

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Neuroprotektion und Fibrosereduktion  
bei Cochlea-Implantat-Anwendung**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin

-Doctor medicinae veterinariae-

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Mareike Hütten

Bremen

Hannover 2014

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Timo Stöver

Ehemals: Medizinische Hochschule Hannover

Jetzt: Universitätsklinikum Frankfurt

PD Dr. Karl-Heinz Esser

Institut für Zoologie

1. Gutachter: PD Dr. Karl-Heinz Esser

2. Gutachter: PD Dr. Michael Stern

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2014

Diese Dissertation wurde im Rahmen des von der EU geförderten Forschungsprojekts „NANOEAR“ sowie der von der DFG geförderten „Exzellenzakademie Medizintechnik – Adaptive Implantate in der Medizin“ angefertigt.

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort .....	5
2. Veröffentlichungen.....	7
3. Einleitung .....	9
4. Publikation I.....	13
4.1 Abstract .....	14
4.2 Literatur.....	15
5. Publikation II.....	17
5.1 Abstract .....	19
5.2 Literatur.....	20
6. Diskussion .....	23
6.1 Publikation I.....	23
6.2 Publikation II.....	27
7. Zusammenfassung.....	33
8. Summary .....	37
9. Literaturverzeichnis.....	39

## 1. Vorwort

Die in dieser Arbeit verwendeten Trägerstoffe (UHV-Alginat, NCO-sP(EO-stat-PO)) sowie die Anleitung zur Verarbeitung dieser wurden von Frau Dr. Friederike Erhart und Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann, Fraunhofer IBMT, St. Ingbert, bzw. Herrn Anandhan Dhanasingh und Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll, RWTH Aachen, in Zusammenarbeit mit MED-EL Innsbruck bereitgestellt. Die Ergebnisse der am NCO-sP(EO-stat-PO) Hydrogel durchgeführten *In-vitro*-Versuche sowie die diesbezüglich in der gemeinsamen Veröffentlichung erschienenen Kapitel entstammen ebenfalls der Arbeit oben genannter Personen.

Alle übrigen in der vorliegenden Dissertation erwähnten Versuchsschritte oblagen der Verantwortung und Durchführung der Autorin.



## 2. Veröffentlichungen

Inhalte dieser Dissertation wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. (DGHNO), 12.-16.05.2010, Wiesbaden

### **Optimierung von Cochlea Implantaten - Hydrogele als Scaffold für wachstumsfaktorproduzierende Zellen**

Verena Scheper<sup>1</sup>, Jürgen Groll<sup>2</sup>, Friederike Ehrhart<sup>3</sup>, Heiko Zimmermann<sup>3</sup>, Thomas Lenarz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover

<sup>2</sup> Deutsches Wollforschungsinstitut, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

<sup>3</sup> Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), St. Ingbert

Inner ear biology (IEB), 18.-21.09.2011, Lissabon

### **Hydrogel based Application of Dexamethasone for Inner Ear Therapy**

Hütten, M<sup>1</sup>, Möller, M<sup>2</sup>, Hessler, R<sup>3</sup>, Stöver, T<sup>4</sup>, Esser, K-H<sup>5</sup>, Lenarz, T<sup>1</sup>, Scheper, V<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Hannover Medical School, Germany

<sup>2</sup> Institute for Textile and Molecular Chemistry, RWTH Aachen, Germany

<sup>3</sup> MED-EL, Innsbruck, Austria

<sup>4</sup> Department of Otolaryngology, KGU Frankfurt am Main, Germany

<sup>5</sup> Institute of Zoology, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), 10.-12.11.2011, Gießen

### **Dexamethasonapplikation durch Hydrogel zur Innenohrtherapie**

Hütten, M<sup>1</sup>, Möller, M<sup>2</sup>, Hessler, R<sup>3</sup>, Stöver, T<sup>4</sup>, Esser, K-H<sup>5</sup>, Lenarz, T<sup>1</sup>, Scheper, V<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover

<sup>2</sup> Institut für Textilchemie und Makromolekulare Chemie, RWTH Aachen

## Veröffentlichungen

<sup>3</sup> MED-EL, Innsbruck, Österreich

<sup>4</sup> Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, KGU Frankfurt am Main

<sup>5</sup> Institut für Zoologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. (DGHNO), 16.-20.05.2012, Mainz

### **Fibrosereduktion und Resthöreerhalt durch implantierbare Hydrogelreservoirs im Tiermodell**

Hütten, M.<sup>1</sup>, Esser, K.-H.<sup>2</sup>, Hessler, R.<sup>3</sup>, Stöver, T.<sup>4</sup>, Lenarz, T.<sup>1</sup>, Scheper, V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover

<sup>2</sup> Institut für Zoologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

<sup>3</sup> MED-EL Innsbruck

<sup>4</sup> Klinik für HNO-Heilkunde, KGU Frankfurt am Main

.

### 3. Einleitung

Hörminderung und Taubheit stellen einen der weitestverbreiteten Krankheitskomplexe der westlichen Welt dar. Nach Aussage der World Health Organization leiden derzeit annähernd 300 Millionen Menschen weltweit an mittel- bis hochgradigem Verlust ihres Hörvermögens, sei es durch erbliche Krankheiten, Infektionen, Medikamente, Traumata oder andere Faktoren (WHO 2013). Dieser Hörverlust stellt einerseits eine soziale Herausforderung für die Betroffenen und ihr Umfeld dar, da mangelnde Kommunikationsfähigkeit in jeder zwischenmenschlichen Lage im privaten und beruflichen Bereich hinderlich ist. Besonders hörgeschädigte Kinder sind in ihrer Sprachentwicklung massiv eingeschränkt und oft sozial isoliert. Andererseits birgt die hohe Rate an Menschen mit Einbußen im Hörvermögen auch immense ökonomische Herausforderungen, da die medizinische Behandlung, spezielle Ausbildung und die weitere Versorgung gehörloser, arbeitsunfähiger oder nur eingeschränkt arbeitsfähiger Personen finanziert werden müssen.

Bis zum Jahre 2012 wurden 324.200 Menschen mit Cochlea-Implantaten (CIs) versorgt ((NIDCD, 2014). Schätzungen von 2004 zufolge waren allein 1,25 Millionen Amerikaner Anwärter für das Einsetzen eines Hybrid-Implantates (Cochlear.com, 2013).

Eine Problematik der CIs besteht in dem Insertionstrauma, das beim Einführen des Implantates auftritt, und nachfolgend in der Reaktion des umliegenden Gewebes auf zerstörte Zellen und auf das Implantat als Fremdkörper. In Folge kommt es zur Bildung von Bindegewebe innerhalb der Cochlea, zur Ausfüllung der *Scala tympani* mit Bindegewebe und zur Abkapselung der CI-Elektrode, was zu einer Minderung des verbliebenen Restgehörs, einer erhöhten Impedanz und einem schlechteren Höreindruck mittels CI führt.

Eine weitere Folge der Insertion eines Implantats kann im Untergang von Haar- und Spiralganglienzellen (SGZ) bestehen, welche das akustische Signal in einen elektrischen Reiz umwandeln und an den Hörnerven weiterleiten sollen. Diese Zellreduktion geschieht entweder durch mechanische Zerstörung während der Implantation, durch eine nachfolgende Entzündung oder im Falle der SGZ sekundär nach Verlust der Haarzellen aufgrund fehlender neurotropher und elektrischer Stimuli.

Dies ist für die Nutzung des CI hinderlich, da es auf SGZ als Überträger der elektrischen Impulse angewiesen ist. Hybrid-Implantate überlassen zudem das Wahrnehmen tiefer Frequenzen, deren Rezeption in den häufig noch unbeschädeten inneren Windungen der Cochlea stattfindet, komplett dem körpereigenen System. Folglich ist der Erhalt von SGZ von hoher Bedeutung für den Einsatz von CIs im Allgemeinen und Hybrid-Implantaten im Besonderen.

Innerhalb dieser Arbeit behandelte Lösungsansätze bestehen in dem Einsatz des Wachstumsfaktors brain-derived neurotrophic factor (BDNF) zur Erhaltung der SGZ und in der Anwendung von Dexamethason (DEX) zur Entzündungsreduktion.

Der erste Lösungsansatz beinhaltete den Einsatz des BDNF, eines neurotrophen Faktors, der die Überlebenszeit von SGZ *in vitro* wie auch *in vivo* zu verlängern vermag (Gillespie et al., 2005). Die Kombination aus BDNF und elektrischer Stimulation, beispielsweise durch ein CI, wirkt sich sogar synergetisch auf den Erhalt von SGZ aus (Shepherd et al., 2005). Daraus folgend sollte ein System entwickelt werden, welches das Einbringen von BDNF simultan zur CI-Versorgung ermöglicht und eine langfristige BDNF-Ausschüttung gewährleistet. Wie auch bei der Therapie mit DEX stellen Pumpen und Injektionen für die BDNF-Applikation keine praxistaugliche Alternativen dar, jedoch mag ein zellbasiertes Applikationssystem eine Lösung bieten. So existieren BDNF-produzierende Fibroblasten (NIH3T3-Fibroblasten), welche in ersten Zellversuchen neuroprotektive Wirkung zeigten (Warnecke et al., 2007) und auch auf der Oberfläche von Silikon, wie sonst für CIs verwendet, zu vielversprechenden Ergebnissen führten (Warnecke et al., 2012). Um diese für den Patienten exogenen Fibroblasten vor einer Immunreaktion des Rezipienten zu schützen, Migration vom Elektrodenkörper ins Innenohr zu vermeiden und die Anzahl der BDNF-produzierenden Fibroblasten in einem adäquaten Rahmen zu halten, wurden diese Zellen vorliegend in ein Ultra-high viscosity-Alginat (UHV-Alginat) eingebettet. Dieses Alginat verfügt über bioinerte und semipermeable Eigenschaften und verhält sich *in vitro* wie auch *in vivo* langzeitstabil (Schneider et al., 2005; Zimmermann et al., 2007). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit sollten die biologische Verträglichkeit des Alginats für die BDNF-produzierenden Fibroblasten getestet werden, die Freisetzung von BDNF aus dem Alginat-Verbund heraus

gemessen werden sowie eine Beurteilung des SGZ-Überlebens nach Inkubation mit dem im Alginat gebildeten BDNF als Nachweis eines biologischen Effektes erfolgen.

