Mit Laminin- Adhäsionsproteinen, Leibniz Universität Hannover, **2020**.
- [441] I. Meltser, Y. Tahera, B. Canlon, *Neuroscience* **2010**, *165*, 1439–1446.

- [442] T. Katsumi Tanaka, M. Masashi Kumano, *Stable Pharmaceutical Composition of BDNF*, **2000**, 6077829.
- [443] E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1325–1336.
- [444] I. Wille, Funktionalisierung von Polymerfasern Für Den Einsatz Als Neuronale Leitstrukturen, Leibniz Universität Hannover, **2016**.
- [445] I. Krueger, Auf Dem Weg Zu Neuartigen Biomaterialien : Nanoporöse Beschichtungen Und Organisch-Anorganische Kompositwerkstoffe, Hannover, **2006**.
- [446] H. Sung, C. Meredith, C. Johnson, Z. S. Galis, *Biomaterials* **2004**, *25*, 5735–5742.
- [447] N. Xiao, *Neural Regen. Res.* **2016**, *11*, 735.
- [448] G. Lin, A. J. Bella, T. F. Lue, C. S. Lin, *J. Sex. Med.* **2006**, *3*, 821–829.
- [449] B. Kramer, A. Tropitzsch, H. Lo, M. Mu, *Neuroscience* **2017**, *357*, 75–83.
- [450] W. Xie, K. Zhang, B. Cui, *Integr. Biol.* **2012**, *4*, 953.
- [451] M. Gao, P. Lu, D. Lynam, B. Bednark, W. M. Campana, J. Sakamoto, M. Tuszynski, *J. Neural Eng.* **2016**, *13*, 1–9.
- [452] C. E. McGregor, A. W. English, *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *12*, Article 522.
- [453] O. Karaman, A. Kumar, S. Moeinzadeh, X. He, T. Cui, E. Jabbari, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *10*, E132–E146.
- [454] A. Tsortos, G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *250*, 159–167.
- [455] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science (80-.)*. **1996**, *271*, 67–69.
- [456] S. Schweizer, A. Taubert, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 1085–1099.
- [457] T. Schinke, C. Amendt, A. Trindl, O. Pöschke, W. Müller-Esterl, W. Jahnen-Dechent, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20789–20796.
- [458] S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, G. De Crescenzo, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1690–1699.
- [459] N. El Kechai, F. Agnely, E. Mabelle, Y. Nguyen, E. Ferrary, A. Bochot, *Int. J. Pharm.* **2015**, *494*, 83–101.
- [460] “Fluoresceinamine-labeled Sodium Heparan Sulfate,” can be found under www.amsbio.com, **n.d.**
- [461] “Laminin Rhodamine (mouse tumor),” can be found at <https://www.hoelzel-biotech.com/de/cytoskeleton-proteins-mu-lmn01-a-laminin-rhodamine-mouse->

tumor.html, **n.d.**

7 Anhang

7.1 Chemikalienverzeichnis

Bezeichnung	Reinheit	Bezugsquelle
BDNF	98 %	Thermo Fisher Scientific
BDNF / Laminin ELISA-Kit	-	Boster
BSA	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcar- bodiimid	99 %	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	≥ 99.8 %	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogen- phosphat	99 %	Fluka
1-Ethyl-3-(3-Dimethyla- minopropyl)carbodiimid	-	Sigma-Aldrich
Ethanol (absolut)	≥ 99 %	Merck
Ethylendiamin	≥ 99.5 %	Fluka
Fluoresceinisothiocyanat	≥ 90 %	Sigma-Aldrich
Hexan	95 %	Sigma-Aldrich
HS(Rinderniere)	-	Sigma-Aldrich
HS _{fl} (Fluoresceinamin- gelabelt, Schweineniere)	-	Cosmo Bio Co. Ltd.
Isopropanol	≥ 99.5 %	VWR
Laminin (Maus)	-	Invitrogen
Laminin _{Fl} (Rhodamin- gelabelt)	≥ 90 %	Cytoskeleton
2-(<i>N</i> -Morpho- lino)ethansulfonsäure- Puffer	99.5 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	99 %	ABCR
Natriumhydroxid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich

<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	98 %	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung	-	Sigma-Aldrich
Polystyrol Nanopartikel 100 nm	-	Sigma-Aldrich
Rhodaminisothiocyanat	≥ 90 %	Sigma-Aldrich
Salzsäure konzentriert	37 %	Fischer Scientific
Toluidinblau	-	Sigma-Aldrich

