

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jan Helms

Das Wachstumsverhalten von Nucleus cochlearis-Zellen auf
verschiedenen Halbleitermaterialien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Stefan Volkenstein

aus Zellingen

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Dazert

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Müller

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2005

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Überblick und Zielsetzung	1
1.2 Hörbehinderung und Zahlen zu Hörstörungen	2
1.3 Allgemeine Anatomie & Physiologie des Hörens	3
1.4 Pathologie des Hörens	7
1.4.1 Schallleitungsschwerhörigkeit	7
1.4.2 Schallempfindungsschwerhörigkeit	7
1.5 Cochlea-Implantat und Hirnstammimplantat	9
1.6 Halbleiter	10
1.6.1 Physikalische Grundlagen	10
1.6.2 Anwendungen in der Medizin	13
1.7 Zellkultur auditorischer Neurone	13
1.7.1 Spiralganglienzellkultur	14
1.7.2 Nucleus cochlearis-Zellkultur	14
1.8 Fragestellung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Zellkultur	16
2.1.1 Untersuchungsmaterial und Gewebegewinnung	16
2.1.2 Vorbereitung der Kulturplatten	18
2.1.3 Inkubation und Kulturmedium	18
2.1.3.1 Spiralganglienzellkulturmedium	18
2.1.3.2 Nucleus cochlearis-Kulturmedium	19
2.1.4 Fixierung und immunhistochemische Färbung	19

2.2 Halbleitermaterialien	19
2.3 Lichtmikroskopische Auswertung	21
2.3.1 Überlebensrate der Nucleus cochlearis-Explantate	22
2.3.2 Bestimmung der Neuritenzahl	22
2.3.3 Bestimmung der Neuritenlänge	22
2.4 Statistik	23
2.5 Elektronenmikroskopische Auswertung	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Model zur Kultur von Nucleus cochlearis-Zellen	25
3.1.2 Kulturmedium	25
3.2 Lichtmikroskopie	26
3.2.1 Einfluss der Oberflächenbehandlung	27
3.2.2 Überlebensrate der Nucleus cochlearis-Explantate	27
3.2.3 Neuritenanzahl	29
3.2.4 Neuritenlänge	31
3.3 Elektronenmikroskopie	33
4. DISKUSSION	36
5. ZUSAMMENFASSUNG	42
6. LITERATURVERZEICHNIS	44
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

1.1 Überblick und Zielsetzung

Die Verwendung von Cochlea-Implantaten (CI) und Hirnstammimplantaten (ABI = auditory brainstem implant) zur Behandlung der fortgeschrittenen Schwerhörigkeit oder Gehörlosigkeit nimmt in den letzten Jahren stetig zu. Bei diesen Verfahren werden den betroffenen Patienten nach Innenohr- oder Hörnervenschädigung akustische Höreindrücke erfolgreich durch direkte elektrische Stimulation auditorischer Neurone vermittelt. Die Reizelektrode liegt hierbei entweder in der Scala tympani der Cochlea (CI-Versorgung) oder unter Umgehung der Cochlea und des Hörnerven direkt an einem der weiterverarbeitenden Zentren im Hirnstamm (ABI-Versorgung), dem Nucleus cochlearis (NC). Eine weitreichend bekannte Einschränkung in der Weiterentwicklung beider Systeme stellt die große Anzahl simultan erregter Neurone dar. Dies wird unter anderem für eine begrenzte dynamische Bandbreite und eine Limitation der Anzahl separater Kanäle, mit der akustische Informationen solcher Systeme weitergeleitet werden können, verantwortlich gemacht.

Durch die Möglichkeit, Nervenzellen mit implantierbaren Hörsystemen wie CI oder ABI auf mikroskopischer Ebene zu verbinden, könnten Anwendungen aus dem Gebiet der Neuroelektronik Einzug in die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde halten. Denkbar ist zum Beispiel ein aus Nervenzellen bestehender mikroelektronischer Schaltkreis auf axonaler Ebene, der die elektrische Weiterverarbeitung der Höreindrücke unterstützt und so die Bandbreite der durch implantierbare Hörhilfen vermittelten Hörinformation erweitert. Auf diese Weise könnte eine verbesserte Klangqualität und vor allem ein verbessertes Sprachverständnis für den Patienten erreicht werden. Aufgrund elektrotechnischer, physikalischer und bautechnischer Gegebenheiten wäre die Nutzung eines solchen Netzwerks aus auditorischen Neuronen und Mikrochips

aus heutiger Sicht zum Beispiel unter Einbezug von Halbleitermaterialien denkbar.

Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Erkenntnisse über Interaktionen auditorischer Neurone – hier Zellen des Nucleus cochlearis - mit Halbleitermaterialien in der Zellkultur zu erhalten. Es sollte zunächst ein Model zur Kultur von NC-Zellen etabliert werden mit dessen Hilfe das Überleben der Neurone und das Neuritenwachstum auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene genauer untersucht werden kann. Besondere Beachtung sollte hierbei die Wirkung von Faktoren wie Materialeigenschaft, -beschaffenheit und Oberflächenbeschichtung finden, die das Neuritenwachstum positiv oder negativ beeinflussen.

1.2 Hörbehinderung und Zahlen zu Hörstörungen

In Deutschland gibt es ca. 13,3 Millionen Hörbehinderte. Unter den Begriffen „Hörbehinderte“ oder „Hörgeschädigte“ werden üblicherweise Schwerhörige, Ertaubte und Gehörlose zusammengefasst. Dabei weisen Schwerhörige einen mehr oder weniger ausgeprägten Hörverlust auf. Ertaubte haben ihr Gehör nach dem Erwerb der Sprache vollständig verloren. Taubheit bedeutet nach gängiger Definition, dass Schallereignisse, also Geräusche und Töne, nicht mehr wahrgenommen werden können. Es wird eine absolute Taubheit von der praktischen Taubheit, bei der noch einzelne Geräusche oder Töne (Hörreste) wahrgenommen werden, unterschieden. Gehörlose sind im Gegensatz dazu taub geboren oder haben ihr Gehör vor dem Spracherwerb verloren. Von den 13,3 Millionen Hörbehinderten sind ca. 13 Millionen Schwerhörige, ca. 150000 Ertaubte und etwa 80000 Gehörlose (Seidler et Walter, 2001).