DEX ist nachweislich dazu geeignet, beim Einsetzen von CIs die noch vorhandenen Haarzellen zu erhalten (Vivero et al., 2008) und innerhalb von 28 Tagen das durch DEX geschützte Hörvermögen zu stabilisieren (Eshraghi et al., 2007). Die große Herausforderung lag in der langfristigen Applikation des DEX, da der Einsatz von Pumpen mangelhaftes Handling und eine ungenügende Freisetzungsdauer mit sich bringt und cochleäre Injektionen von DEX ein hohes Infektionsrisiko beherbergen. Im Rahmen des EU-Projekts „NANOEAR“ wurde dagegen ein Applikationssystem entwickelt, das auf der Nutzung eines Hydrogels (NCO-sP(EO-stat-PO)) basiert, welches mit hydrophilen Stoffen wie DEX beladen werden kann und die kontinuierliche Freisetzung dieser Stoffe reguliert. Innerhalb meiner Versuche wurde ein mit DEX befülltes Hydrogelreservoir ins Innenohr von Meerschweinchen implantiert und sein Einfluss auf Bindegewebswachstum und Hörvermögen getestet.



## 4. Publikation I

### UHV-Alginate as Matrix for Neurotrophic Factor Producing Cells - A Novel Biomaterial for Cochlear Implant Optimization to Preserve Inner Ear Neurons From Degeneration

\*†Mareike Hütten, ‡Friederike Erhart, §Heiko Zimmermann, \*kUta Reich,  
†Karl-Heinz Esser, \*Thomas Lenarz, and \*Verena Scheper

\* Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Hannover Medical School

† University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Institute of Zoology, Hannover

‡ Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering IBMT, St. Ingbert

§ Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Biotechnologie/Nanotechnologie der Universität des Saarlandes, St. Ingbert

k Department of Otorhinolaryngology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin Mitte, Berlin, Germany.

Otol Neurotol. 2013 Aug;34(6):1127-33. doi: 10.1097/MAO.0b013e3182804949.

## 4.1 Abstract

**Hypothesis:** Ultra high viscous (UHV-) alginate is a suitable matrix for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) producing cells, enabling cell survival and BDNF release out of the matrix and subsequent protection of auditory neuronal cells.

**Background:** Cochlear implant (CI) target cells, spiral ganglion cells (SGC), undergo a progressive degeneration. BDNF prevents SGC from degeneration but has to be delivered locally to the inner ear for months. A permanent growth factor application may be realized via a cell-based drug delivery system. Encapsulation of this delivery system into a matrix could avoid immune response of the recipient, migration, and uncontrolled proliferation of the cells.

**Methods:** NIH3T3-fibroblasts producing endogenous BDNF were incorporated in UHV-alginate. The survival of the cells in the alginate was examined by cell counts of cryogenic slices, and the BDNF production was determined by performing ELISA. The supernatant of the alginate-cell culture was added to primary SGC culture, and the neuroprotective effect of the produced BDNF was observed performing SGC counts.

**Results:** BDNF-producing cells cultivated in UHV-alginate survived for up to 30 days, which was the latest time point observed. The BDNF concentration in cell culture medium, produced from in UHV-alginate incorporated fibroblasts and released out of the alginate matrix into the medium, was significantly increased after 30 days of cultivation. Supernatant of 7 days incubated UHV-alginate containing NIH3T3/BDNF cells significantly increased the SGC survival *in vitro*.

**Conclusion:** This study demonstrates UHV-alginate to be a suitable scaffold for BDNF-producing fibroblasts. UHV-alginates are a promising biomaterial for cochlear implant biofunctionalization.

**KeyWords:** Brain-derived neurotrophic factor; Cell-based Therapy; Cochlear implant; Local drug delivery Spiral ganglion; neuron.

## 4.2 Literatur

- Agterberg, M.J., Versnel, H., van Dijk, L.M., de Groot, J.C., Klis, S.F. 2009. Enhanced survival of spiral ganglion cells after cessation of treatment with brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *J Assoc Res Otolaryngol* 10, 355-67.
- Borenstein, J.T. 2011. Intracochlear drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 8, 1161-74.
- Braccini, I., Grasso, R.P., Perez, S. 1999. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydr Res*, 317, 119-30.
- Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Lemmi, A., Montanucci, M.P., Calabrese, G., Racanicchi, L., Mancuso, F., Brunetti, P. 2006. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 29, 137-8.
- Chikar, J.A., Hendricks, J.L., Richardson-Burns, S.M., Raphael, Y., Pflugst, B.E., Martin, D.C. 2012. The use of a dual PEDOT and RGD-functionalized alginate hydrogel coating to provide sustained drug delivery and improved cochlear implant function. *Biomaterials* 33, 1982-90.
- Colton, C.K. 1995. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 4, 415-36.
- Garnham C, R.G., Jolly C, et al. 2005. Drug delivery to the cochlea after implantation: consideration of the risk factors. *Cochlear Implants Int* 22, 2123-33.
- Gillespie, L.N., Shepherd, R.K. 2005. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *Eur J Neurosci* 22, 2123-33.
- Gillespie, L.N., Clark, G.M., Bartlett, P.F., Marzella, P.L. 2003. BDNF-induced survival of auditory neurons in vivo: Cessation of treatment leads to accelerated loss of survival effects. *J Neurosci Res* 71, 785-90.
- Heiligenstein, S., Cucchiari, M., Laschke, M.W., Bohle, R.M., Kohn, D., Menger, M.D., Madry, H. 2011. Evaluation of nonbiomedical and biomedical grade alginates for the transplantation of genetically modified articular chondrocytes to cartilage defects in a large animal model in vivo. *J Gene Med* 13, 230-42.
- Kühtreiber, W.M., Lanza, R.P., Chick, W.L. 1999. Cell encapsulation technology and therapeutics. Birkhäuser, Boston.
- Lanza, R.P., Hayes, J.L., Chick, W.L. 1996. Encapsulated cell technology. *Nat Biotechnol* 14, 1107-11.
- Nadol, J.B., Jr., Eddington, D.K. 1988. Treatment of sensorineural hearing loss by cochlear implantation. *Annu Rev Med* 39, 491-502.
- Noushi, F., Richardson, R.T., Hardman, J., Clark, G., O'Leary, S. 2005. Delivery of neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads. *Otol Neurotol* 26, 528-33.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L. 1996. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 280-6.
- Schneider, S., Feilen, P.J., Brunnenmeier, F., Minnemann, T., Zimmermann, H., Zimmermann, U., Weber, M.M. 2005. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes* 54, 687-93.

- Shepherd, R.K., Coco, A., Epp, S.B., Crook, J.M. 2005. Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J Comp Neurol* 486, 145-58.
- Skinner, S.J., Geaney, M.S., Lin, H., Muzina, M., Anal, A.K., Elliott, R.B., Tan, P.L. 2009. Encapsulated living choroid plexus cells: potential long-term treatments for central nervous system disease and trauma. *J Neural Eng* 6, 065001.
- Storz, H., Müller, K.J., Ehrhart, F., Gomez, I., Shirley, S.G., Gessner, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V.L., Forst, T., Weber, M.M., Zimmermann, H., Kulicke, W.M., Zimmermann, U. 2009. Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. *Carbohydr Res* 344, 985-95.
- Thorne, R.G., Frey, W.H., 2nd. 2001. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 40, 907-46.
- Tusi, S.K., Khalaj, L., Ashabi, G., Kiaei, M., Khodagholi, F. 2011. Alginate oligosaccharide protects against endoplasmic reticulum- and mitochondrial-mediated apoptotic cell death and oxidative stress. *Biomaterials* 32, 5438-58.
- Warnecke, A., Wissel, K., Hoffmann, A., Hofmann, N., Berkingali, N., Gro, G., Lenarz, T., Stover, T. 2007. The biological effects of cell-delivered brain-derived neurotrophic factor on cultured spiral ganglion cells. *Neuroreport* 18, 1683-6.
- Warnecke, A., Sasse, S., Wenzel, G.I., Hoffmann, A., Gross, G., Paasche, G., Scheper, V., Reich, U., Esser, K.H., Lenarz, T., Stover, T., Wissel, K. 2012. Stable release of BDNF from the fibroblast cell line NIH3T3 grown on silicone elastomers enhances survival of spiral ganglion cells in vitro and in vivo. *Hear Res* 289, 86-97.
- Wefstaedt, P., Scheper, V., Lenarz, T., Stover, T. 2005. Brain-derived neurotrophic factor/glia cell line-derived neurotrophic factor survival effects on auditory neurons are not limited by dexamethasone. *Neuroreport* 16, 2011-4.
- Wise, A.K., Fallon, J.B., Neil, A.J., Pettingill, L.N., Geaney, M.S., Skinner, S.J., Shepherd, R.K. 2011. Combining cell-based therapies and neural prostheses to promote neural survival. *Neurotherapeutics* 8, 774-87.
- Zimmermann, H., Ehrhart, F., Zimmermann, D., Müller, K., Katsen-Globa, A., Behringer, M., Feilen, P.J., Gessner, P., Zimmermann, G., Shirley, S.G., Weber, M.M., Metzke, J., Zimmermann, U. 2007. Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications. *Appl Phys A*, 89, 909-22
- Zimmermann, H., Shirley, S.G., Zimmermann, U. 2007. Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. *Curr Diab Rep* 7, 314-20.
- Zimmermann, H., Zimmermann, D., Reuss, R., Feilen, P.J., Manz, B., Katsen, A., Weber, M., Ihmig, F.R., Ehrhart, F., Gessner, P., Behringer, M., Steinbach, A., Wegner, L.H., Sukhorukov, V.L., Vasquez, J.A., Schneider, S., Weber, M.M., Volke, F., Wolf, R., Zimmermann, U. 2005. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* 16, 491-501.
- Zimmermann, U., Thurmer, F., Jork, A., Weber, M., Mimietz, S., Hillgartner, M., Brunnenmeier, F., Zimmermann, H., Westphal, I., Fuhr, G., Noth, U., Haase, A., Steinert, A., Hendrich, C. 2001. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 944, 199-215.