7.2 Zusatzinformationen

7.2.1 Inkubationsversuche mit fluorescentem HS

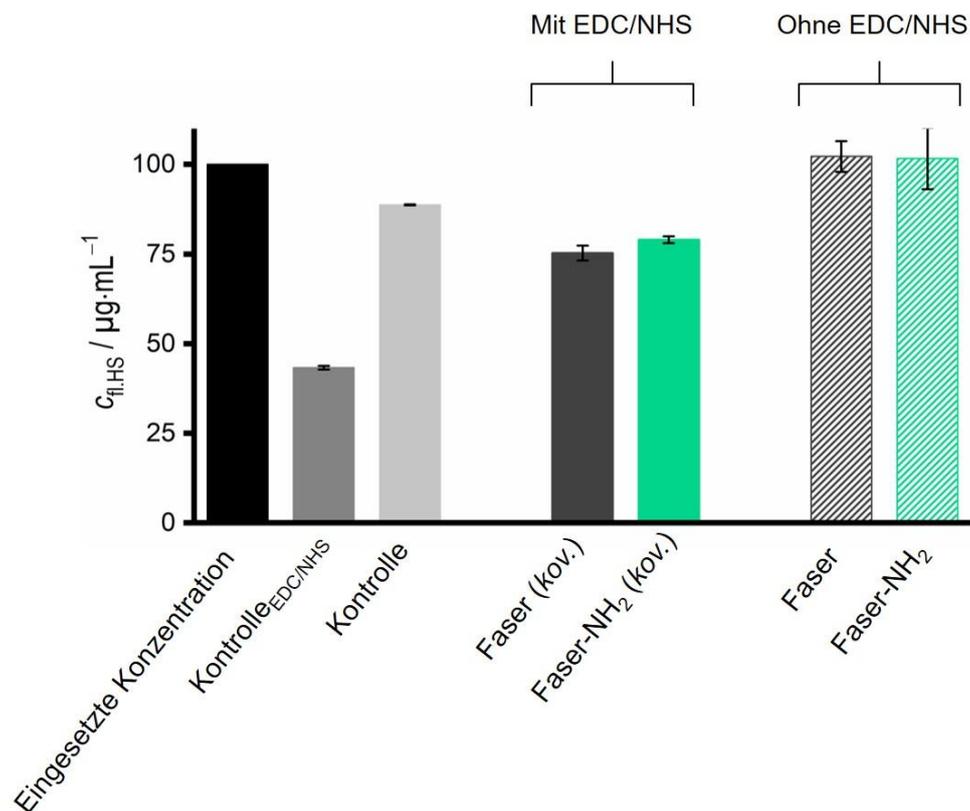


Abbildung 80: Es sind die erhaltenen Konzentrationen von fl. HS in den Inkubationslösungen nach den Inkubationsversuchen dargestellt. Neben der eingesetzten Konzentration von $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (schwarz) sind die erhaltenen Konzentrationen aus den Inkubationslösungen der Kontrollproben ohne Fasern dargestellt (mit EDC/NHS: grau; ohne EDC/NHS: hell grau). Außerdem sind die erhaltenen Konzentrationen an detektiertem fl. HS der Inkubationslösungen aus den Versuchen mit den Polymerfasern dargestellt (mit EDC/NHS: kov., ohne EDC/NHS: gestrichelt). Die Kupplungsreagenzien beeinflussen die Detektion des fl. HS. Zudem ist in den Inkubationslösungen alle Faser-Proben ein Überschuss an detektiertem fl. HS in Bezug auf die jeweilige Kontrolle zu finden.

Um herauszufinden, welche Menge an HS auf den Fasern immobilisiert werden konnte, wurden Inkubationsversuche mit fl. HS durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls zwei Kontrollproben angefertigt. Die HS-Inkubationslösungen wurden hierbei unter gleichen Versuchsbedingungen jedoch ohne Fasern ebenfalls für 24 h auf dem Schüttler bei 300 rpm behandelt. Dies geschah sowohl mit (kovalent = kov.) als auch ohne den Zusatz von EDC/NHS. Es zeigte sich, dass die Kupplungsreagenzien die detektierbare Menge an HS stark vermindern. Sie üben also einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des HS aus. Somit kann aus der quantitativen Auswertung der zugehörigen Versuche mit den Fasern nicht auf die angebundenen Mengen an HS an die Polymerfasern geschlossen werden. Die Versuche lassen jedoch einen großen Überschuss an HS in den Inkubationslösungen der Faser-Proben vermuten. Die Inkubationsversuche ohne EDC/NHS lassen vermuten, dass auf diese Weise kaum HS an die Fasern angebunden werden konnte.

