

Untersuchungen von Hydrogelen als Neuritogenese-Matrix für primäre auditorische Neurone

J. Schwieger¹, N. Kakuan¹, A. Osorio-Madrado², Th. Lenarz¹, V. Scheper¹

¹HNO-Klinik, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland;

²Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

HNO-Klinik und Deutsches HörZentrum Hannover (DHZ) der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Th. Lenarz)

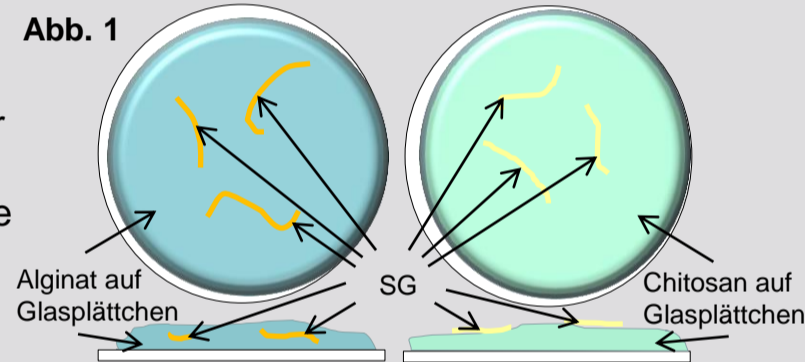
Einleitung

Eine Überbrückung des Abstandes zwischen der Elektrode des Cochlea-Implantats (CI) und den zu erregenden Spiralganglienneuronen (SGN) im Rosenthal-Kanal könnte die Implantat-Nerv-Interaktion verbessern. Eine Reduzierung störender Wechselwirkungen sowie eine gezieltere elektrische Stimulation wären dadurch möglich. Für einen direkten Kontakt zwischen Elektrode und SGN müsste deren Dendriten ein gerichtetes Wachstum durch die flüssigkeitsgefüllte Scala tympani ermöglicht werden. Vor diesem Hintergrund wurden Alginate^a und Chitosan^b in verschiedenen Viskositäten und in Kombination mit neuritogenen Faktoren^c (NF) in vitro auf ihre Eignung als Matrix für ein Neuritenwachstum untersucht.

Material und Methoden

In vitro-Kultur:

Spiralganglion (SG) - Explantate neonataler Ratten (P3-5), Kultivierung für 5 Tage in Alginate oder auf Chitosan (Abb. 1).



Hydrogele:

Unterschiedliche Viskositäten wurden beim Alginate durch unterschiedliche Anteile der Braunalgen *Lessonia nigrescens* (sehr flexibel) und *Lessonia trabeculata* (sehr steif) bestehend aus Copolymeren von D-Mannuronsäure (M) und L-Guluronsäure (G) und unterschiedliche Verlinkungen erreicht. Chitosan ist ein Polysaccharid aus D-Glucosamin (GlcN) und N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc). Unterschiedliche Konzentrationen (0,7-2%) eines stark deacetylierten Chitosans (DA: 2,5%) beeinflussten die Viskosität.

Konditionen:

Hydrogelviskositäten:

Alginate: weiches Alginate (*L. trabeculata*, 0,65% in NaCl), 2 mM BaCl vernetzt; steifes Alginate (1:1-Gemisch von *L. nigrescens* und *L. trabeculata* 0,65% in NaCl) 2 mM BaCl oder 20 mM BaCl vernetzt; Chitosan: 0,7%, 1,0%, 1,3% oder 2,0%

Neuritogene Faktoren:

50 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 100 ng/ml ciliary neurotrophic factor (CNTF) oder 50 ng/ml BDNF + 100 ng/ml CNTF

Kontrollen: 10% fötales Rinderserum (Positivkontrolle, FCS), keine Ergänzungen (Negativkontrolle, NK)