## 5. Publikation II

### *In-Vitro* and *In-Vivo* Evaluation of a Hydrogel Reservoir as a Continuous Drug Delivery System for Inner Ear Treatment

Mareike Hütten<sup>1,2,†</sup>, Anandhan Dhanasingh<sup>3,4,†</sup>, Roland Hessler<sup>3</sup>, Timo Stöver<sup>5</sup>, Karl-Heinz Esser<sup>2</sup>, Martin Möller<sup>4</sup>, Thomas Lenarz<sup>1</sup>, Claude Jolly<sup>3</sup>, Jürgen Groll<sup>4,6\*</sup>, Verena Scheper<sup>1,7,8</sup>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Hannover School of Medicine, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

<sup>2</sup> University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Department of Zoology, Bünteweg 17, 30559 Hannover, Germany

<sup>3</sup> MED-EL Innsbruck, Research & Development, Fürstenweg 77a, 6020 Innsbruck, Austria

<sup>4</sup> Interactive Materials Research – DWI e.V. and Institute of Technical and Macromolecular Chemistry, RWTH Aachen University, Forckenbeckstr. 50, 52056 Aachen, Germany

<sup>5</sup> J.W. Goethe University Hospital and Faculty of Medicine, Department of Otolaryngology, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main, Germany

<sup>6</sup> University of Würzburg, Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, Pleicherwall 2, 97070 Würzburg, Germany

<sup>7</sup> Institute of Audioneurotechnology, Hannover School of Medicine, Feodor-Lynen-Str. 35, D-30625, Hannover, Germany

† both authors contributed equally to this work

#### Corresponding Authors

[\*] Professor Dr. Jürgen Groll

Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg  
Pleicherwall 2, 97070 Würzburg (Germany)

Tel.: +49(0)931-201-73610; E-mail: [juergen.groll@fmz.uni-wuerzburg.de](mailto:juergen.groll@fmz.uni-wuerzburg.de)

[§] Dr. Verena Scheper

Department of Otolaryngology, Hannover School of Medicine (MHH)  
Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover (Germany)  
Tel.: +49(0)511-532-4369; E-mail: [scheper.verena@mh-hannover.de](mailto:scheper.verena@mh-hannover.de)

PLoS One. 2014 Aug 8;9(8):e104564. doi: 10.1371/journal.pone.0104564. eCollection 2014.

## 5.1 Abstract

Fibrous tissue growth and loss of residual hearing after cochlear implantation can be reduced by application of the glucocorticoid dexamethasone-21-phosphate-disodium-salt (DEX). To date, sustained delivery of this agent to the cochlea using a number of pharmaceutical technologies has not been entirely successful.

In this study we examine a novel way of continuous local drug application into the inner ear using a refillable hydrogel functionalized silicone reservoir. A PEG-based hydrogel made of reactive NCO-sP(EO-stat-PO) prepolymers was evaluated as a drug conveying and delivery system *in-vitro* and *in-vivo*. Encapsulating the free form hydrogel into a silicone tube with a small opening for the drug diffusion resulted in delayed drug release but unaffected diffusion of DEX through the gel compared to the free form hydrogel. Additionally, controlled DEX release over several weeks could be demonstrated using the hydrogel filled reservoir. Using a guinea-pig cochlear trauma model the reservoir delivery of DEX significantly protected residual hearing and reduced fibrosis. As well as being used as a device in its own right or in combination with cochlear implants, the hydrogel-filled reservoir represents a new drug delivery system that feasibly could be replenished with therapeutic agents to provide sustained treatment of the inner ear.

## 5.2 Literatur

- Abi-Hachem, R.N., Zine, A., Van De Water, T.R. 2010. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies. *Recent Pat CNS Drug Discov* 5, 147-63.
- Birman, C.S., Sanli, H., Gibson, W.P., Elliott, E.J. 2014. Impedance, neural response telemetry, and speech perception outcomes after reimplantation of cochlear implants in children. *Otol Neurotol* 35, 1385-93.
- Borenstein, J.T. 2011. Intracochlear drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 8, 1161-74.
- Braun, S., Ye, Q., Radeloff, A., Kiefer, J., Gstoettner, W., Tillein, J. 2011. Protection of inner ear function after cochlear implantation: compound action potential measurements after local application of glucocorticoids in the guinea pig cochlea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 73, 219-28.
- Burghard, A., Lenarz, T., Kral, A., Paasche, G. 2014. Insertion site and sealing technique affect residual hearing and tissue formation after cochlear implantation. *Hear Res* 312, 21-7.
- Chandrasekhar, S.S., Rubinstein, R.Y., Kwartler, J.A., Gatz, M., Connelly, P.E., Huang, E., Baredes, S. 2000. Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122, 521-8.
- Dalton, P.D., Hostert, C., Albrecht, K., Moeller, M., Groll, J. 2008. Structure and properties of urea-crosslinked star poly[(ethylene oxide)-ran-(propylene oxide)] hydrogels. *Macromol Biosci* 8, 923-31.
- Dhanasingh, A., Groll, J. 2012. Polysaccharide based covalently linked multi-membrane hydrogels. *Soft Matters*, Advance article.
- Dhanasingh, A., Salber, J., Möller, M., Groll, J. 2010. Tailored hyaluronic acid hydrogel through hydrophilic prepolymer cross-linkers. *Soft Matter*, 6, 618-629.
- el-Kafrawy, A.H., Dickey, D.M., Mitchell, D.F., Phillips, R.W. 1974. Pulp reaction to a polycarboxylate cement in monkeys. *J Dent Res* 53, 15-9.
- Eshraghi, A.A., Adil, E., He, J., Graves, R., Balkany, T.J., Van De Water, T.R. 2007. Local dexamethasone therapy conserves hearing in an animal model of electrode insertion trauma-induced hearing loss. *Otol Neurotol* 28, 842-9.
- Goetz, H., Beginn, U., Bartelink, C. F., Gruenbauer, H. J. M., Möller, M. 2002. Preparation of isophorone diisocyanate terminated star polyethers. *Macromol. Mater. Eng.*, 287, 223-230.
- Groll, J., Amirgoulova, E.V., Ameringer, T., Heyes, C.D., Rocker, C., Nienhaus, G.U., Moller, M. 2004. Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly(ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins. *J Am Chem Soc* 126, 4234-9.
- Hoffman, A.S. 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 3-12.
- Ito, M., Yagasaki, H. 2001. Bone substitute product and method of producing the same. United States Patent US 6,214,048 B1.

- James, D.P., Eastwood, H., Richardson, R.T., O'Leary, S.J. 2008. Effects of round window dexamethasone on residual hearing in a Guinea pig model of cochlear implantation. *Audiol Neurootol* 13, 86-96.
- Jolly, C., Garnham, C., Mirzadeh, H., Truy, E., Martini, A., Kiefer, J., Braun, S. 2010. Electrode features for hearing preservation and drug delivery strategies. *Adv Otorhinolaryngol* 67, 28-42.
- Kim, H.H., Addison, J., Suh, E., Trune, D.R., Richter, C.P. 2007. Otoprotective effects of dexamethasone in the management of pneumococcal meningitis: an animal study. *Laryngoscope* 117, 1209-15.
- Kim, P., Kim, D.H., Kim, B., Choi, S.K., Lee, S.H., Khademhosseini, A., Langer, R., Suh, K.Y. 2005. Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion. *Nanotechnology* 16, 2420-6.
- Lenarz, T. 1998. Cochlear implants: selection criteria and shifting borders. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 52, 183-99.
- Lervik, T. 1978. The effect of zinc phosphate and carboxylate cements on the healing of experimentally induced pulpitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 45, 123-30.
- Luttikhuisen, D.T., Harmsen, M.C., Van Luyn, M.J. 2006. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng* 12, 1955-70.
- Meltser, I., Canlon, B. 2011. Protecting the auditory system with glucocorticoids. *Hear Res* 281, 47-55.
- Merrill, E.W. 1993. Poly(ethylene oxide) star molecules: synthesis, characterization, and applications in medicine and biology. *J Biomater Sci Polym Ed* 5, 1-11.
- Messmer, U.K., Pereda-Fernandez, C., Manderscheid, M., Pfeilschifter, J. 2001. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol* 133, 467-76.
- Nadol, J.B., Jr., Hsu, W.C. 1991. Histopathologic correlation of spiral ganglion cell count and new bone formation in the cochlea following meningogenic labyrinthitis and deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100, 712-6.
- Nadol, J.B., Jr., Eddington, D.K. 2004. Histologic evaluation of the tissue seal and biologic response around cochlear implant electrodes in the human. *Otol Neurotol* 25, 257-62.
- O'Leary, S.J., Monksfield, P., Kel, G., Connolly, T., Souter, M.A., Chang, A., Marovic, P., O'Leary, J.S., Richardson, R., Eastwood, H. 2013. Relations between cochlear histopathology and hearing loss in experimental cochlear implantation. *Hear Res* 298, 27-35.
- Paasche, G., Bockel, F., Tasche, C., Lesinski-Schiedat, A., Lenarz, T. 2006. Changes of postoperative impedances in cochlear implant patients: the short-term effects of modified electrode surfaces and intracochlear corticosteroids. *Otol Neurotol* 27, 639-47.
- Peppas, N.A., Keys, K.B., Torres-Lugo, M., Lowman, A.M. 1999. Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *J Control Release* 62, 81-7.
- Ruben, R.J. 1967. Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol, Suppl* 220:1-44.
- Scheper, V., Paasche, G., Miller, J.M., Warnecke, A., Berkingali, N., Lenarz, T., Stover, T. 2009a. Effects of delayed treatment with combined GDNF and continuous electrical stimulation on spiral ganglion cell survival in deafened guinea pigs. *J Neurosci Res* 87, 1389-99.