Zusätzlich werden in Deutschland jedes Jahr ca. 600 Kinder taub geboren. Seit dem 17. Jahrhundert ist der Zusammenhang zwischen Gehörlosigkeit und Sprachentwicklung bekannt. Ein funktionierendes Hörorgan ist somit die Voraussetzung für eine normale Sprachentwicklung. Die Folge der Gehörlosigkeit ist ohne intensive Therapiemaßnahmen oft die Taubstummheit

mit einer extrem eingeschränkten Kommunikationsfähigkeit und Nachteilen in der geistigen und körperlichen Entwicklung (Sohn et Jörgenshaus, 2001; Seidler et Walter, 2001).

1.3 Allgemeine Anatomie & Physiologie des Hörens

Das Hörorgan des Menschen wird in ein peripheres und ein zentrales Hörsystem gegliedert. Das periphere Hörorgan wird in drei Abschnitte eingeteilt: das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr (Cochlea). Die anatomische Grenze zwischen peripherem und zentralem System liegt an der Eintrittsstelle des VIII. Hirnnerven in den Hirnstamm. Die funktionelle Grenze bildet die zentrale Synapse des peripheren Neurons.

Die Aufgabe des äußeren Ohres (Ohrmuschel und äußerer Gehörgang) besteht in der Weiterleitung des Schalls an das Mittelohr, dessen Hauptfunktion die Impedanzanpassung darstellt. Um die Übertragungsverluste des Schalldruckes durch die unterschiedlichen akustischen Impedanzen von Luft (äußeres Ohr und Mittelohr) und Flüssigkeit (Cochlea) auszugleichen, wird der Schalldruck vom Auftreffen auf das Trommelfell bis zur Weiterleitung in die Cochlea über die Stapesfußplatte im Mittelohr etwa 22-fach verstärkt (Becker et al., 1994; Jürgens 2004).

Das Innenohr (Cochlea) liegt in der Pars petrosa des Schläfenbeins und beherbergt das Corti-Organ mit den Haarzellen, den eigentlichen Sinneszellen des Gehörs. Der knöcherne Schneckenkanal windet sich auf einer Länge von 3-3,5 cm 2,5-mal spiralförmig um die Schneckenachse (Modiolus) und beinhaltet die drei Hohlräume der Scala media, der Scala vestibuli und der Scala tympani.

Die Funktion der Cochlea besteht in der Kodierung der akustischen Informationen in neuronale Signale. Dazu werden durch das Zusammenwirken der inneren und äußeren Haarzellen die durch die Schalleinwirkung hervorgerufenen Basilmembranschwingungen durch den so genannten Frequenz-spezifischen cochleären Verstärker-Mechanismus vergrößert und verschärft (Ashmore et Gale, 2004). Seit Békésy 1960 erste diesbezügliche Arbeiten veröffentlichte sind zahlreiche Modelle dieser Mechanismen

beschrieben, aber auch widerlegt worden (Ashmore et al., 2002). Im Corti-Organ werden äußere von inneren Haarzellen unterschieden, wobei die inneren Haarzellen (IHZ) die eigentlichen Rezeptorzellen darstellen. Die äußeren Haarzellen (ÄHZ), die überwiegend efferent innerviert werden, sind in der Lage, auf Veränderung des Membranpotentials mit somatischen Größenänderungen zu reagieren, was auch als Elektromotilität bezeichnet wird (Brownell et al., 1985; Santos-Sacchi et Dilger, 1988). Die ÄHZ werden als Sitz des cochleären Verstärkers angesehen. Obwohl das Protein Prestin, das sich vor allem in der basolateralen Membran der ÄHZ nachweisen lässt (Zheng et al., 2002), als Motoprotein für die Beweglichkeit der ÄHZ verantwortlich gemacht wird (Zheng et al., 2000) sind diesbezüglich weiterhin viele Fragen ungeklärt. So beispielsweise die hohe zeitliche Auflösung, bei der die Elektromotilität im Mikrosekundenbereich bis hin zu hohen akustischen Frequenzen arbeitet (Dallos et Evans, 1995; Frank et al., 1999). Ohne die ÄHZ ist eine Erhöhung der Hörschwelle um 50-60 dB beschrieben (Ryan et Dallos, 1975).

Das zentrale Hörsystem (Abbildung 1-1) beginnt im Hirnstamm mit dem Nucleus cochlearis, verläuft hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, kontralateral über die beiden oberen Olivenkomplexe, den Colliculus inferior des Mittelhirns und den Thalamus zum auditorischen Kortex, der hauptsächlich im Temporallappen lokalisiert ist (Arnold et Ganzer, 1999; Probst et al., 2004).

Moderne bildgebende Verfahren ermöglichen in vivo-Einblicke in die Aktivität und die Funktionsweise des zentralen Hörsystems bei Individuen mit normaler oder krankhaft bzw. artifiziell veränderter Hörfunktion. Hierbei sind vor allem die Funktions-Magnetresonanztomographie und auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) hervorzuheben (Johnsrude et al., 2002). Hauptaugenmerk liegt bei derartigen Studien oft auf der Wahrnehmung von Höreindrücken wie Sprachverständnis, der Verarbeitung von Melodien oder der gerichteten Aufmerksamkeit mit der Unterdrückung von Hintergrundgeräuschen (Sergent, 1993; Rees et Frith, 1998; Scott et al., 2000). Die aufgezählten Verarbeitungsmuster werden, unter der Voraussetzung einer spezifischen Kodierung der Höreindrücke in der Cochlea, als zentrale Leistung des Gehirns

angesehen. Durch Vestibularisschwannome und deren mechanische Kompression des Hörnerven werden Informationsverluste hervorgerufen, die beispielsweise durch Diskriminationsverluste bei Sprachverständnis-Testung verifiziert werden können (Masuda et al., 2004). Auch durch den Ersatz der Funktion der Cochlea durch ein CI werden Veränderungen der Höreindrücke erzeugt, die in PET-Untersuchungen durch unterschiedliche Hirnaktivität bei Patienten nach erfolgter CI-Rehabilitation im Vergleich zu normal Hörenden objektiviert werden konnten (Johnsrude et al., 2002).