7.2.2 Zuordnung aller IR-Schwingungsbanden der Polymerfasern zu den funktionellen Gruppen

Tabelle 9: Zuordnung aller Schwingungsbanden der unmodifizierten sowie amino—modifizierten Polymerfasern zu den zugehörigen funktionellen Gruppen.^[403]

Gruppe / Schwingung	Banden / cm ⁻¹	
	Faser	Faser-NH ₂
δ CH ₂	721	725
δ C-C	808	808
δ CH ₂	902	902
δ asymmetrisch COC	974	974
ν symmetrisch COC	1091	1089
ν asymmetrisch COC	1151	1163
δ CH ₂	1417	1413
δ CNH und ν CH der Amidgruppe (<i>Amid-II-Bande</i>)	—	1545
δ NH ₂	—	1600
ν C=O der Amidgruppe (<i>Amid-I-Bande</i>)	—	1660
ν C=O	1739	1743
ν symmetrisch/asymmetrisch NH ₂	—	3700-3100

7.2.3 Zetapotential der verschiedenen Nanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes

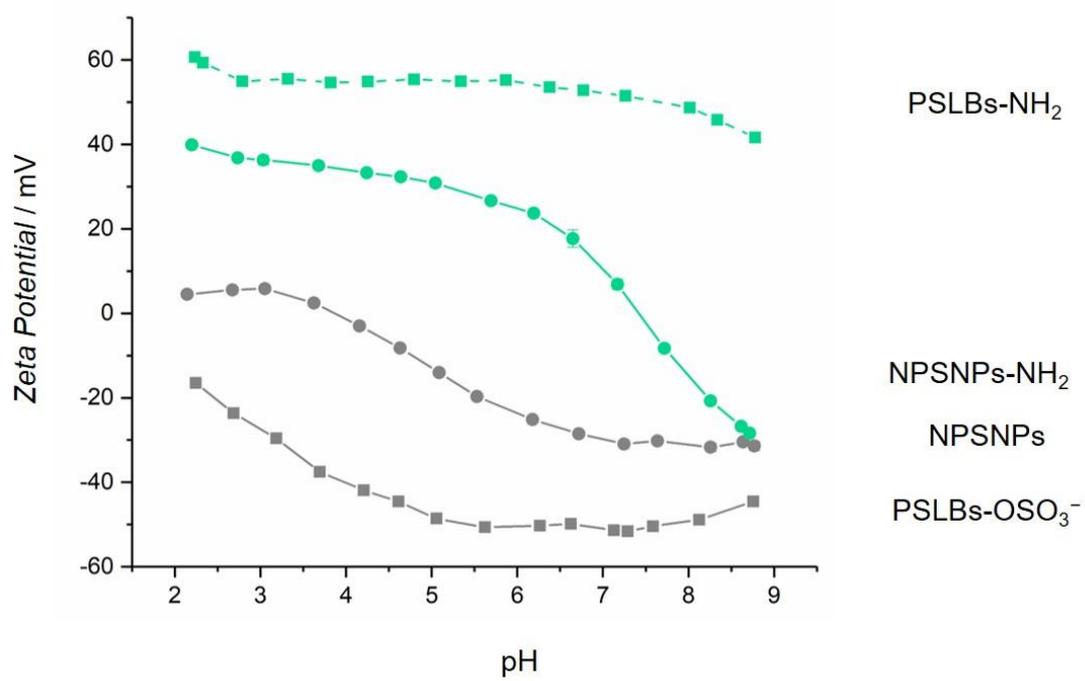


Abbildung 81: Detektiertes Zeta Potential der verschiedenen Nanopartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes.

7.2.4 Numerische Daten der Zellkulturuntersuchungen zum neuroprotektiven Effekt von BDNF gegenüber SGN

Tabelle 10: Ergebnisse der Überlebensraten der SGNs nachdem sie zwei Tage kultiviert wurden.