- Scheper, V., Wolf, M., Scholl, M., Kadlecova, Z., Perrier, T., Klok, H.A., Saulnier, P., Lenarz, T., Stover, T. 2009b. Potential novel drug carriers for inner ear treatment: hyperbranched polylysine and lipid nanocapsules. *Nanomedicine (Lond)* 4, 623-35.
- Seltzer, S., Maggio, J., Wollard, R.R., Brough, S.O., Barnett, A. 1976. Tissue reactions to polycarboxylate cements. *J Endod* 2, 208-14.
- Takemura, K., Komeda, M., Yagi, M., Himeno, C., Izumikawa, M., Doi, T., Kuriyama, H., Miller, J.M., Yamashita, T. 2004. Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 196, 58-68.
- Tizard, I.R. 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*, Saunders.
- Vivero, R.J., Joseph, D.E., Angeli, S., He, J., Chen, S., Eshraghi, A.A., Balkany, T.J., Van de Water, T.R. 2008. Dexamethasone base conserves hearing from electrode trauma-induced hearing loss. *Laryngoscope* 118, 2028-35.
- WHO. 2013. <http://www.who.int/pbd/deafness/activities/WWHearing/en/index.html>, last access 13.Jan. 2013.

## 6. Diskussion

Fernziele der beiden Versuchsreihen sind die Neuroprotektion und Fibrosereduktion nach Einbringen eines CI in die Cochlea. Die Ansätze meiner Promotionsarbeit bestanden dabei einmal im Erhalt der SGZ *in vitro* durch eine zellvermittelte BDNF-Applikation. Zum Anderen wurde durch Anwendung eines hydrogelgestützten Applikationssystems zur *In-vivo*-Versorgung des Innenohrs mit DEX die Minderung von Entzündung, Fremdkörperreaktion und postoperativem Trauma erforscht.

### 6.1 Publikation I

BDNF ist ein neurotropher Faktor, der in verschiedenen Bereichen des Körpers zur Einwirkung auf neuronale Zellen gebildet wird. Er wird unter anderem auch von den Haarzellen des Innenohrs freigesetzt (Gillespie et al., 2005). SGZ wiederum besitzen den hoch affinen Rezeptor TrkB, welcher bei Kontakt mit BDNF dimerisiert und intrazellulär eine Phosphorylierung von Tyrosin und damit einen Abbruch der Apoptose induziert (Yu et al., 2013). Da die überlebensverlängernden Eigenschaften des BDNF bereits bekannt waren (Gillespie et al., 2005; Shepherd et al., 2005) und auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Alginat, ein unverzweigtes Polymer aus Braunalgen (Phaeophytae), in Hinblick auf BDNF-Freisetzung und Einkapselung von Zellen gute Resultate gezeigt hatte (Calafiore et al., 2006; Zimmermann et al., 2005), bot es sich folglich an, beides miteinander zu verknüpfen. So wurden lentiviral veränderte Fibroblasten in Alginat eingebettet und die daraus hervorgehende BDNF-Freisetzung überprüft.

Durch Proliferation entstandene Zellverbände der BDNF-produzierenden Fibroblasten waren eine Woche und auch 30 Tage nach Einsaat in der Matrix sichtbar. Die absolute Zahl der Zellen sank jedoch während des Versuchszeitraums von 4 Wochen signifikant ab. Der Zusammenhang zwischen dieser Abnahme der Zelldichte und der nichtsdestotrotz angestiegenen Konzentration des freigesetzten BDNF führt zu der Annahme, dass eine für die

BDNF-Produktion ausreichende Zellzahl in der UHV-Matrix innerhalb von nur 4 Wochen erreicht werden kann.

Eine massive Abnahme der Zelldichte von bis zu 90% zwischen Stunde 24 und Stunde 48 nach Einsaat ist vermutlich auf den Stress durch Passage und Einsaat sowie die Adaption der Zellen an die veränderten Milieubedingungen zurückzuführen. Nach 48 Stunden stieg die Zelldichte bis Tag 7 wieder an, was ein eindeutiges Anzeichen für die proliferationsfördernden Eigenschaften des Alginats darstellt. Eine erneute Zellreduktion bis zu Tag 30 des Versuchs könnte entweder durch eine Akkumulation der Zellstoffwechselprodukte innerhalb des Alginats oder durch ein Ungleichgewicht zwischen relativ hoher Zellzahl und einer möglicherweise dafür zu geringen Nährstoffversorgung in der Matrix, also einer Mangelernährung der Zellen, bedingt sein.

Da das Alginat eine wenn auch nachgiebige, so doch widerstandsfähige Matrix bildet, ist es zudem denkbar, dass die räumliche Beschränkung innerhalb der Matrix zu einer auf die Proliferation folgenden Abnahme der Zellzahl führte.

Die Gründe und Folgen der gesunkenen Zellzahlen werden in weiterführenden Studien im Detail beleuchtet werden müssen, da bisher abweichende Ergebnisse publiziert wurden (Heiligenstein et al., 2011).

Während der ersten 7 Tage nach Inkubation des UHV-Alginat-Fibroblasten-Verbundes verhielt sich die Konzentration des BDNF noch proportional zu den Resultaten der Zelldichte. Im ELISA zeigte sich, dass der über die Zeit ansteigende BDNF-Gehalt jedoch keine Kongruenz mehr mit der zugehörigen, abnehmenden Anzahl von NIH3T3/BDNF-Zellen aufwies. Dies mag zum Einen auf einer mangelhaften Nachweisbarkeit von zellproduziertem BDNF im ELISA basieren. Zersetzung von BDNF oder Bindung von BDNF an Komponenten des Zellkulturmediums könnten zum Anderen zu einer verminderten Detektion im ELISA geführt haben, ohne jedoch zwangsläufig die biologische Verfügbarkeit des daher nicht-detektierbaren BDNF einzuschränken. Eine weitere Erklärung mag in der Möglichkeit liegen, dass BDNF in der Alginatmatrix akkumulierte und nur mit einer gewissen Latenz ins freie Medium diffundierte. Dies könnte begründen, wieso an Tag 7 bei vergleichsweise hoher Zellzahl eine nur mäßige Konzentration von neurotrophem Faktor ermittelt werden konnte,

während an Tag 30, nach Abnahme der Zelldichte, die signifikant höchste Menge an BDNF im Medium gemessen wurde.

Der biologische Effekt von zellproduziertem und aus dem UHV-Alginat freigesetztem BDNF wurde an SGZ-Kulturen getestet, die mit dem Überstand von UHV-Alginat-NIH3T3/BDNF-Einheiten, purem UHV-Alginat, purem BDNF (50 ng/ ml) oder reinem Medium ohne Zusätze inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigen eine statistisch nicht zu unterscheidende Überlebensrate von SGZ, die mit dem Überstand von purem Alginat behandelt wurden, und denen, die purem BDNF in der optimalen Versorgungskonzentration von 50 ng/ ml BDNF ausgesetzt wurden. Die Überlebensrate von SGZ mit purem BDNF stimmte dabei mit den Ergebnissen früherer Studien in unserem Labor überein (Wefstaedt et al., 2005).

Es kann resümiert werden, dass die Behandlung von SGZ mit Alginat-Überstand ebenso effektiv ist wie die mit purem BDNF. Dieser zellprotektive Einfluss mag durch Freisetzung von Oligosacchariden aus dem Alginat in den Überstand bedingt sein. Deren neuroprotektive Eigenschaften wurden von Tusi et al. im Jahre 2011 bestätigt (Tusi et al., 2011), bedürfen allerdings weiterer Untersuchung, da Noushi und Mitarbeiter Calciumalginatsphären zwar für sicher, biodegradabel und als ein effektives Transportsystem für Neurotrophin-3 in die Cochlea befunden haben (Noushi et al., 2005), jedoch keine protektiven Eigenschaften des puren Alginats entdecken konnten.