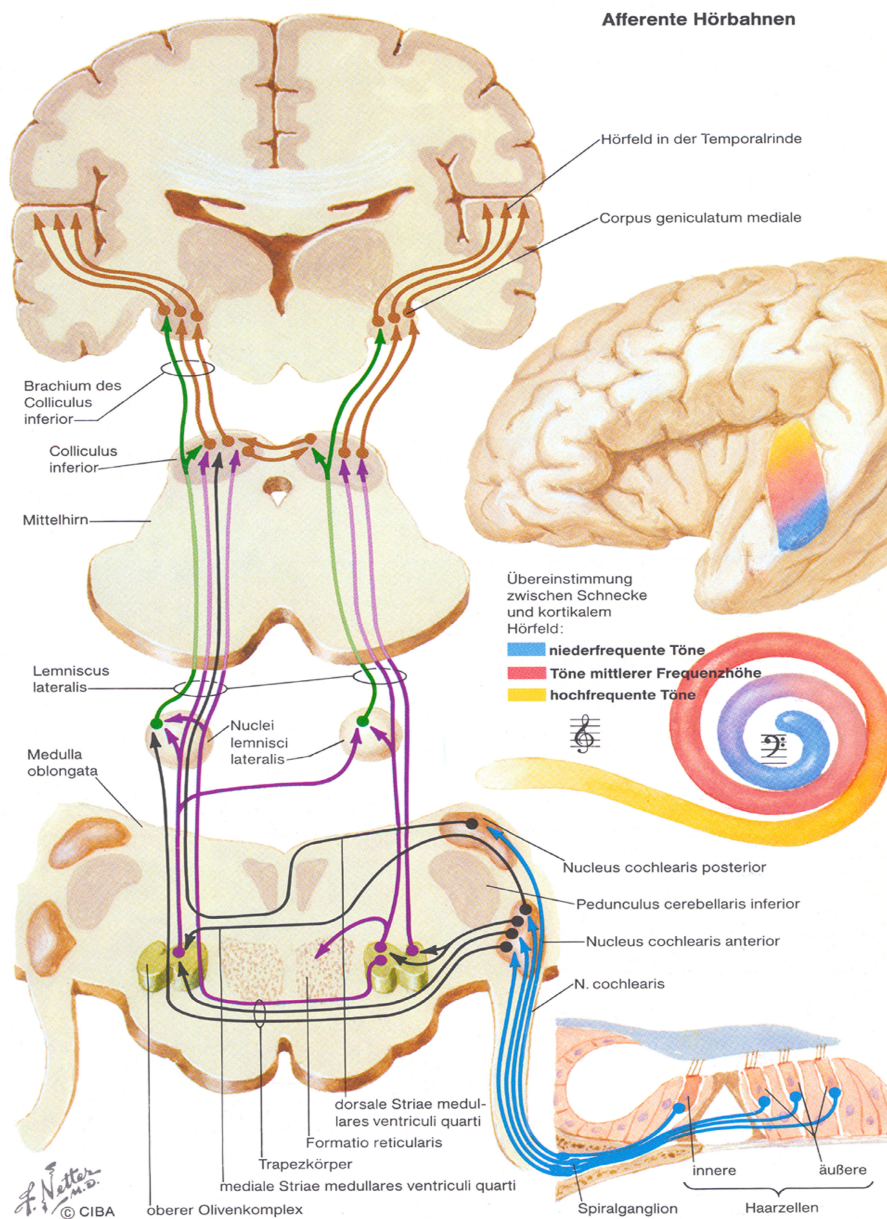


Abbildung 1-1: Darstellung der zentralen, afferenten Hörbahn. Die zentrale Hörbahn beginnt anatomisch mit dem Eintritt des N.vestibulocochlearis (VIII. Hirnnerv) in den Hirnstamm. Die in ihm verlaufenden afferenten Nervenfasern, die zum größten Teil von den Spiralganglienzellen ausgehen, enden beidseits in den Nuclei cochleares posteriores et anteriores. Von dort verläuft die Hörbahn weiter zu den Kernen des oberen Olivenkomplexes, im Lemniscus lateralis, zum Colliculus inferior und dem Corpus geniculatum mediale. Als Endpunkt und primäres Hörfeld ist beim Menschen das Feld 41 nach Brodmann nachgewiesen worden. Die neuronalen Signale kreuzen auf ihrem Weg dorthin zum Großteil auf die Gegenseite, weiterhin existieren zahlreiche Verbindungen der einzelnen Kerngebiete untereinander (Abbildung aus: „The Ciba Collection of Medical Illustrations, Farbatlant der Medizin, Band 5, Nervensystem I“, Frank H. Netter, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1987).

1.4 Pathologie des Hörens

Ein teilweiser oder vollständiger Hörverlust kann verschiedene Ursachen haben. Dabei kann jede Stufe des Hörsystems betroffen sein, von der Verlegung des äußeren Gehörgangs durch Cerumen bis hin zu Durchblutungsstörungen der Hörrinde. Zu unterscheiden ist dabei die Schallleitungsschwerhörigkeit, bei der die Ursache entweder im äußeren Ohr oder im Mittelohr liegt, von der Schallempfindungsschwerhörigkeit, deren Ursache am häufigsten in der Cochlea lokalisiert ist (sensorische Schwerhörigkeit). Im Unterschied hierzu werden Störungen des Hörnerven oder der zentralen Hörbahn als retrocochleäre bzw. zentrale Schwerhörigkeit bezeichnet (Boenninghaus et Lenarz, 1996; Becker et al., 1994). Im Weiteren wird auf die Einteilung und mögliche Ursachen der Schwerhörigkeit eingegangen, bevor dann im folgenden Kapitel heutige Behandlungsmöglichkeiten zusammengefasst werden.

1.4.1 Schallleitungsschwerhörigkeit

Eine der häufigsten Ursachen stellt hier die Verlegung des äußeren Gehörgangs durch Cerumen, Fremdkörper oder gutartige Knochenneubildungen, Exostosen, dar. Weitere, meist reversible Prozesse ergeben sich durch das Vorliegen eines Muko- oder Serotympanons. Andere Ursachen wie Otosklerose oder eine chronische Otitis media können durch eine sogenannte Steigbügeloperation oder durch Rekonstruktionstechniken des Schallleitungsapparats in den meisten Fällen deutlich gebessert werden. Bei vielen Schallleitungsschwerhörigkeiten ist somit eine kausale Therapie möglich. Kann diese aus unterschiedlichen Gründen nicht erfolgen, kann eine Schallleitungsschwerhörigkeit auch durch konventionelle oder knochenverankerte Hörgeräte, die den Schall verstärken, verbessert werden.