Probe		Überlebensrate der SGNs / %						
		Überstand entnommen nach						
		1 d	2 d	5 d	7 d	21 d	70 d	
Kontrollen	PBS	5.5 ± 0.7						
	Medium	6.1 ± 0.7						
	BDNF (50 ng·mL ⁻¹)	17.4 ± 1.3						
unmodifizierte Fasern	-HS-BDNF		22.3 ± 5.3	18.6 ± 2.0	16.1 ± 2.4	14.6 ± 2.6	12.8 ± 2.7	5.1 ± 1.4
	-HS		3.9 ± 0.8	3.6 ± 0.8	6.6 ± 1.5	7.4 ± 1.8	6.0 ± 1.1	0.3 ± 0.2
	–		4.2 ± 0.9	3.4 ± 0.7	3.8 ± 1.2	5.1 ± 0.6	5.1 ± 0.8	0.2 ± 0.1
amino-modifizierte Fasern	-HS-BDNF		18.6 ± 3.2	25.2 ± 5.0	14.5 ± 2.2	11.4 ± 2.6	9.6 ± 1.8	8.3 ± 1.9
	-HS		4.4 ± 1.0	2.9 ± 0.8	4.5 ± 1.2	5.5 ± 1.3	6.0 ± 1.5	3.3 ± 1.0
	–		2.9 ± 0.8	2.9 ± 0.6	4.4 ± 0.6	3.9 ± 0.7	5.0 ± 0.9	2.6 ± 0.4