Die signifikant höchste Überlebensrate wurde in der Probe mit Überstand von mit NIH3T3/BDNF-Zellen kultiviertem UHV-Alginat erreicht. Eine adäquate BDNF-Versorgung und SGZ-Schutz durch BDNF von mit Alginat beschichteten Implantaten wurden bereits durch Chikar et al. nachgewiesen (Chikar et al., 2012). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie, in der eine lange BDNF-Versorgung durch die Produktion endogenen BDNFs von in die Alginatmatrix eingelassenen Zellen gewährleistet ist, waren die Probenkörper von Chikar et al. entweder in BDNF beinhaltendes Alginat eingelegt worden oder mit BDNF vollgesogen. Beide dieser Methoden führten folglich zu einer temporär limitierten Freisetzung. Wise und Kollegen waren die ersten, die eine Verbesserung der Cochlea-Implantation durch eine zellbasierte Therapie im Tiermodell bewiesen. Sie benutzten Zellen des *Plexus choroideus*, die einen Cocktail aus neurotrophen Faktoren produzieren und sezernieren (Skinner et al., 2009), setzten sie in ein biokompatibles Alginat ein und implantierten dieses in ertaubte

Katzen, was die SGZ vor einer Degeneration nach der Ertaubung schützte (Wise et al., 2011). Wie auch in unserer Studie beobachteten sie die höchste SGZ-Dichte in Proben, die gleichzeitig mit Alginat und Choroidzellen behandelt wurden. Weiterführend zu ihren Versuchen beobachteten wir, dass die neuronale Erhaltung in der Gruppe mit UHV-Alginat plus NIH3T3/BDNF eher auf einem synergistischen als additiven Effekt von BDNF und UHV-Alginat beruht. Beide Behandlungsformen führten summiert zu einer Überlebensrate von etwa 36% (BDNF:  $14,83 \pm 1,16\%$ ; UHV-Alginat:  $21,09\% \pm 0,86\%$ ). Hingegen induzierte die Zugabe des Überstands von UHV-Alginat mit NIH3T3/BDNF-Zellen eine Überlebensrate von bis zu 72%. Es scheint, dass es sich hierbei um einen Effekt handelt, welcher nicht allein durch den neuroprotektiven Charakter von BDNF und die bereits erwähnten neuroprotektiven Eigenschaften der Alginatoligosaccharide zu erklären ist. Weitere Untersuchungen sind nötig um den synergistischen Effekt von UHV-Alginat und NIH3T3/BDNF-Fibroblasten auf neuronale Zellen des auditorischen Systems zu klären.

Auf die hier dargestellte Studie gestützt nehmen wir an, dass das UHV-Alginat eine passende Matrix für NIH3T3-Fibroblasten darstellt, da sie es den Zellen ermöglicht, zu proliferieren und BDNF in einer für die Innenohrbehandlung ausreichenden Menge zu produzieren. Um die lokale Verträglichkeit dieser Applikationsmethode zu gewährleisten, müssten *In-vivo*-Experimente durchgeführt werden. Obwohl die NIH3T3/BDNF-Fibroblasten in die UHV-Alginat-Matrix eingebettet sind und vorangegangene Studien keine Abstoßung von derart eingelagerten Zellen beschrieben (Schneider et al., 2005; Zimmermann et al., 2005), sollte eine Immunreaktion auf das xenogene Material in einem intakten biologischen System ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollte man sich vergegenwärtigen, dass allogene oder autologe Zellen eine adäquate Alternative zu der Zelllinie, die in diesem Versuch gewählt wurde, darstellen würden. Die Herstellung von autologen, neurotrophe Faktoren produzierenden Zellen wäre eine personalisierte Methode der Innenohrbehandlung, benötigt aber eine längere Vorbereitungsphase, ehe jeder Patient davon profitieren können wird. Weitere Untersuchungen bezüglich der Anwendbarkeit des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Systems sowie dessen Vergleich mit dem mittels allogener Zellen zu erzielenden Effekts sollten erfolgen, bevor eine abschließende Beurteilung dieser Zell-Material-Kombination für die Cochlea-Implantat-Therapie möglich ist.

## 6.2 Publikation II

Ziel der zweiten Studie war die Evaluation eines neuentwickelten Hydrogelreservoirs als *Drug-delivery*-System für die Anwendung am Innenohr *in vitro* und *in vivo*. Hydrogele aus reaktivem NCO-sP(EO-stat-PO) wurden ausgewählt, da diese Gele bereits etabliert und ihre Haupteigenschaften durch andere Arbeiten beschrieben sind (Dalton et al., 2008). Die Herstellung des Hydrogels erfolgt durch einfache Lösung in Wasser mit einem Massenanteil von 10 bis 20 Gew.-%. Das so entstandene Gel ist nicht-degradabel, vermag durch Quellen Wasser bis zu einem Gehalt von über 90 Gew.-% aufzunehmen und gestattet hydrophilen Molekülen geringen Molekulargewichts die Diffusion in angrenzende Flüssigkeiten. In der vorliegenden Studie wurde dieses Hydrogel in einen Silikonschlauch eingebracht um seine Funktion als Diffusionsbarriere *in vitro* und *in vivo* zu testen. In den *In-vivo*-Versuchen wurde das Hydrogel als Applikationssystem für medizinische Zwecke am Beispiel der Innenohrbehandlung von Meerschweinchen getestet und der Einfluss einer kontinuierlichen Medikamentenversorgung mit DEX via Hörtest (AABR, acoustically-evoked auditory brainstem response) und Bindegewebsquantifizierung innerhalb der *Scala tympani* nachverfolgt. Als Negativgruppen dienten ein ebenfalls implantiertes Hydrogelreservoir, welches nicht mit DEX, sondern mit PBS (phosphate buffered saline) befüllt wurde, sowie eine Trauma-Gruppe, in der das Reservoir ins Innenohr inseriert und unmittelbar anschließend wieder explantiert wurde.

DEX wurde für diese Studie gewählt, da seine antiinflammatorischen und haarzellprotektiven Eigenschaften hinreichend bekannt und beschrieben sind (Abi-Hachem et al., 2010; Eshraghi et al., 2007; James et al., 2008; Kim et al., 2007; Takemura et al., 2004). Potenziell unterstützende Effekte von Glukokortikoiden basieren auf ihrer Fähigkeit, pro- und antiinflammatorische Stoffe in ihrer Transkription zu hemmen bzw. zu fördern, und so Leukozytenmigration und Apoptose zu verhindern (Messmer et al., 2001). Insbesondere DEX unterdrückt apoptotische Prozesse als Reaktion auf TNF- $\alpha$ . Studien von Messmer und Kollegen demonstrierten, dass dieser Effekt bis zu 12 Stunden nach Applikation von TNF- $\alpha$  anhält. DEX verlangsamt den Abbau von Inhibitoren von proapoptischen Proteinen (Messmer et al., 2001) und vermindert zusätzlich die Adhärenz von Leukozyten an das vaskuläre Endothel (Tizard, 2004). Synthetische Glukokortikoide sind ebenso in der Lage, die

Durchlässigkeit und Dilatation von Blutgefäßen zu reduzieren. Folglich wirken Glukokortikoide Ödemen und Fibrinanlagerung entgegen, verringern kapilläres Wachstum sowie Fibroblastenproliferation und unterstützen den Abbau von Kollagen (Tizard, 2004).

Gerade diese Effekte spielen eine elementare Rolle in der durchaus sinnvollen Neutralisation von Fremdkörpern oder bakteriellem Befall, so dass der Einsatz von DEX wohlüberlegt sein sollte, jedoch bei Cochlea-Implantationen nichtsdestotrotz einen wertvollen Schutz für das Hörvermögen bieten kann (Chandrasekhar et al., 2000; Jolly et al., 2010; Meltser et al., 2011).

Die Ausdehnung der Fibrose wurde in der vorliegenden Arbeit mittels visueller Beurteilung anhand eines Punktesystems wie auch mit direkten Messungen ermittelt, da davon ausgegangen wurde, dass beide Methoden leicht abweichende Ergebnisse erzielen würden. Wie erwartet waren die Resultate nicht identisch, ergänzten einander jedoch: Während die Vermessung des Bindegewebsanteils von nur 3 Gewebsebenen pro *Scala tympani* direkt vor, im und nach dem Modiolus für eine objektive Evaluation im Zentrum der Cochlea sorgte, war mit der subjektiven Vergabe von Punkten im Bereich von 0 bis 3 über alle Schleifebenen hinweg ein quantitativer Überblick über die Bindegewebsbildung auf der gesamten Länge der Hörschnecke möglich. Da dieses Punktesystem zwangsläufig einer gewissen Subjektivität unterlag, wurden alle Schleifebenen von einer einzigen Person bewertet. Auf diese Weise konnten zusätzliche interindividuelle Bewertungsschwankungen ausgeschlossen werden.

Beide Evaluationsmethoden lieferten das Ergebnis, dass die Cochleae aus der Trauma-Gruppe statistisch signifikant die höchste Fibrose aufwiesen, die mit Reservoir und PBS versorgten Cochleae eine mittlere Fibrosierung und die Cochleae aus der DEX-Reservoir-Gruppe statistisch signifikant die geringste Bindegewebszubildung besaßen. Hierbei fielen die p-Werte bei gleichen statistischen Verfahren zwischen den beiden Beurteilungsmethoden jeweils leicht unterschiedlich aus. Vermutlich können diese und auch alle anderen Abweichungen der p-Werte von objektiver Messung und subjektiver Bewertung auf die Unterschiede zwischen modiolusnaher und modiolusferner Betrachtung zurückgeführt werden. Mit nur 3 Bildern pro *Scala* lässt sich keine Information über die gesamte Cochlea gewinnen. Nichtsdestotrotz konnte das hier angewandte Verfahren dazu genutzt werden, die Validität des subjektiveren Punktesystems mit objektiven Werten zu untermauern.