1.4.2 Schallempfindungsschwerhörigkeit

Hier sind anatomisch-funktionell retrocochleäre Hörstörungen von den wesentlich häufigeren cochleären Störungen zu unterscheiden. In der zuerst genannten Gruppe wird eine neurale von der zentralen Schwerhörigkeit

abgegrenzt. Klinisch ist es oft schwierig, die drei genannten Ursachen voneinander zu unterscheiden, da nicht selten auch kombinierte Störungen auftreten. Obwohl die Ursache von Schallempfindungsstörungen oft unbekannt bleibt sind einige Faktoren, die zu Innenohrschwerhörigkeit führen können, gut untersucht. So konnte bei zahlreichen Medikamenten wie Aminoglykosiden und Zytostatika (Fee, 1980; Lautermann et al., 2004), bei gewerblichen Stoffen wie dem Lösungsmittel Aminobenzol oder bei dem Schwermetall Arsen eine toxische Wirkung auf das Innenohr nachgewiesen werden (Fechter, 2004), die reversibel oder auch irreversibel sein kann. Lärm kann zur direkten Traumatisierung der cochleären Strukturen mit folgendem Hörverlust führen (Hausler, 2004), dabei können akustische Traumen mit hoher Schallenergie genauso zu einer dauerhaften Innenohrschwerhörigkeit führen wie die Einwirkung niedrigerer akustischer Energie über einen langen Zeitraum. Neben lärmbedingten Innenohrschädigungen können auch Infektionen, z.B. im Rahmen einer Meningitis, in jedem Alter zu Innenohrschädigungen und Hörstörungen führen. Andere Innenohrläsionen können im Rahmen immunassoziiertes Erkrankungen, akuter und chronischer Durchblutungsstörungen oder metabolischer Syndrome hervorgerufen werden. Welcher dieser Mechanismen im Einzelfall für die Schädigung verantwortlich ist kann oftmals nur vermutet werden, was beispielsweise in der Beurteilung einer anzuerkennenden Berufskrankheit weitreichende Folgen haben kann.

Eine weitere, große Gruppe der cochleären Schwerhörigkeiten stellen die hereditären Innenohrschwerhörigkeiten dar. Grundsätzlich können hier syndromale von nichtsyndromalen Formen unterschieden werden. Eine syndromale hereditäre Schwerhörigkeit wie sie beim Usher-, Cogan- oder Waardenburg-Syndrom auftreten kann ist meist konnatal vorhanden. Diese kann sich aber auch, genauso wie hereditäre, nichtsyndromale Innenohrstörungen, später, selten erst im Erwachsenenalter, manifestieren. Hierbei sind für die meisten bekannten Erbgänge Erkrankungen beschrieben, wobei zur Zeit vor allem die mitochondrial vererbten Schwerhörigkeiten

Beachtung finden (Kupka et al., 2004; Jacobs et al., 2004; Riemann et al., 2004).

1.5 Cochlea-Implantat/Hirnstammimplantat

Menschen mit einer fortgeschrittenen, beidseitigen Schwerhörigkeit können von der Versorgung mit einem CI profitieren. Die Funktionsweise eines CIs beruht auf der direkten elektrischen Stimulation auditorischer Neurone über eine chirurgisch in die Scala tympani eingelegte Mikroelektrode. Zunächst müssen die über ein Mikrophon aufgenommenen äußeren Schallsignale durch einen Mikroprozessor in elektrische Impulse umgewandelt werden, die dann über mehrere Kanäle -der tonotopischen Anordnung in der Cochlea folgend- an den Hörnerven weitergeleitet werden. Bis zum Jahr 2002 wurden weltweit bereits mehr als 40000 Menschen mit CIs versorgt (Rauschecker et Shannon, 2002). Sie alle profitieren von den erzielten Fortschritten auf dem Gebiet der Cochlea-Implantation in den vergangenen 30 Jahren (Loeb, 1990; Rauschecker, 1999). Viele mit einem solchen Implantat versorgte Patienten können über das Telefon mit anderen Menschen kommunizieren, Kinder können vielfach die Regelschule besuchen. Seit den ersten Implantationen in den 70er Jahren und kontroversen Diskussionen über Vor- und Nachteile solcher Versorgungen (Brackmann, 1976) ist bis heute die Indikation und der geeignete Zeitpunkt der Implantation bei Kindern Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Verbesserungsmöglichkeiten werden heute vor allem in der Weiterentwicklung der Sprachprozessoren und des Elektrodendesigns gesucht (Laszig et al., 2004). Die Entwicklung von Mehrkanalelektroden, die die gleichzeitige Verabreichung pharmakologischer Substanzen in die Cochlea erlauben (Shepherd et Xu, 2002), oder intraneuralen Elektroden, die den Nervus cochlearis direkt stimulieren (Badi et al., 2003; Hillman et al., 2003; Arts et al., 2003), lässt eine weitere Verbesserung des Sprachverständnisses erwarten.

Patienten mit einer Erkrankung des Hörnerven können von einer CI-Versorgung nicht profitieren. Bei diesen Patienten muss die elektrische Stimulation unter Umgehung der Cochlea und des Hörnerven an einem die Höreindrücke

weiterverarbeitendem Zentrum der zentralen Hörbahn erfolgen. Ort der Stimulation ist bei diesen Prothesen der Nucleus cochlearis, nach der Cochlea der nächste Ort der Hörbahn in dem eine Weiterverarbeitung der Höreindrücke stattfindet (Brackmann et al., 1993). Das Funktionsprinzip bei den seit den späten 70er Jahren vor allem im House Ear Institute in Los Angeles, USA, entwickelten Prothesen ist ähnlich dem des CI (Edgerton et al., 1982). Ein Sprachprozessor übersetzt die aufgenommenen Schallsignale in elektrische Impulse, die dann über Platinelektroden die NC-Neurone direkt stimulieren (Jackson et al., 2002). Bis zum Jahr 2004 wurden weltweit mehr als 300 Patienten mit einer solchen Prothese versorgt. Die Indikationen hierzu reichen von beidseitigen Tumoren des Hörnervens, z.B. bei Neurofibromatose Typ II (Kuchta, 2004a), über beidseits komplett ossifizierte Cochleae (Grayeli et al., 2003), bis zum fehlenden Erfolg einer CI-Versorgung (Colletti et al., 2004). Mit einem ABI versorgte Patienten erreichen bis heute jedoch bei weitem nicht das Sprachverständnis der meisten CI-Träger. Rauschecker et al. (2002) führen hierzu zahlreiche mögliche Ursachen auf. Versuche, das Hörergebnis nach einer ABI Versorgung zu verbessern, stellen momentan - im Gegensatz zu den ursprünglich verwendeten dem Hirnstamm oberflächlich anliegenden Elektroden - die Verwendung penetrierender Elektroden (McCreery et al., 1998), die subtonsilläre Platzierung des Implantats (Seki et al., 2003) oder die Entwicklung von Mehrkanal-Elektroden (Kuchta et al., 2004) dar.