7.2.5 Zellkulturaufnahmen zur Methodenetablierung der Sholl-Analyse

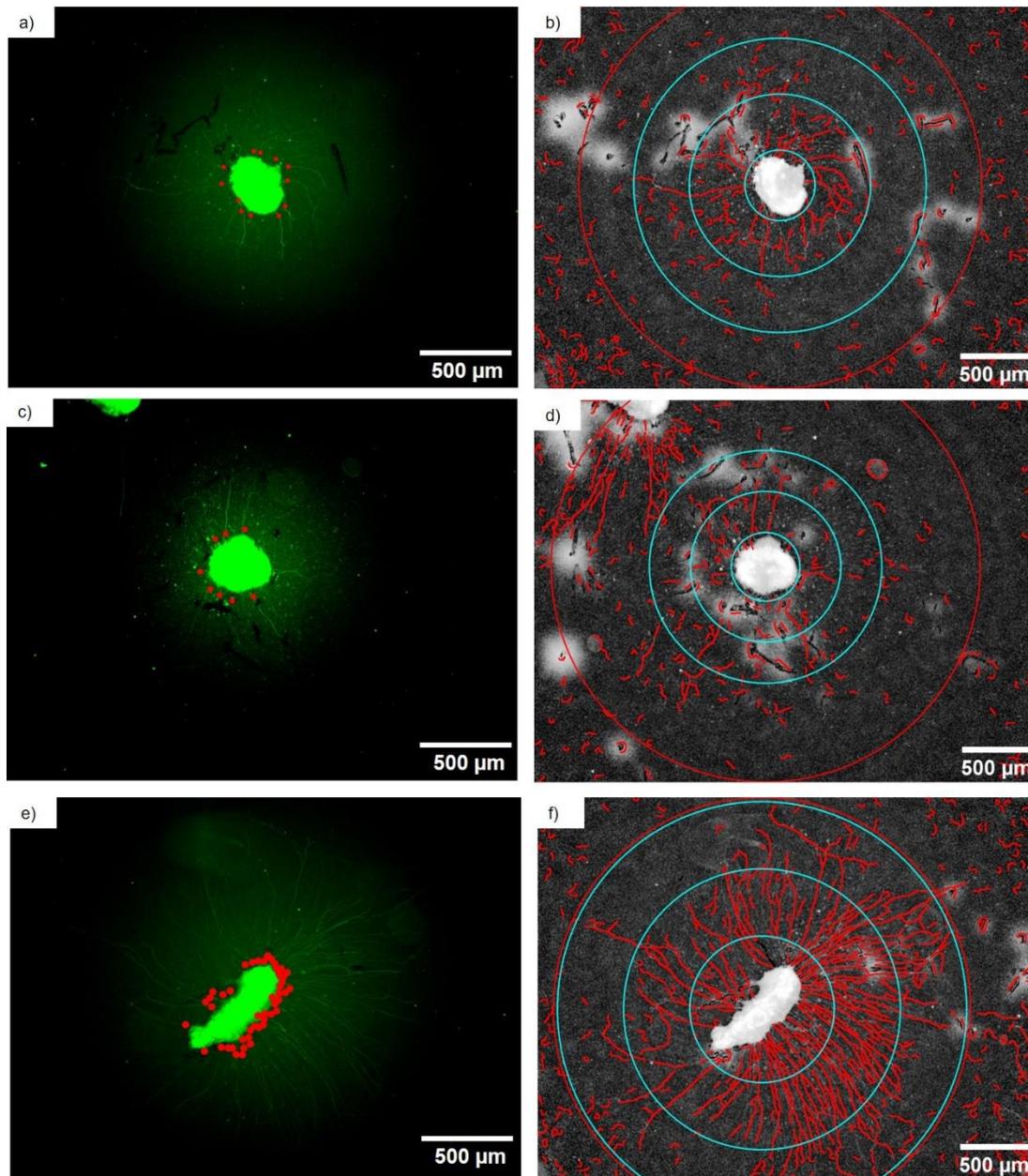


Abbildung 82: Originale Zellkulturaufnahmen sowie die zugehörigen mithilfe der Sholl-Analyse ausgewerteten Bilder. Auf den originalen Aufnahmen ist jeder aussprossende Neurit mit einem roten Punkt markiert. Es wurden Proben ausgewählt, welche mit unterschiedlich vielen Mengen an BDNF behandelt wurden. a und b): 0 ng an BDNF; selbst ausgezählt: 12 Neuriten; Anzahl der Neuriten ausgewertet mit der Sholl Analyse: 12. c und d): 5 ng an BDNF; selbst ausgezählt: 8 Neuriten; Anzahl der Neuriten ausgewertet mit der Sholl Analyse: 7. e und f): 50 ng an BDNF; selbst ausgezählt: 46 Neuriten; Anzahl der Neuriten ausgewertet mit der Sholl Analyse: 47. Da die erhaltenen Werte der beiden Methoden (Auszählung per Hand vs. computergestützte Sholl-Analyse) gut übereinstimmen, kann die Methode der computergestützten Sholl-Analyse im Rahmen dieser Arbeit ihre Anwendung finden.

7.2.6 Ausführungen zur Berechnung der mittleren Neuritenaktivität mittels Sholl-Analyse

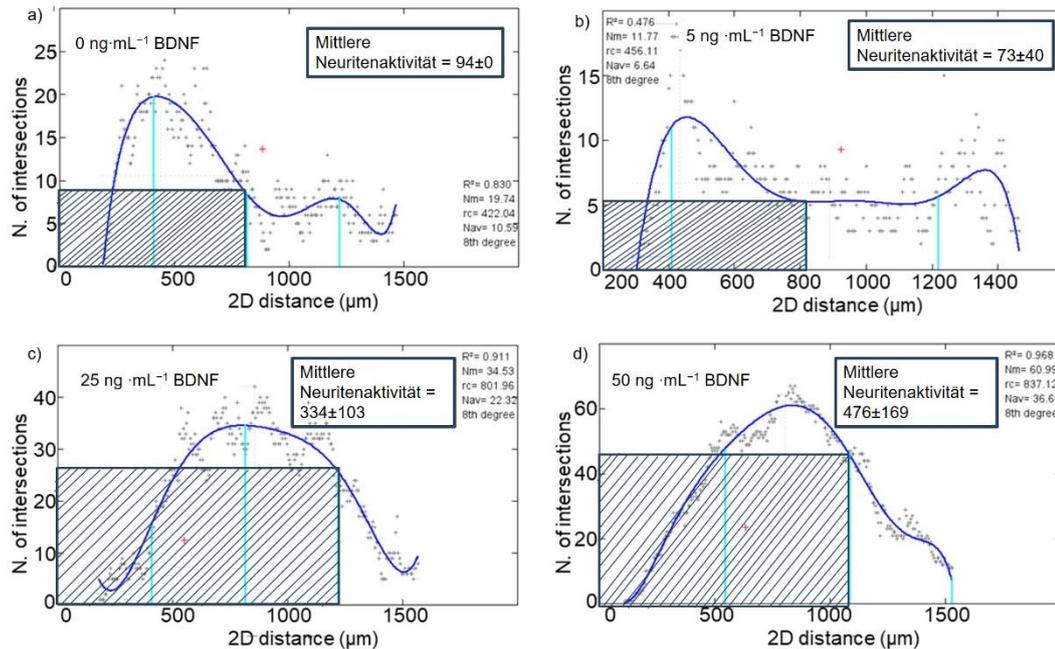


Abbildung 83: Resultate der Sholl-Analyse: Graphische Darstellung der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt mit polynomialen Fit. Außerdem sind die Abstände der hellblau markierten Kreise hervorgehoben. Die dargestellten Resultate gehören zu den Proben aus der Kalibrationsreihe mit unterschiedlicher BDNF-Zugabe ($0\text{-}50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Es ist die Berechnung der mittleren Neuritenaktivität graphisch dargestellt durch das dunkelblau schraffierte Rechteck. Hierbei handelt es sich um das Produkt aus der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis und seinem Radius (2D distance in μm). Der erhaltene Wert ist ebenfalls angefügt und stimmt mit der Größe des Rechtecks überein.