Nach dem operativen Eingriff wurde an Tag 3 in allen Gruppen ein Hörverlust festgestellt, der über den gesamten Versuchszeitraum unverändert blieb. Der anfängliche Hörverlust mag durch die Manipulation während der Operation wie auch durch die physikalische Präsenz des Implantats selbst verursacht worden sein, wobei die Anwesenheit eines Implantats Veränderungen in der Endolymphe, eine Einschränkung der Bewegungsmöglichkeit der Basilarmembran und/ oder eine Entzündungsreaktion bewirkt haben könnte. Zusätzlich könnte eine mechanische Irritation der Haarzellen eine Ursache für den Hörverlust sein, wobei dies nur in der basalen Region der Cochlea von Relevanz sein könnte, da nur hier das Implantat platziert wurde. In diesem Fall wäre, entsprechend der vorhandenen Tonotopie, nur das Hören bei hohen Frequenzen betroffen. Da es jedoch keine Unterschiede zwischen dem Hörverlust bei hohen und tiefen Frequenzen gab, erscheint diese Deutung als recht unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu Braun und Kollegen, die nach DEX-Applikation einen Schutz des Hörvermögens ohne Fibrosereduktion fanden (Braun et al., 2011), beobachteten wir eine Korrelation von Hörvermögen und Bindegewebswachstum, wie sie auch von O'Leary beschrieben ist (O'Leary et al., 2013). Je mehr Bindegewebe in einer Cochlea enthalten war, desto schlechter war nach diesen Autoren auch das verbliebene Restgehör. Beide Parameter hängen von der Stärke der Entzündungsreaktion ab. Möglicherweise beeinflusste in unseren Versuchen die bindegewebige Füllung der *Scala tympani* auch die transversale Wanderwelle, so dass, vor allem im apikalen Bereich der Cochlea, weniger Haarzellen erreicht werden konnten. Vielleicht schränkte das entstandene Bindegewebe auch die Ernährung der sensorischen Zellen ein. Dies würde erklären, weswegen das Hörvermögen bei tiefen wie auch bei hohen Frequenzen gleichermaßen abnahm, obwohl die eigentliche Manipulation und damit der Kern der Entzündung in den basalen Windungen der Cochlea lag.

Alle Tiere der Trauma-Gruppe zeigten im Vergleich zu den Tieren aller anderen Gruppen einen signifikant höheren Hörverlust und eine stärkere Fibrose. Es ist anzunehmen, dass die zweifache Bewegung des Silikonreservoirs innerhalb der Cochlea - also zuerst die Insertion des Präparates und unmittelbar darauf dessen Entnahme - die Ursache hierfür darstellt. Im Gegensatz dazu fand in beiden anderen Gruppen lediglich die Insertion, also nur eine mechanische Reizung, statt.

Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Medikamentenapplikation durch Systeme, die anschließend wieder entfernt werden müssen, stärkere traumatische Veränderungen innerhalb des Innenohres auftreten könnten. Es wäre demnach zu empfehlen, Applikationssysteme wie das hier vorgestellte Hydrogelreservoir beim Einsatz im Innenohr an das CI zu koppeln und so einen Verbleib in der Cochlea zu ermöglichen.

Zusätzlich zu der mechanischen Traumatisierung könnte die Anzahl immigrierter Leukozyten verantwortlich für die starke Fibrosierung in Cochleae der Trauma-Gruppe sein. Zwar wurde nach Entnahme des Hydrogelreservoirs die Cochleostomieöffnung sofort mit Carboxylatzement verschlossen, jedoch mag der Zement keine perfekte Versiegelung der Blutgefäße in der notwendigerweise beim Eingriff beschädigten *Stria vascularis* erzielt haben. Dagegen sorgten bei den Gruppen, in denen das Reservoir im Innenohr verblieb, die passgenau eingesetzten Reservoirs (Reservoirdurchmesser: 640 µm; Größe des für die Cochleostomie genutzten Bohrers: 600 µm) für entsprechenden Druck auf die rupturierten Blutgefäße, so dass hier vermutlich weniger starke Blutungen auftraten und weniger immunologisch aktive Zellen in das Innenohr eingespült wurden.

Luttikhuizen und Kollegen veröffentlichten im Jahr 2006 eine Arbeit über Inflammationsprozesse, die nicht nur durch Leukozyten wie Makrophagen, sondern auch durch weitere im Blutkreislauf zirkulierende Komponenten wie Fibrinogen, das Komplementsystem, Antikörper und verschiedene Entzündungsfaktoren beeinflusst werden (Luttikhuizen et al., 2006). Leukozyten werden durch chemotaktische Faktoren angezogen, die von verletztem Gewebe oder von durch den Fremdkörper alarmierten Zellen ausgeschüttet werden (Nadol et al., 1991). Obwohl die für Implantate verwendeten Stoffe biologisch inert sind, lösen sie doch eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe aus. Dies geschieht durch Anbindung endogener Proteine an die Oberfläche des Implantats und eine nachfolgende Reaktion des nicht-spezifischen Immunsystems. Es folgt eine Leukozyteninvasion und Fibroblastenmigration mit Bindegewebsbildung um das Fremdmaterial herum, was verbliebenes gesundes Gewebe vor dem Einfluss des Fremdkörpers schützen soll. Dieser Schritt konnte in der vorliegenden Arbeit in vielen Präparaten mit implantierten Reservoirs eindeutig beobachtet werden.

Angiogenese, ein weiteres Kardinalzeichen für Inflammation, wurde häufig in den Cochleae der Trauma-Gruppe und teilweise in den Präparaten der Reservoirgruppe mit PBS

gefunden. In einigen Präparaten der Trauma-Gruppe wurde sogar eine auf die Angiogenese folgende Osteogenese nachgewiesen. Angiogenese wird durch Blutkoagulation und Hypoxie initiiert und von lokal ausgeschütteten Faktoren wie Histamin und Fibrinfragment E vorangetrieben. Schlussendlich werden durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren, welche in erster Linie von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, Blutgefäße neu gebildet (Luttikhuisen et al., 2006). Alle an der Vaskularisierung beteiligten Komponenten entspringen dem Blutstrom, so dass auch hier wieder der unterschiedliche Ausfluss von Blut aus der *Stria vascularis* in die Cochlea im Gruppenvergleich berücksichtigt werden muss.

Es gibt zudem Berichte, die von einer Gewebsreizung durch Zement ausgehen (Burghard et al., 2014; Seltzer et al., 1976). Dies würde ebenfalls eine vermehrte Irritation der Cochleae in den Tieren der Trauma-Gruppe unterstreichen, da hier die von Zement ausgefüllte Fläche am größten ist. Jedoch ist im Bereich der Otologie trotz verbreiteter Nutzung für den hier verwendeten Zement bislang kein entsprechend schädlicher Einfluss bekannt (Scheper et al., 2009; Vivero et al., 2008). Im Gegenteil, es existieren sogar Befunde, dass Carboxylatzement keine gewebsirritierende Wirkung hat (el-Kafrawy et al., 1974; Lervik, 1978).

Weitere in Bezug auf die Entzündungsreaktion zu beachtende Faktoren sind Durchmesser und Flexibilität der als Reservoir verwendeten Materialien. Frühere Berichte von Jolly und Kollegen (Jolly et al., 2010) zeigten, dass das durch die Elektrode ausgelöste Trauma von der Größe und Biegsamkeit des Elektrodenkörpers abhängt und dass die Reduktion des traumatischen Einflusses durch die Verwendung biegsamer, anpassungsfähiger Materialien gefördert wird, die den Windungen der Cochlea leicht folgen. Entsprechend sollten sich auch Silikonreservoir verhalten, welche laut Jolly (Jolly et al., 2010) wenig Potential für eine Reizung des Gewebes innerhalb der Cochlea besitzen. Letzteres hängt natürlich stark von der Zusammensetzung des Materials ab. Die chirurgische Implantation und Fixation der Reservoir erklärt die Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen der Reservoir mit PBS bzw. mit DEX. Demzufolge sind der signifikant größere Hörverlust, die stärkere Fibrose über die gesamte Länge der Cochlea und die Anzeichen einer Angiogenese in der Reservoir + PBS-Gruppe im Vergleich zur Reservoir + DEX-Gruppe als Beweis für eine Freisetzung und Wirkung des DEX aus dem Hydrogelreservoir anzusehen



## 7. Zusammenfassung

### **Mareike Hütten (2014): „Untersuchungen zur Neuroprotektion und Fibrosereduktion bei Cochlea-Implantat-Anwendung“**

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Optimierung von Cochlea-Implanteten (CIs) auf Basis zweier Ansatzpunkte: Spiralganglienzellerhaltung mittels zellbasierter Therapie mit brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Reduktion der periimplantären Fibrose durch den Einsatz eines neuartigen Medikamenten-Reservoirs. Hierfür wurden BDNF im Zellversuch an Spiralganglienzellen (SGZ) und ein mit Dexamethason (DEX) befülltes Hydrogel in *In-vivo*-Versuchen am Innenohr von Meerschweinchen getestet.

In den entsprechenden Versuchen wurden BDNF-produzierende NIH3T3/BDNF-Fibroblasten in ein Ultra-high-viscosity-Alginat (UHV-Alginat) eingebettet. In regelmäßigen Intervallen wurde nach Anfertigung von Kryostatschnitten das Wachstumverhalten jener Fibroblasten mikroskopisch untersucht. Zu jedem Kontrollzeitpunkt waren die Fibroblasten homogen im Alginat verteilt. Nach 24 bzw. 48 Stunden waren im Alginat ausschließlich einzeln liegende Zellen sowie Zellansammlungen von bis zu 5 Zellen zu finden, nach 7 bis 30 Tagen waren dagegen, trotz leicht gesunkener Zellzahl, vor allem große Zellverbände vorhanden.

Die während des Versuchszeitraums freigesetzten Mengen an BDNF wurden durch ELISAs ermittelt. Nach initialer Abnahme des Wertes stieg ab Tag 2 die BDNF-Konzentration bis Tag 30 kontinuierlich und mit einem p-Wert von  $<0,01$  im Vergleich zum 48-Stunden-Wert signifikant an.