1.6 Halbleiter

1.6.1 Physikalische Grundlagen

Als Halbleiter werden in der Physik Festkörper bezeichnet, deren elektrische Leitfähigkeit zwischen der eines Metalls und eines Isolators liegt. Man unterscheidet organische Halbleiter wie Anthracen oder Polyvinylcarbazol, Halbleiterverbindungen wie Galliumphosphid oder Zinksulfid und Elementarhalbleiter wie das Silizium. In reiner Form besitzen diese Halbleiter eine kristalline Struktur, die der des Diamanten sehr ähnlich ist. Jedes dieser Halbleiteratome besitzt auf der Außenschale vier Elektronen. Aus energetischen

Gründen hat jedes dieser Atome das Bestreben, acht Elektronen auf die Außenschale zu bekommen. Jeweils vier benachbarte Atome teilen sich nun die Elektronen der Außenschale, was zur Folge hat, dass jedes einzelne Atom dann acht Elektronen auf der Außenschale besitzt. Wie bei Edelgasen, die auf Grund einer komplett gefüllten äußeren Elektronenhülle ideale Isolatoren darstellen, sind bei Halbleitern am absoluten Nullpunkt (0^0 Kelvin) keine freien Elektronen vorhanden, sie stellen bei dieser Temperatur einen Isolator dar. Wird durch Energiezufuhr deren Temperatur erhöht, beginnen die Atome zu schwingen. Je mehr Energie zugeführt wird, desto mehr Bindungen brechen auf. Hierdurch bilden sich zum einen freie Elektronen, zum anderen entstehen an den Stellen heraus gelöster Elektronen frei bewegliche Elektronenlücken. So ergeben sich bei höherer Energiezufuhr mehr Ladungsträger, was die Eigenschaft der temperaturabhängigen elektrischen Leitfähigkeit von Halbleitern erklärt.

Durch Energiezufuhr kann somit die Leitfähigkeit von Halbleitern erhöht werden. Auch durch eine gezielte Verunreinigung eines Halbleiters mit Fremdatomen kann die Leitfähigkeit beeinflusst werden. Bei diesem Vorgang, dem Dotieren, kann ein Überschuss oder ein Mangel von Elektronen gezielt herbeigeführt werden, indem Fremdatome mit drei oder fünf Außenelektronen in das Kristallgitter eingebracht werden. Halbleiterbereiche mit Elektronenmangel bezeichnet man als p-dotiert, solche mit Überschuss als n-dotiert (Abbildung 1-2, siehe auch „Brockhaus Naturwissenschaft und Technik“, sowie Lehrbücher der Physik).