Die Abbildung zeigt Resultate der Sholl-Analyse. Die einzelnen Graphen in der Abbildung stellen die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten in Abhängigkeit von der Distanz zum Mittelpunkt des Strangstückes graphisch dar. Die Kurven der unterschiedlichen Proben haben einen vergleichbaren Verlauf. Mit zunehmender Distanz zum Mittelpunkt steigen sie bis auf ein Maximum an Schnittpunkten an, um danach wieder abzufachen. Dies verdeutlicht, dass die Anzahl an aussprossenden Neuriten mit steigendem Abstand zunächst zunimmt, da das Strangstück selbst erst einmal in seiner Distanz überwunden werden muss und anschließend eine Verzweigung der Neuriten folgt. Schließlich Enden die Neuriten, sodass die Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit den Konzentrischen Kreisen wieder abnimmt. Vor allem die Kurven der Proben ohne bzw. mit lediglich $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ BDNF weisen ihr Maximum bereits bei geringeren Distanzen ($< 500\text{ }\mu\text{m}$) auf. Das schraffierte Rechteck unter der Kurve symbolisiert die mittlere Neuritenaktivität. Hierbei handelt es sich um das Produkt aus der Anzahl der Schnittpunkte der detektierten Neuriten mit dem mittleren Kreis und seinem Radius (2D distance in μm). Die Größe des Rechtecks symbolisiert den Wert der jeweils errechneten mittleren Neuritenaktivität. Somit wird davon ausgegangen, dass die Methode zur Berechnung der mittleren Neuritenaktivität im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden kann und zu vergleichbaren Resultaten zwischen den einzelnen Proben führt.

7.2.7 Original-Zellkulturaufnahmen der ausgewerteten Sholl-Analyse

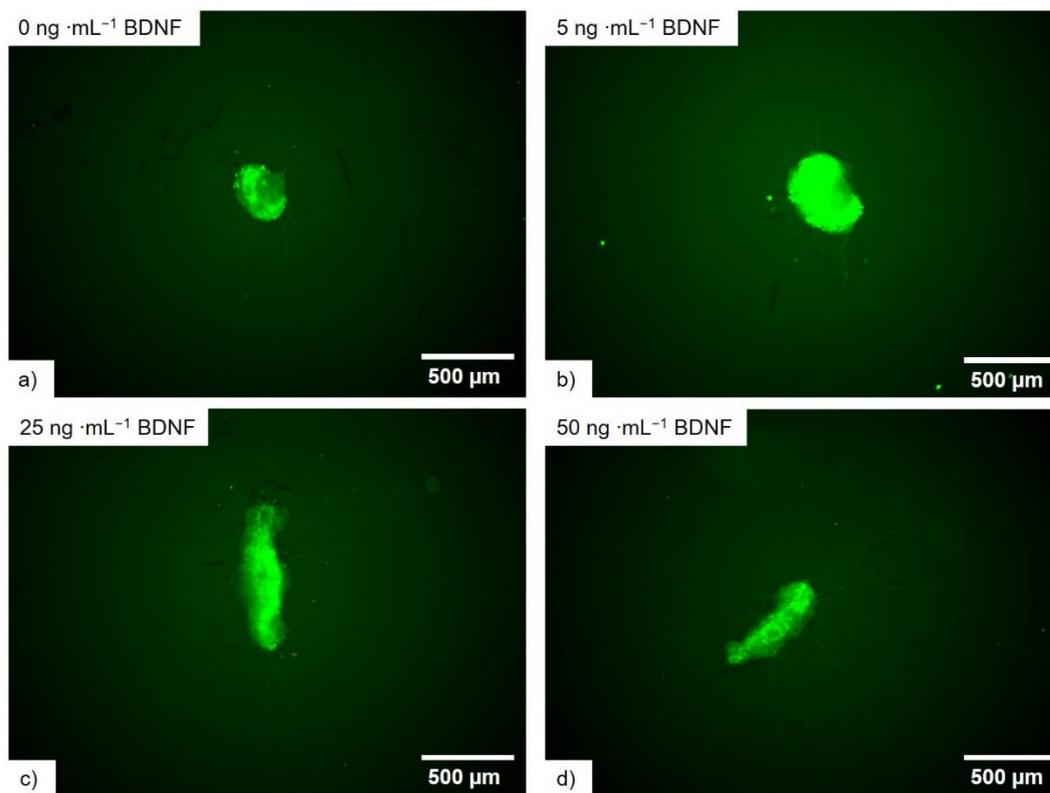


Abbildung 84: Original-Zellkulturaufnahmen der Proben für die Kalibrationsreihe, welche mit der Sholl-Analyse ausgewertet wurden.