Auswertung:

immunzytochemische Färbung (anti-Neurofilament: grün; DAPI: blau) (Abb. 4 & 5), Analyse mittels CLSM (confocal laser scanning microscopy), Anzahl und Länge der in Alginate / auf Chitosan wachsenden Neuriten (Abb. 2 & 3)

Ergebnisse

Alginate:

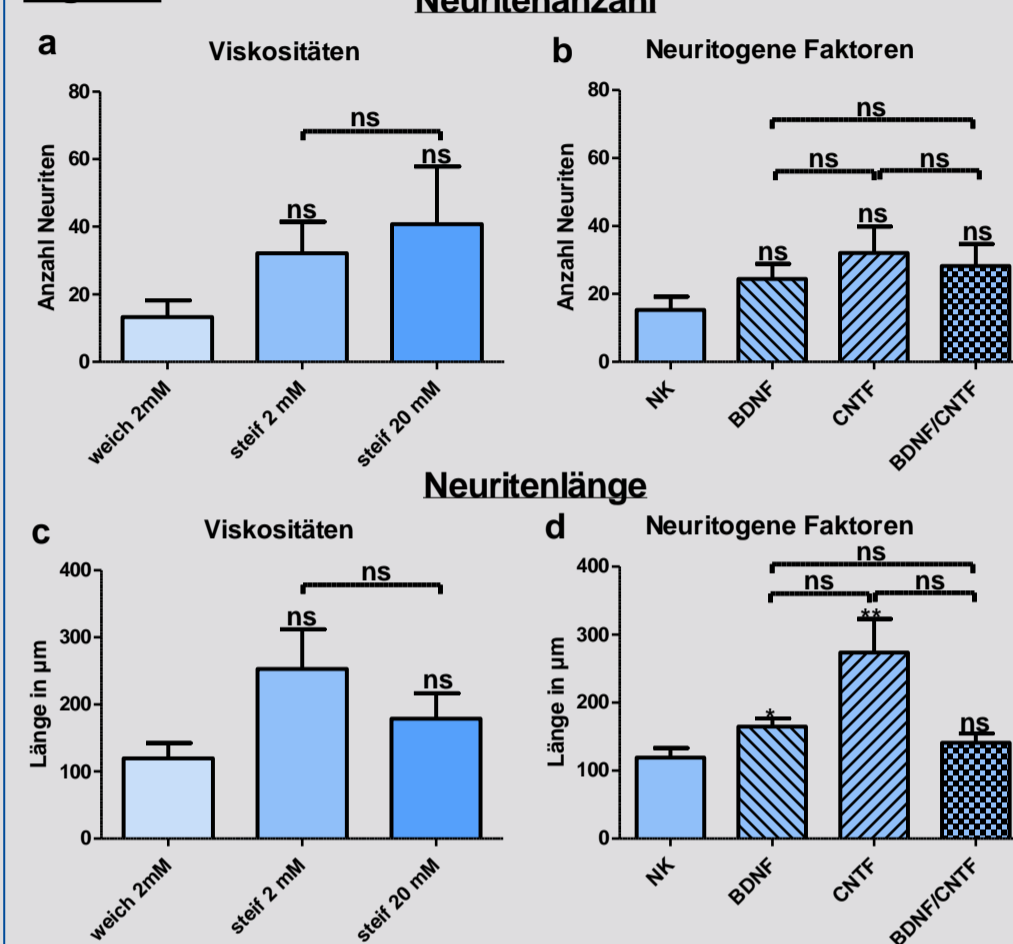


Abb. 2: Die getesteten Konditionen haben wenig Einfluss auf das Neuritenwachstum. Die meisten Neuriten sind tendenziell in **steifem, 20mM-verlinktem Alginate** (a) nachweisbar. Im Vergleich zur NK führt die Zugabe von **BDNF** und besonders **CNTF** zu einer **Erhöhung der Anzahl der Neuriten** (b). In weichem Alginate ist das Wachstum insgesamt geringer. Das **Längenwachstum der Neuriten** ist in **steifem, 2mM-verlinktem Alginate** tendenziell am **höchsten** (c). Die genannten Unterschiede sind nicht signifikant. Die Zugabe von **BDNF**- und insbesondere **CNTF**, aber nicht deren Kombination, **erhöht die Neuritenlänge signifikant** (d).