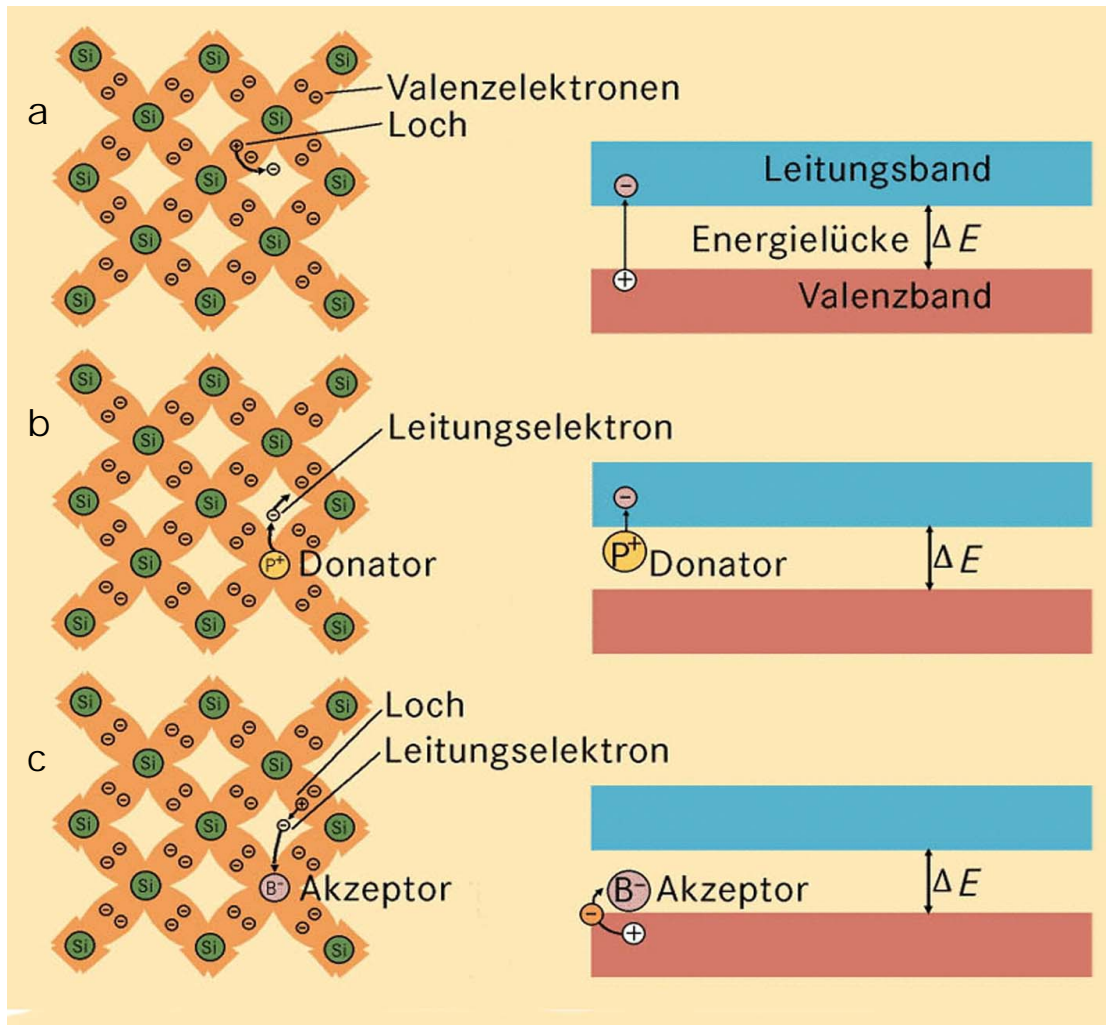


Abbildung 1-2: Modellvorstellung des Ladungstransports in reinen (a), p-dotierten (b) und n-dotierten (c) Halbleitern. Jeweils vier benachbarte Atome teilen sich acht Elektronen der Außenhülle im so genannten Valenzband. Durch Energiezufuhr (z.B. als Wärme) können sich dort Valenzelektronen lösen und in das so genannte Leitungsband wechseln, in dem sie zum Ladungstransport zur Verfügung stehen (a). Durch gezielte Verunreinigung des Kristallgitters mit Fremdatomen die als Elektronendonatoren (p-Dotierung, b) oder -akzeptoren (n-Dotierung, c) fungieren, kann die Leitfähigkeit positiv oder negativ beeinflusst werden (modifiziert aus: Brockhaus Naturwissenschaft und Technik, Spektrum Verlag, Mannheim-Leipzig, 2003).

1.6.2 Anwendung von Halbleitern

Durch die Kombination von n- und p-dotierten Bereichen können so genannte Halbleiterbauelemente wie Dioden oder Transistoren hergestellt werden. Aus vielen solcher Bauelemente in einem einzelnen Kristall können komplexe, integrierte Schaltungen produziert werden, wie sie häufig als Mikrochips Verwendung finden. In vielen elektrotechnischen Bauteilen, insbesondere in der Mikroelektronik werden die genannten Eigenschaften der Halbleiter ausgenutzt, beispielsweise als integrierte Schaltkreise, Computerchips oder als Speichermedien.

Durch die Einführung der so genannten Lithographie bei der Herstellung von Mikrochips ist es gelungen, extrem miniaturisierte Schaltungen und damit auch winzige elektrotechnische Bauteile herzustellen. Man bezeichnet dies auch als Nanotechnologie.

Ohne die Mikrochip-Technologie wären heutige Rechenleistungen von Computern undenkbar und auch die CI- oder ABI-Technik kommt ohne die Verwendung von mikroelektronischen Bauelementen nicht aus. Neue Ansätze zur Verwendung solcher Techniken in der Medizin stellen Biosensoren zur Testung toxischer oder pharmakologischer Substanzen auf Zellen, Neuroprothesen oder die Entwicklung einer auf Halbleitertechnik basierenden elektronischen Nase (Thaler, 2002) dar.

1.7 Zellkultur auditorischer Neurone

In der Literatur sind zahlreiche Arbeiten über Zellkulturen auditorischer Säugetierneurone zu finden. Ein Schwerpunkt bei diesen Untersuchungen ist die Regulation der Reifung, des Überlebens und der Funktion neuronaler Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems. Während die Zellkultur von Spiralganglienzellen seit geraumer Zeit mit großem Interesse verfolgt wird und Erkenntnisse hierüber weitreichender Art vorliegen, haben in jüngerer Vergangenheit auch Kulturen mit Zellen des NC oder von Neuronen der Hörrinde größere Beachtung gefunden (Gopal et Gross, 1996). Bei Experimenten, die sich mit dem Überleben neuronaler Zellen oder deren

Differenzierung in Kultur beschäftigen, ist die Zugabe von Seren zu dem eigentlichen Wachstumsmedium problematisch, da das mögliche Vorhandensein von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen im Serum genauso zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann wie die unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener Chargen des Serums (Romgjn, 1988; Bjare, 1992). Um diesen Unwägbarkeiten auszuweichen, sollte bei den durchgeführten Versuchen auf chemisch definierte Medien zurückgegriffen werden.

1.7.1 Spiralganglienzellkultur

Mit Hilfe von Einzelzellkulturen oder Kulturen des gesamten Spiralganglions wurden die Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren wie Neurotrophin-3 (NT-3), Brain derived neurotrophic factor (BDNF) oder Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) auf die Entwicklung von Spiralganglienzellen der Ratte und der Maus untersucht (Lefebvre et al., 1990; Mou et al., 1997; Zhou et al., 1996; Dazert et al., 1998; Aletsee et al., 2003), ebenso wie die Wirkung von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECMP) wie Laminin oder Tenascin auf das Neuritenwachstum (Aletsee et al., 2001). Es liegen Erkenntnisse ihres Zusammenspiels mit der allgemeinen Entwicklung der Cochlea (Sobkowitz et al., 1993), über chemische Strukturen verschiedener Neurotransmitter und deren Rezeptoren (Lefebvre et al., 1991; Chao, 1992) bis hin zu möglichen intrazellulären Übertragungswegen von Neurotrophin-Signalen vor (Kaplan et Stephens, 1994; Aletsee et al., 2001a & 2002). Als Kulturmedium dienten bei diesen Untersuchungen sowohl serumfreie als auch mit verschiedenen fetalen Seren versetzte Lösungen, oft auf Basis von „minimal essential medium“ (MEM) oder Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM).