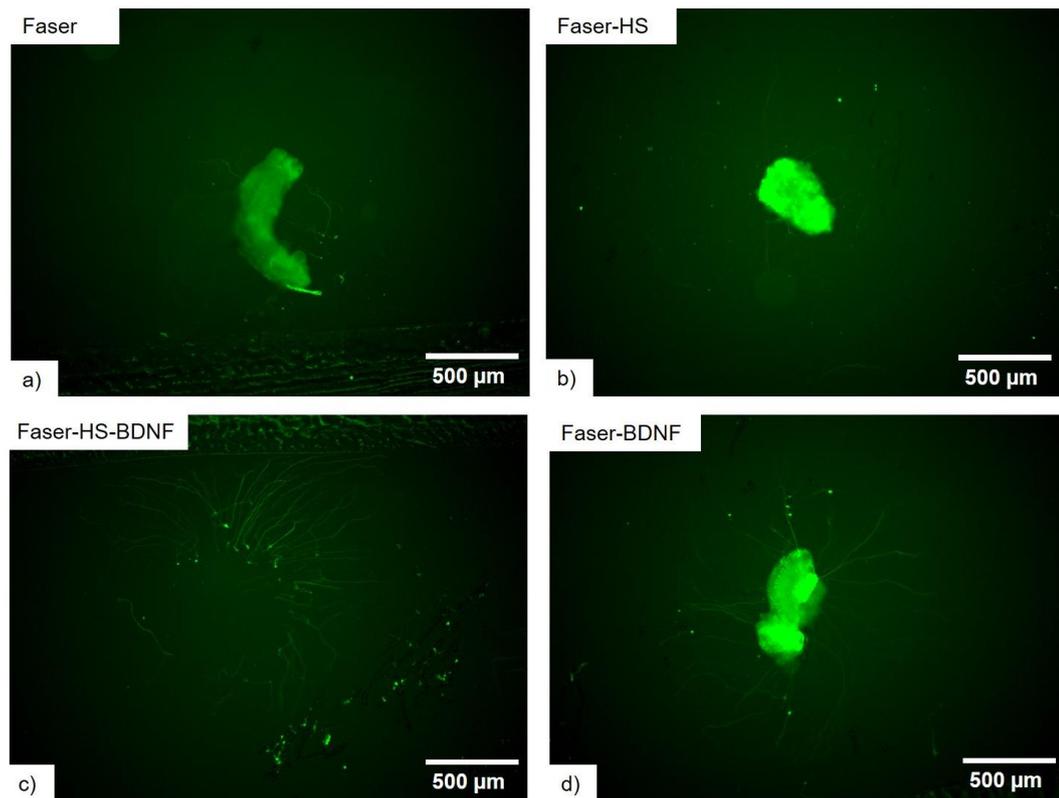


Abbildung 85: Original-Zellkulturaufnahmen der Proben der unmodifizierten Polymerfasern, welche mit der Sholl-Analyse ausgewertet wurden.