Signifikanzen über den Fehlerbalken beziehen sich auf weiches, 2mM-verlinktes Alginate (a/c) bzw. die Negativkontrolle (NK) (b/d). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant

Chitosan:

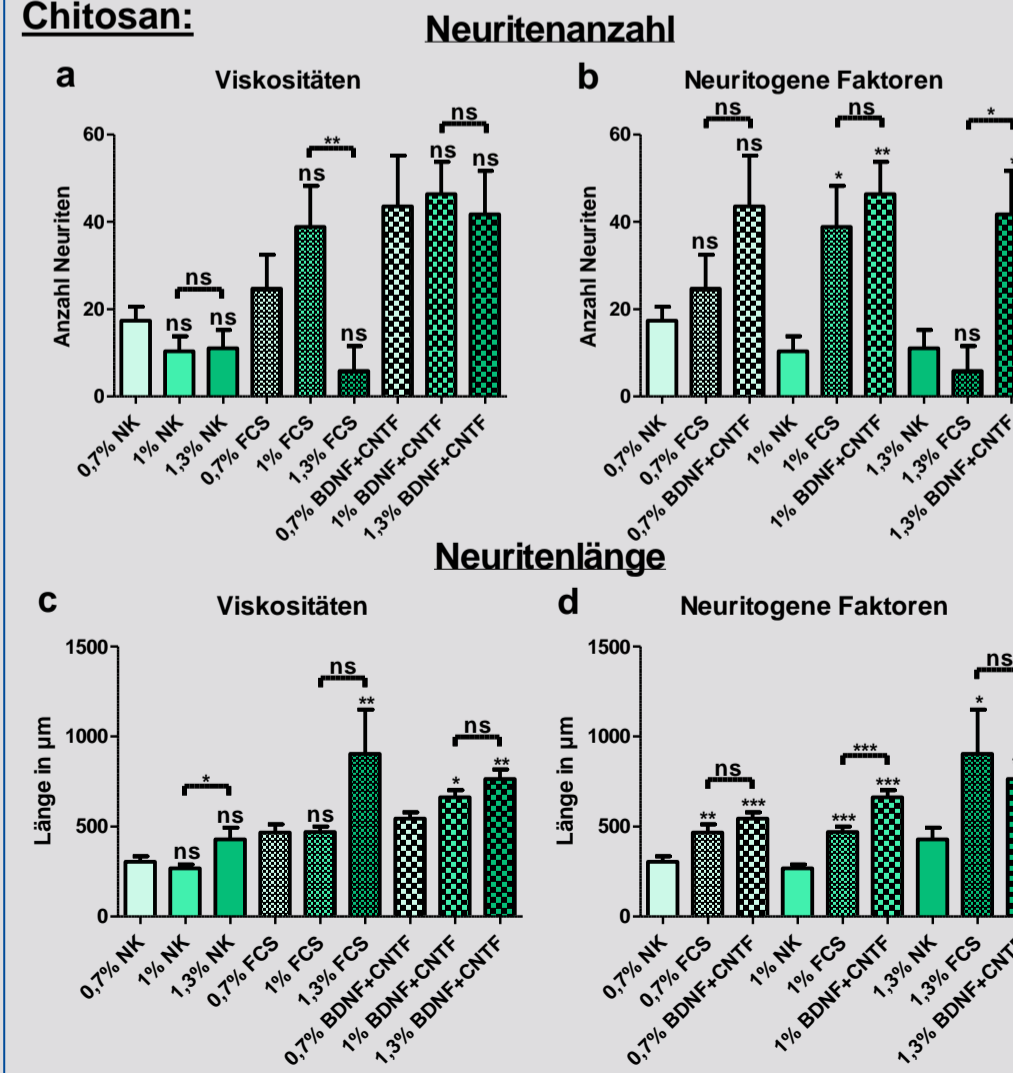


Abb. 3: Die **Viskosität** des Chitosans hat **weniger Einfluss** auf die Regeneration von Neuriten als die **Zugabe von Serum oder NF**. Mit FCS- und NF-Zugabe ist die **Anzahl** für **1% Chitosan am höchsten** (a & b). Im Vergleich zu den geringer konzentrierten Chitosanen ist das **Neuritenwachstum auf 1,3% Chitosan signifikant am längsten** (c). Die Zugabe von **Serum und BDNF und