1.7.2 Nucleus cochlearis-Zellkultur

Historisch werden die Zellen des Nucleus cochlearis nach ihrer Lokalisation (Lorente de No, 1933), Morphologie (Osen, 1969; Brawer et al., 1974) oder nach ihrer Aktivität auf akustische Stimulation (Pfeiffer, 1966; Evans et Nelson, 1973) eingeteilt. Dissoziierte NC-Zellen des Meerschweinchens, der Maus oder

der Ratte werden aufgrund ihrer guten Abgrenzbarkeit gegenüber umgebenden Neuronen des zentralen Nervensystems und ihrer leichten Zugänglichkeit bevorzugt zu elektrophysiologischen Untersuchungen herangezogen, um die Entstehung intrinsischer elektrischer Potentiale und deren Entladungsmuster sowie Membranpotentiale oder transmembranäre Transportsysteme zu untersuchen (Manis et al., 1994; Oertel et al., 1990). Für die überwiegend als Einzelzellkulturen durchgeführten Untersuchungen an NC-Zellen der Ratte erwiesen sich sowohl serumfreie als auch mit Pferde- oder Rinderserum versetzte Medien als geeignet (Fitzakerley et al., 1997). Aufgrund der Fragestellungen und der Kultur von Zellkonglomeraten haben wir zunächst auf die Berücksichtigung der anatomisch-funktionellen Einteilung des NC in einen anteriorventralen, posteriorventralen und dorsalen Teil ebenso verzichtet, wie auf die morphologischen Unterschiede der Einzelzellen und eine Differenzierung der unterschiedlichen Zellfortsätze.

1.8 Fragestellung

Zunächst soll eine Versuchsanordnung entwickelt werden mit der nicht nur Einzelzellen des Nucleus cochlearis, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, sondern auch dessen Zellkonglomerate kultiviert werden können. Im weiteren Schritt sollen die Auswirkungen verschiedener Oberflächenbeschaffenheiten von Halbleitern, unterschiedliche Halbleitermaterialien selbst und der Einfluss des ECM-Proteins Laminin auf das Neuritenwachstum untersucht werden. Darüber hinaus sollen durch elektronenmikroskopische Analysen der kultivierten Explantate weitere Erkenntnisse über das Neuritenwachstum von NC-Zellen, deren Verhalten an mechanischen Hindernissen und deren Zusammenwirken mit nichtneuronalen Zellen auf den verschiedenen Oberflächen untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurden zunächst Zellkulturversuche mit NC-Explantaten in unterschiedlichen Kulturmedien, auf verschiedenen Halbleitermaterialien sowie mit unterschiedlichen Oberflächenveredelungen und -beschichtungen mit ECM-Proteinen durchgeführt. Des Weiteren wurde das Neuritenwachstum auf elektronenmikroskopischer Ebene genauer betrachtet.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Untersuchungsmaterial und Gewebegewinnung

Alle Untersuchungen und chirurgischen Eingriffe an Tieren waren entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Tierschutzkommission der Universität Würzburg legitimiert.

10 Tage alte Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Deutschland) wurden durch intraperitoneale Applikation eines Gemisches (0,4ml/100g Körpergewicht), bestehend aus 1,26mg/ml Ketamin, 0,25mg/ml Azepromezin, 1,26mg/ml Xylazin, anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die weitere Präparation (siehe auch Rusznak et al., 2001) wurde unter sterilen Bedingungen in Dulbecco´s phosphatgepufferter Kochsalzlösung (D-PBS) mit Hilfe eines Operationsmikroskopes (OP II, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Nach Spaltung und Lateralisierung der Haut und des darunterliegenden Weichteilgewebes wurde der knöcherne Schädel der Tiere dorsal, midsagittal eröffnet. Nach Entfernung der dorsalen Schädelanteile und unter Beachtung der vollständigen Durchtrennung aller Hirnnerven am Eintritt in die jeweiligen Foramina kann das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel herausgelöst und in eine Petri-Schale mit gekühltem D-PBS transferiert werden. Das Großhirn wurde abgetrennt und die Vorderseite des Hirnstamms von Meningen und größeren Blutgefäßen befreit. Nun kann der NC an beiden Seiten, durch Orientierung an den Pedunculi cerebelli inferiores identifiziert und mit einer feinen Pinzette abgelöst werden. Der NC wurde darauf mit einem Skalpell in acht bis zehn gleichgroße Stücke separiert und unmittelbar nach der Präparation zentral auf

die Halbleiterplättchen bzw. in die Mitte der Kulturschalen transferiert (siehe Abbildung 2-1).