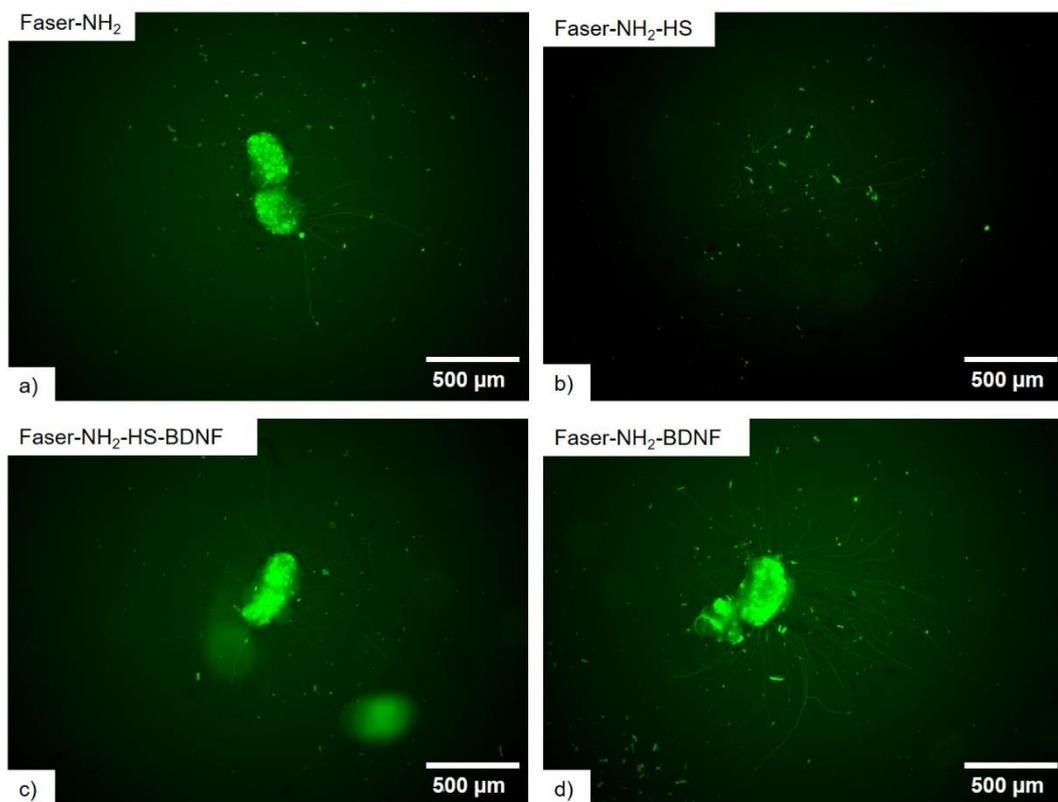


Abbildung 86: Original-Zellkulturaufnahmen der Proben der amino-modifizierten Polymerfasern, welche mit der Sholl-Analyse ausgewertet wurden.

7.3 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Artikel

Development of neuronal guidance fibers for stimulating electrodes: Basic construction and delivery of a growth factor

Wille, I., Harre, J., Oehmichen, S., Lindemann, M., Menzel, H., Ehlert, N., Lenarz, T., Warnecke, A., Behres, P., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10, 776890

Vorträge

Functionalization of Polymer Fibers for Neuronal Regeneration

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Summer School 2018 Soltau

Geht ins Ohr, bleibt im Kopf - Die Optimierung des Cochlea-Implantats

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

Winterfeldpreis 2018 Hannover

Functionalization of Polymer Fibers for Neuronal Regeneration

I. Wille, N. Schmidt, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

EuroBioMat 2019 Weimar

Posterbeiträge (als Hauptautor)

Functionalization of polymer fibers with heparan sulfate as a representative of the extracellular matrix

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

EuroBioMat 2017 Weimar

Functionalization of polymer fibers with extracellular matrix components

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

Inner Ear Biology 2017 Hannover

Functionalization of polymer fibers with extracellular matrix components

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) 2017 Würzburg

Polymer fibers: Functionalization with components of the extracellular matrix

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

NanoDay 2017 Hannover

Functionalization of Polymer Fibers with Heparan Sulfate as a Representative of the Extracellular Matrix

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

International Symposium of Biofabrication for NIFE 2017 Hannover

Development of Implants for Neuronal Regeneration

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Summer School 2017 Lüneburg

Functionalization of Polymer Fibers for Neuronal Regeneration

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Summer School 2018 Soltau

Fiber-based Neuronal Guidance Scaffold

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Summer School 2019 Visselhövede

Fiber-based Neuronal Guidance Scaffold

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Symposium 2019 Hannover

Fiber-based Neuronal Guidance Scaffold

I. Wille, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

H4all Symposium 2020 Online

7.4 Lebenslauf

| Inga Wille

Geburtsdatum	08.01.1991
11/2016 – 04/2021	Promotionsvorhaben zum Dr. rer. nat in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Behrens am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Dissertation: Entwicklung einer neuronalen Leitstruktur für die biomimetische Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Rahmen der cochleären Regeneration
10/2014 – 09/2016	M. Sc. Material- und Nanochemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Masterarbeit: <i>Funktionalisierung von Polymerfasern für den Einsatz als neuronale Leitstruktur</i>
01/2014 – 05/2014	Auslandssemester am Eckerd College in Tampa, Florida, USA
10/2011 – 12/2014	B. Sc. Fächerübergreifender Bachelor Chemie / Physik an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Bachelorarbeit: <i>Synthese von Bismutwolframat-Nanoplättchen</i>
03/2011 – 06/2011	Freiwilliges Praktikum bei VW Nutzfahrzeuge in Hannover
10/2010 – 03/2011	B. Sc. Architektur an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
07/2010	Abitur am Gymnasium Bad Nenndorf