Gleichzeitig wurde auch der biologische Effekt des gebildeten BDNF getestet, indem eine primäre Spiralganglienzellkultur mit dem Überstand der UHV-Alginat-NIH3T3/BDNF-Kultur inkubiert und die Zellzahl bestimmt wurde. Als Negativkontrollen dienten zum Einen SGZ mit Zusatz von UHV-Alginat-Überstand ohne Zellbesatz, zum Anderen SGZ in reinem Medium ohne Additiva. Als Positivkontrolle wurde eine Spiralganglienzellkultur hinzugezogen, die mit 50 ng BDNF/ ml beimpft wurde.

Die Überlebensrate von SGZ, die mit 50 ng/ml BDNF oder dem Überstand von UHV-Alginat ohne Fibroblasten versehen worden waren, lag signifikant höher als die Überlebensrate der Zellen der Negativkontrolle mit reinem Nährmedium. Die Zellkultur, die mit dem Überstand von 7 Tage lang inkubiertem UHV-Alginat-NIH3T3/BDNF behandelt worden war, erreichte sogar eine Überlebensrate, die höher war als die Summe der Raten der mit dem Überstand puren Alginats inkubierten SGZ und der mit 50 ng/ml BDNF behandelten Zellen. Damit erzielte sie eine signifikant höhere neuronale Zellprotektion als alle anderen Gruppen ( $p < 0,001$ ).

Es kann geschlussfolgert werden, dass der Verbund aus UHV-Alginat und NIH3T3/BDNF-Fibroblasten allen Anforderungen gerecht wurde: Über den gesamten Versuchszeitraum von 30 Tagen waren Zellen in der Matrix nachweisbar, was für Proliferation und Lebenserhaltung der Fibroblasten innerhalb des Alginats spricht. Bildung und Freisetzung von BDNF konnten in der Konzentrationsmessung mittels ELISA ebenfalls nachgewiesen werden. Bei der Inkubation der SGZ mit Überstand von mit Fibroblasten beimpften Alginat stellte sich sogar ein synergistischer neuroprotektiver Effekt heraus.

Weitere Untersuchungen sollten sich der zellbasierten Therapie mittels UHV-Alginat in Verbindung mit NIH3T3-Zellen widmen. Dabei sollten Techniken entwickelt werden, mit denen eine präzise, schnelle und sterile Ummantelung von CIs unter Schutz der Fibroblasten geschehen kann. Ferner sollte der Unterschied zwischen Laborbedingungen und Operationssaal bedacht und nachfolgend eine mögliche Erhöhung der Impedanzen berücksichtigt werden.

In den Versuchen, die sich mit der DEX-Applikation aus Hydrogelreservoirien befassen, sollte die Anwendbarkeit des NCO-sP(EO-stat-PO)-Hydrogels zur Freisetzung des DEX über mehrere Wochen getestet werden. Normalhörenden Dunkin-Hartley-Meerschweinchen wurden entweder Hydrogelreservoirie mit DEX oder Hydrogelreservoirie mit PBS implantiert oder aber Reservoirie unmittelbar nach der Einführung ins Innenohr wieder entfernt, so dass hier lediglich der traumatische Einfluss der Manipulation zu bewerten war.

Hörtests und die Mikroskopie von in Epoxidharz eingebetteten und geschliffenen Gewebspräparaten zeigten einen signifikant geringeren Hörverlust und eine weniger stark

ausgeprägte Fibrose der mit Hydrogelreservoir + DEX behandelten Cochleae im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Hingegen wiesen die Cochleae der Trauma-Gruppe bedenkliche funktionale und morphologische Veränderungen auf. Es muss davon ausgegangen werden, dass die zusätzliche Manipulation innerhalb der Cochlea einen schädlicheren Einfluss besitzt als das in der *Scala tympani* fixierte und damit als Fremdkörper wirkende Hydrogelreservoir. Die Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass das NCO-sP(EO-stat-PO)-Hydrogelreservoir als vielversprechende Langzeitapplikationshilfe für wasserlösliche Stoffe in therapeutisch wirksamen Konzentrationen im Bereich des Innenohrs einsetzbar ist. Möglicherweise könnte das Hydrogel in Kombination mit CIs auch als nachbefüllbare Version zum Einsatz kommen. Auf diese Weise könnte der ohnehin unausweichliche chirurgische Eingriff während der CI-Implantation dazu genutzt werden, das Hydrogel ins Innenohr einzuführen. Noch während der Operation könnte über die Art der Befüllung entschieden und postoperativ durch Nachfüllung eine andauernde Medikation durchgeführt werden.



## 8. Summary

### **Mareike Hütten (2014): „Studies on neuroprotection and fibrosis reduction in cochlear-implant application“**

Aim of the dissertation at hand was the optimization of cochlear-implant (CI) usage in terms of two approaches: spiral-ganglion-cell (SGC) sustainment due to cell-based brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) therapy and reduction of periimplantational fibrosis via a novel drug-delivery reservoir. Therefore, BDNF was tested in *in-vitro* experiments with SGCs and a hydrogel filled with dexamethasone (DEX) was tested *in vivo* in the inner ears of guinea pigs.

In BDNF-related experiments, BDNF-producing NIH3T3 fibroblasts were embedded into an ultra-high-viscosity alginate (UHV-alginate). Their proliferational behaviour was controlled via microscopical evaluation of cryostat slices in regular time intervals. During the entire experiment, the fibroblasts were distributed homogenously inside the alginate. 24 hours, respectively 48 hours after embedding, only solitary cells or cell accumulations of up to 5 cells were found in the alginate. Despite decreasing total cell number, from day 7 to day 30, fibroblasts had built large clusters.

The amount of released BDNF was detected via ELISA. After initial reduction, the BDNF concentration increased continuously until day 30 with a p-value of <0.01 when compared to the BDNF concentration on day 2. The biological effect of BDNF produced from UHV-alginate-NIH3T3-fibroblasts was evaluated by incubating a primary SGC culture with the supernatant of the cell culture and monitoring the cell number. SGCs with the supernatant of UHV-alginate without fibroblasts and SGCs in pure medium without additives served as negative controls. A positive control was built by a SGC culture inoculated with 50 ng/ml BDNF.

Survival of SGCs incubated with 50 ng/ml BDNF or the supernatant of UHV-alginate without fibroblasts was significantly higher than cell survival of SGCs of the negative control with pure medium. The cell culture, which was treated with the supernatant of UHV-alginate-NIH3T3/BDNF incubated for 7 days, reached a survival rate higher than the sum of survival

rates of SGCs incubated with supernatant of alginate without fibroblasts and of cells treated with 50 ng/ml BDNF. Thus, it attained a significantly better neuronal protection than all other groups ( $p < 0.001$ )

In summary, the combination of UHV-alginate and NIH3T3-fibroblasts satisfied all requirements: during the whole experimental time of 30 days, cells were detectable in the alginate matrix, which confirms survival and even proliferation within the alginate. Production and release of BDNF was also verified and concerning the incubation of SGCs with the supernatant of alginate with fibroblasts an even synergistic effect emerged.

Further steps should attend to establish a cell-based therapy using UHV-alginate in combination with NIH3T3-cells. Further, techniques should be invented to allow a precise, fast and sterile coating of CIs while preserving the NIH3T3 protection. Distinctions between laboratory conditions and operating room and consequently a possible increase of impedances should be considered.

In the study concerning the DEX application through hydrogel reservoirs, the applicability of NCO-sP(EOstat-PO) hydrogel for sustained DEX release over several weeks was tested. Using normal hearing Dunkin-Hartley guinea pigs, either hydrogel reservoirs with DEX or hydrogel reservoirs with PBS were implanted or the reservoir was extracted immediately after insertion in order to assess the traumatic impact of manipulation.

Audiometry and microscopy of tissue specimens showed significantly reduced hearing loss and less distinct fibrosis of cochleae treated with hydrogel reservoir + DEX in comparison to both control groups. In contrast, considerable functional and morphological changes were detected in the trauma group. It must be assumed that the additional movement inside the cochlea is even more destructive than the hydrogel reservoir, which remained fixated inside the *Scala tympani* and thus functioned as a foreign body.

The results suggest that the NCO-sP(EO-stat-PO) hydrogel is a promising long-term drug-delivery device to apply water-soluble drugs in therapeutically relevant doses to the inner ear. Potentially, the hydrogel could be combined with CIs in terms of a rechargeable alternative of a drug-delivery device. With this method, the inevitable surgery for CI implantation could be used to insert the hydrogel into the inner ear. The kind of charging could be decided on during surgery and a post-operative long-term medication could be realised.