CNTF** steigert das **Längenwachstum der Neuriten signifikant** (d). Signifikanzen über den Fehlerbalken beziehen sich auf 0,7% (a/c) bzw. die Negativkontrolle (NK) (b/d)). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = nicht signifikant

Alginate:

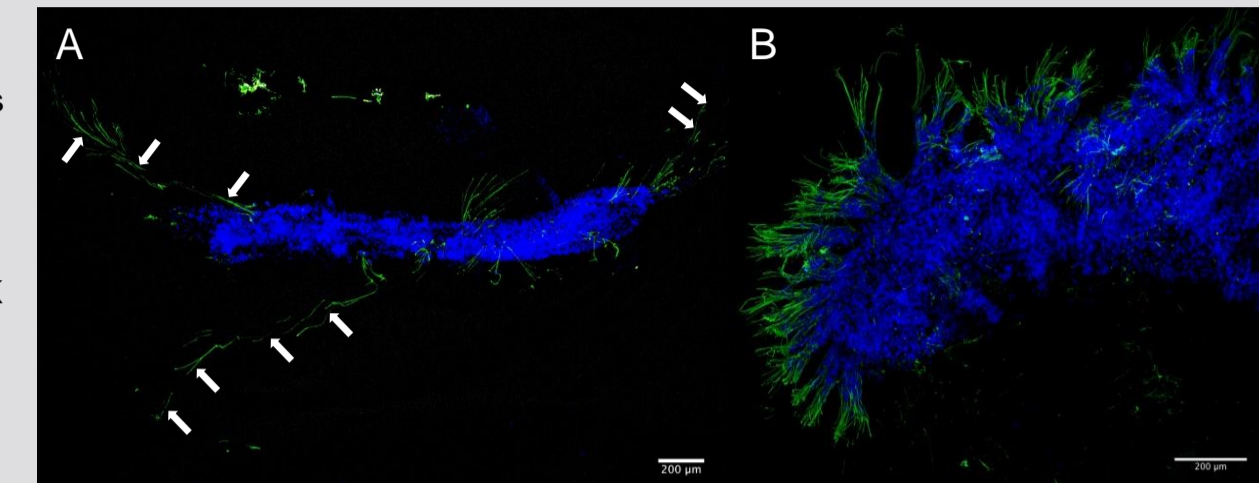


Abb. 4: Neuritenregeneration in steifem, 2mM-verlinktem Alginate mit längeren Neuriten (beispielhaft mit Pfeilen markiert) (A) und steifem, 20mM-verlinktem Alginate mit einer höheren Anzahl von Neuriten (B). Die Kultivierung erfolgte mit 100 ng/ml CNTF. Aufnahmen mit CLSM, Neuriten (Neurofilament): grün, Zellkerne (DAPI): blau

Chitosan:

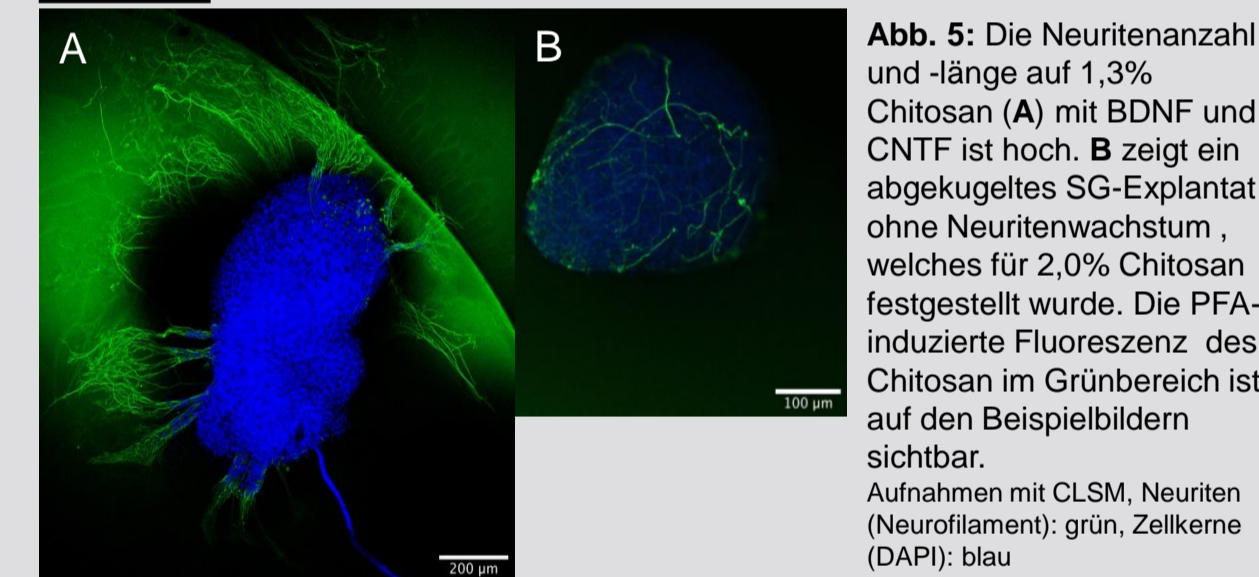


Abb. 5: Die Neuritenanzahl und -länge auf 1,3% Chitosan (A) mit BDNF und CNTF ist hoch. B zeigt ein abgekugelttes SG-Explantat ohne Neuritenwachstum, welches für 2,0% Chitosan festgestellt wurde. Die PFA-induzierte Fluoreszenz des Chitosan im Grünbereich ist auf den Beispielbildern sichtbar. Aufnahmen mit CLSM, Neuriten (Neurofilament): grün, Zellkerne (DAPI): blau

Diskussion

Ein **Durchwachsen von regenerierten Neuriten durch Alginate** ist möglich, wobei steifes, 2mM-verlinktes Alginate am besten als Matrix geeignet zu sein scheint. **Chitosan** in Konzentrationen von 1% und 1,3% zeigte sich als **Oberfläche für Neuritenwachstum** besonders attraktiv. **BDNF** und **CNTF verstärken die Neuritogenese** in Alginate und als Kombination beim Wachstum auf Chitosan. Eine Wirkung beider NF durch das Alginate hindurch ist feststellbar. Bei der kombinierten NF-Gabe könnte die Diffusion gestört sein, da hier kein verstärktes Längenwachstum feststellbar ist. Es ist zu beachten, dass aufgrund des dreidimensionalen Wachstums der Neuriten nicht alle gezählt bzw. komplett vermessen werden und die Analyse daher nur eingeschränkt erfolgen konnte.

Beide Hydrogele besitzen, besonders in Kombination mit NF, ein vielversprechendes Potential als Matrix für regenerierte Neuriten und somit zur **Überbrückung des Abstandes zwischen CI-Elektrode und den SGN**.

Literatur:

^aZimmermann, H, Zimmermann, D., Reuss, R. et al. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. J Mater Sci: Mater Med. 2005; 16(6): 491-501.

^bFreier, T et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. Biomaterials. 2005; 26(29): 5872-8.

^cGillespie LN, Shepherd RK. Clinical application of neurotrophic factors: The potential for primary auditory neuron protection. Eur J Neurosci. 2005; 22(9): 2123-33.