## 9. Literaturverzeichnis

- Abi-Hachem, R.N., Zine, A., Van De Water, T.R. 2010. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies. *Recent Pat CNS Drug Discov* 5, 147-63.
- Braun, T., Dochtermann, S., Krause, E., Schmidt, M., Schorn, K., Hempel, J.M. 2011. Correlation of pure tone thresholds and hearing loss for numbers. Comparison of three calculation variations for plausibility checking in expertise. *HNO* 59, 908-14.
- Burghard, A., Lenarz, T., Kral, A., Paasche, G. 2014. Insertion site and sealing technique affect residual hearing and tissue formation after cochlear implantation. *Hear Res* 312, 21-7.
- Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Lemmi, A., Montanucci, M.P., Calabrese, G., Racanicchi, L., Mancuso, F., Brunetti, P. 2006. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 29, 137-8.
- Chandrasekhar, S.S., Rubinstein, R.Y., Kwartler, J.A., Gatz, M., Connelly, P.E., Huang, E., Baredes, S. 2000. Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: comparison of route of administration and use of facilitating agents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122, 521-8.
- Chikar, J.A., Hendricks, J.L., Richardson-Burns, S.M., Raphael, Y., Pflingst, B.E., Martin, D.C. 2012. The use of a dual PEDOT and RGD-functionalized alginate hydrogel coating to provide sustained drug delivery and improved cochlear implant function. *Biomaterials* 33, 1982-90.
- Cochlear.com. 2013. <http://www.cochlear.com/corporate/first-hybrid-recipient>.
- Dalton, P.D., Hostert, C., Albrecht, K., Moeller, M., Groll, J. 2008. Structure and properties of urea-crosslinked star poly[(ethylene oxide)-ran-(propylene oxide)] hydrogels. *Macromol Biosci* 8, 923-31.
- Eshraghi, A.A., Adil, E., He, J., Graves, R., Balkany, T.J., Van De Water, T.R. 2007. Local dexamethasone therapy conserves hearing in an animal model of electrode insertion trauma-induced hearing loss. *Otol Neurotol* 28, 842-9.
- Gillespie, L.N., Shepherd, R.K. 2005. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *Eur J Neurosci* 22, 2123-33.
- Heiligenstein, S., Cucchiari, M., Laschke, M.W., Bohle, R.M., Kohn, D., Menger, M.D., Madry, H. 2011. Evaluation of nonbiomedical and biomedical grade alginates for the transplantation of genetically modified articular chondrocytes to cartilage defects in a large animal model in vivo. *J Gene Med* 13, 230-42.
- James, D.P., Eastwood, H., Richardson, R.T., O'Leary, S.J. 2008. Effects of round window dexamethasone on residual hearing in a Guinea pig model of cochlear implantation. *Audiol Neurootol* 13, 86-96.
- Jolly, C., Garnham, C., Mirzadeh, H., Truy, E., Martini, A., Kiefer, J., Braun, S. 2010. Electrode features for hearing preservation and drug delivery strategies. *Adv Otorhinolaryngol* 67, 28-42.
- Kim, H.H., Addison, J., Suh, E., Trune, D.R., Richter, C.P. 2007. Otoprotective effects of dexamethasone in the management of pneumococcal meningitis: an animal study. *Laryngoscope* 117, 1209-15.
- Luttikhuisen, D.T., Harmsen, M.C., Van Luyn, M.J. 2006. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng* 12, 1955-70.
- Meltser, I., Canlon, B. 2011. Protecting the auditory system with glucocorticoids. *Hear Res* 281, 47-55.

- Messmer, U.K., Pereda-Fernandez, C., Manderscheid, M., Pfeilschifter, J. 2001. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol* 133, 467-76.
- Nadol, J.B., Jr., Hsu, W.C. 1991. Histopathologic correlation of spiral ganglion cell count and new bone formation in the cochlea following meningogenic labyrinthitis and deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100, 712-6.
- Nadol, J.B., Jr., Eddington, D.K. 2004. Histologic evaluation of the tissue seal and biologic response around cochlear implant electrodes in the human. *Otol Neurotol* 25, 257-62.
- NIDCD. 2014. National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, Cochlear Implants. <http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/pages/coch.aspx#d>.
- Noushi, F., Richardson, R.T., Hardman, J., Clark, G., O'Leary, S. 2005. Delivery of neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads. *Otol Neurotol* 26, 528-33.
- O'Leary, S.J., Monksfield, P., Kel, G., Connolly, T., Souter, M.A., Chang, A., Marovic, P., O'Leary, J.S., Richardson, R., Eastwood, H. 2013. Relations between cochlear histopathology and hearing loss in experimental cochlear implantation. *Hear Res* 298, 27-35.
- Scheper, V., Wolf, M., Scholl, M., Kadlecova, Z., Perrier, T., Klok, H.A., Saulnier, P., Lenarz, T., Stover, T. 2009. Potential novel drug carriers for inner ear treatment: hyperbranched polylysine and lipid nanocapsules. *Nanomedicine (Lond)* 4, 623-35.
- Schneider, S., Feilen, P.J., Brunnenmeier, F., Minnemann, T., Zimmermann, H., Zimmermann, U., Weber, M.M. 2005. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes* 54, 687-93.
- Seltzer, S., Maggio, J., Wollard, R.R., Brough, S.O., Barnett, A. 1976. Tissue reactions to polycarboxylate cements. *J Endod* 2, 208-14.
- Shepherd, R.K., Coco, A., Epp, S.B., Crook, J.M. 2005. Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J Comp Neurol* 486, 145-58.
- Skinner, S.J., Geaney, M.S., Lin, H., Muzina, M., Anal, A.K., Elliott, R.B., Tan, P.L. 2009. Encapsulated living choroid plexus cells: potential long-term treatments for central nervous system disease and trauma. *J Neural Eng* 6, 065001.
- Takemura, K., Komeda, M., Yagi, M., Himeno, C., Izumikawa, M., Doi, T., Kuriyama, H., Miller, J.M., Yamashita, T. 2004. Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 196, 58-68.
- Tizard, I.R. 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia.
- Tusi, S.K., Khalaj, L., Ashabi, G., Kiaei, M., Khodagholi, F. 2011. Alginate oligosaccharide protects against endoplasmic reticulum- and mitochondrial-mediated apoptotic cell death and oxidative stress. *Biomaterials* 32, 5438-58.
- Vivero, R.J., Joseph, D.E., Angeli, S., He, J., Chen, S., Eshraghi, A.A., Balkany, T.J., Van de Water, T.R. 2008. Dexamethasone base conserves hearing from electrode trauma-induced hearing loss. *Laryngoscope* 118, 2028-35.
- Warnecke, A., Wissel, K., Hoffmann, A., Hofmann, N., Berkingali, N., Gro, G., Lenarz, T., Stover, T. 2007. The biological effects of cell-delivered brain-derived neurotrophic factor on cultured spiral ganglion cells. *Neuroreport* 18, 1683-6.
- Warnecke, A., Sasse, S., Wenzel, G.I., Hoffmann, A., Gross, G., Paasche, G., Scheper, V., Reich, U., Esser, K.H., Lenarz, T., Stover, T., Wissel, K. 2012. Stable release of BDNF from the fibroblast cell line NIH3T3 grown on silicone elastomers enhances survival of spiral ganglion cells in vitro and in vivo. *Hear Res* 289, 86-97.
- Wefstaedt, P., Scheper, V., Lenarz, T., Stover, T. 2005. Brain-derived neurotrophic factor/glia cell line-derived neurotrophic factor survival effects on auditory neurons are not limited by dexamethasone. *Neuroreport* 16, 2011-4.

- Wise, A.K., Fallon, J.B., Neil, A.J., Pettingill, L.N., Geaney, M.S., Skinner, S.J., Shepherd, R.K. 2011. Combining cell-based therapies and neural prostheses to promote neural survival. *Neurotherapeutics* 8, 774-87.
- Yu, Q., Chang, Q., Liu, X., Wang, Y., Li, H., Gong, S., Ye, K., Lin, X. 2013. Protection of spiral ganglion neurons from degeneration using small-molecule TrkB receptor agonists. *J Neurosci* 33, 13042-52.
- Zimmermann, H., Wahlisch, F., Baier, C., Westhoff, M., Reuss, R., Zimmermann, D., Behringer, M., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Giese, C., Marx, U., Sukhorukov, V.L., Vasquez, J.A., Jakob, P., Shirley, S.G., Zimmermann, U. 2007. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 28, 1327-45.
- Zimmermann, H., Zimmermann, D., Reuss, R., Feilen, P.J., Manz, B., Katsen, A., Weber, M., Ihmig, F.R., Ehrhart, F., Gessner, P., Behringer, M., Steinbach, A., Wegner, L.H., Sukhorukov, V.L., Vasquez, J.A., Schneider, S., Weber, M.M., Volke, F., Wolf, R., Zimmermann, U. 2005. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* 16, 491-501.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Doktorvätern **Prof. Dr. Timo Stöver** und **PD Dr. Karl-Heinz Esser** gilt mein ganz besonderer Dank für ihren unkomplizierten, kollegialen Umgang, ihre konstruktive Kritik und ihren Beistand bei Vorträgen und beim Verfassen dieser Arbeit selbst.

Bei **Dr. Verena Scheper** möchte ich mich für all die Jahre bedanken, in denen sie mich beraten und oftmals auf die rechte Fährte zurückgeführt hat, für ihre unzähligen Vorschläge, Korrekturen, Diskussionen und aufbauenden Worte. Ihre intelligente, fürsorgliche Art sucht ihresgleichen: Danke dafür!

Ebenso kann ich **Dr. Henning Voigt** nicht unerwähnt lassen, der all meine Laborarbeiten begleitet, sorgsam überwacht, verbessert und mich in Krisenzeiten mit Schokolade versorgt hat. Er war und ist mir mehr Freund als Kollege.

**Peter Erfurt** danke ich für seine unschätzbare Expertise und dafür, dass er mir seine Gerätschaften und Laborräumlichkeiten anvertraut hat.

Ebenfalls ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei **Darja Werner**, die mir mit der ihr eigenen Sorgfalt und Kompetenz im Rahmen der Zellversuche zur Seite stand.

Vermutlich habe ich in der Zeit in der Medizinischen Hochschule von jedem Mitarbeiter der HNO-Forschungsabteilung etwas gelernt. Danke für die tollen Mitdoktoranden und die familiäre Arbeitsatmosphäre!

Mein größter Dank gebührt jedoch **meinen Eltern Maria und Ulrich**, die mir die Grundlage dafür gaben, all meine Ziele erreichen zu können. Diesen beiden wie auch **meinem Bruder Matthias**, sowie **Katharina K., Katharina T., Sarah, Jonas, Daniel, Konstantin, Christian** und vor allem auch **Tanja** danke ich für ihren Rückhalt, ihre tatkräftige Anteilnahme und ihren Zuspruch. Ich hätte mir keine bessere Unterstützung wünschen können!