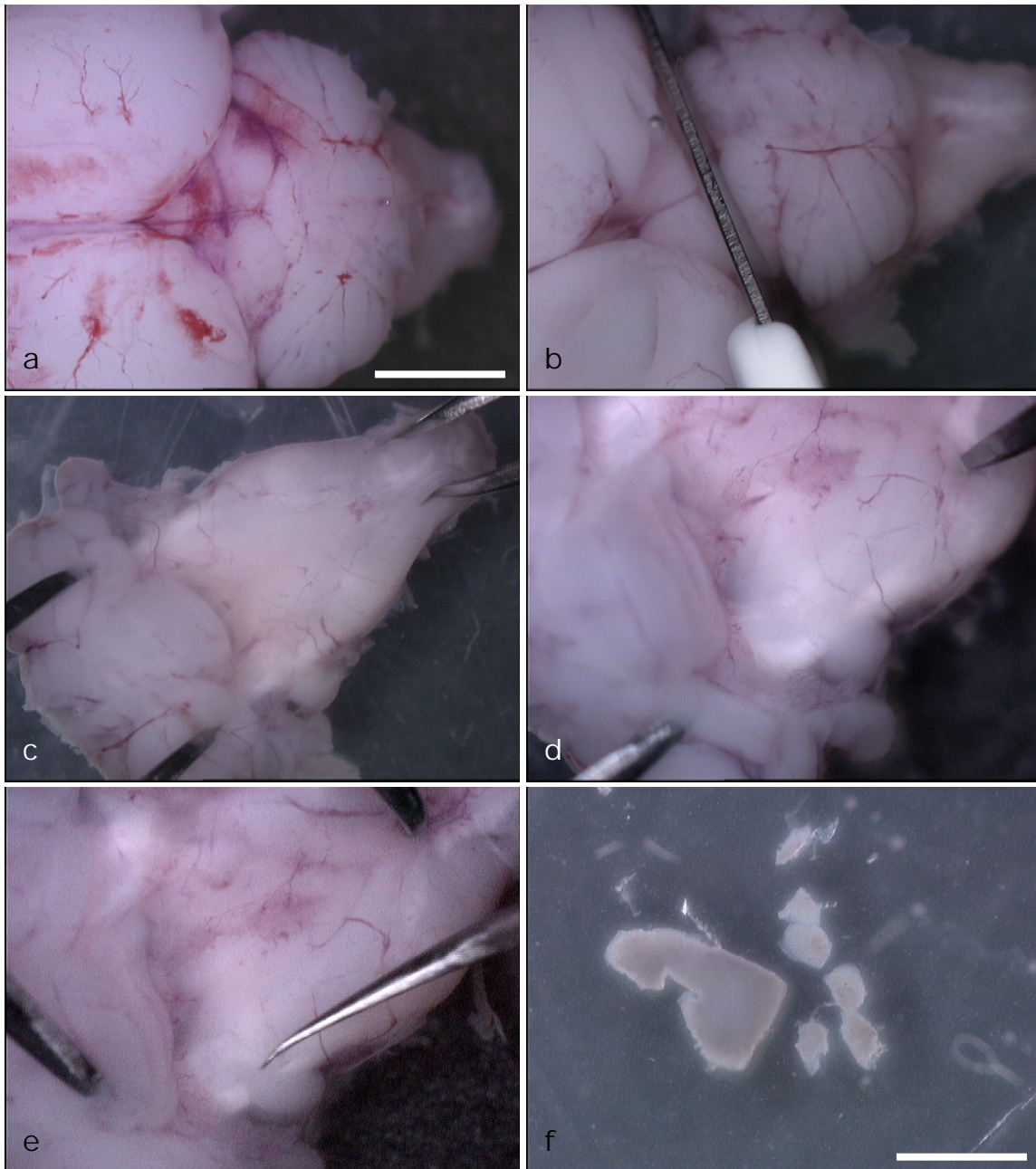


Abbildung 2-1: Präparation des Nucleus cochlearis von zehn Tage alten Ratten. Dargestellt ist das aus dem knöchernen Schädel gelöste Gehirn von dorso-cranial (a). Nach Abtrennung des Großhirns (b) erfolgt die Entfernung der Meningen sowie der großen Blutgefäße und die Mobilisation des Cerebellums nach cranial (c). Nach Identifikation des Nucleus cochlearis mittels des Pedunculus cerebellaris inferior (d) vorsichtiges Ablösen von umgebendem Hirngewebe (e) und Separation in 8-10 Explantate (f). Balken a-e: 5mm, f: 1mm.

2.1.2 Vorbereitung der Kulturplatten

Die Zellkultur erfolgte in Standardkulturplatten aus Polystyrol mit 48 Vertiefungen (Becton Dickinson Labware Europe, Le Point De Claix, Frankreich). Die Halbleiterplättchen wurden mit Aceton und Äthanol gereinigt und in einen Teil dieser Kulturplatten gelegt. Zur Keimelimination wurden diese vor der weiteren Präparation für 2 Stunden mit UV-Licht von 366nm Wellenlänge behandelt (Desaga UVIS, Heidelberg). Entsprechend der Versuchsanordnung wurden alle Kulturplatten und Halbleiterplättchen vor der Gewebebeschickung mit Poly-D-Lysin (10 mg/ml; BD Biosciences, Heidelberg) in D-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur und ein Teil davon anschließend mit Laminin (LN, 1mg/ml; Laminin mouse, BD Biosciences, Heidelberg) in D-PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten der Beschichtung erfolgte jeweils eine Spülung der Platten mit dem 10-fachen Volumen an D-PBS. Unmittelbar vor der Gewebebeschickung wurden die Platten mit dem jeweiligen Kulturmedium gespült, anschließend gefüllt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kurzzeitig gelagert.

2.1.3 Inkubation und Kulturmedium

Die Inkubation erfolgte für jeweils 96 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 100µl des verwendeten Wachstumsmediums. Hierbei wurde ein Spiralganglienzellkulturmedium, das sich in zahlreichen Arbeiten als Standardkulturmedium für auditorische Neurone bewährt hatte (Aletsee et al., 2002; Mlynski et al., 2002; Brors et al., 2002) im Vergleich zu einem, nach Durchsicht verschiedener Arbeiten über Zellkulturversuche mit NC-Einzellen (Fitzakerley et al., 1997; Poe et Brunso-Bechthold, 1998; Rusznak et al., 2001; Fitzakerley, 2001), zusammengestelltem Medium, das unter 2.1.3.2 beschrieben ist, verwendet.

2.1.3.1 Spiralganglienzellkulturmedium

Grundlage dieses Mediums stellt Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) dar. Als Zusätze erhält dies 25mM HEPES Puffer, 30µl/ml N2 Supplement

(jeweils GIBCO Life Technologies, Heidelberg), 6mg/ml Glucose und 300U/ml Penicillin (Grünenthal GmbH, Aachen).

2.1.3.2 Nucleus cochlearis-Kulturmedium

Als Vergleichsmedium diente serumfreies Neurobasal™Medium (GIBCO Life Technologies, Heidelberg) mit B27 Supplement (50x). Bei einem Teil der Untersuchungsgruppen wurde Glutamax (GIBCO Life Technologies, Heidelberg) oder der Wachstumsfaktor NT-3 (10ng/ml, Sigma-Aldrich RBI, München) zugesetzt.

2.1.4 Fixierung und immunhistochemische Färbung

Im Anschluss an die Zellkultur wurden alle Explantate mit einem Aceton-Ethanolgemisch (1:1) für etwa 15 min fixiert und zweimal mit D-PBS gewaschen. Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte die Inkubation mit Pferdeserum (Elite Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., 15µl/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Nachweis der Neurone mit ihren Neuriten erfolgte durch Markierung des 200kD-Antineurofilamentproteins mit einem monoklonalen, in der Maus entwickelten Anti-Neurofilament Antikörper (Chemicon Int., USA; 1:500 verdünnt in 1% Pferdeserum). Anschließend wurden die Präparate durch Inkubation mit einem zweiten biotinylierten Antikörper (Elite Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc.) und nachfolgendem Zusatz von Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat für die Anfärbung mit Diaminobenzidin (DAB Kit, Vector Laboratories, Inc.) vorbereitet.

2.2 Halbleitermaterialien

Als Halbleitermaterial standen Scheiben aus p-type Silizium {100} (Si) und p-type Siliziumnitrid {100} (Si₃N₄), jeweils in poliertem und unpoliertem Zustand, zur Verfügung (Firma Leica, Jena). Die Halbleiterplättchen wurden mit einem Diamanten so zerschnitten, dass sie auf den Boden einer Standardkulturplatte

(Falcon™ Multiwell 48, BD Bioscience, Heidelberg) gelegt werden konnten (siehe Abbildung 2-2).

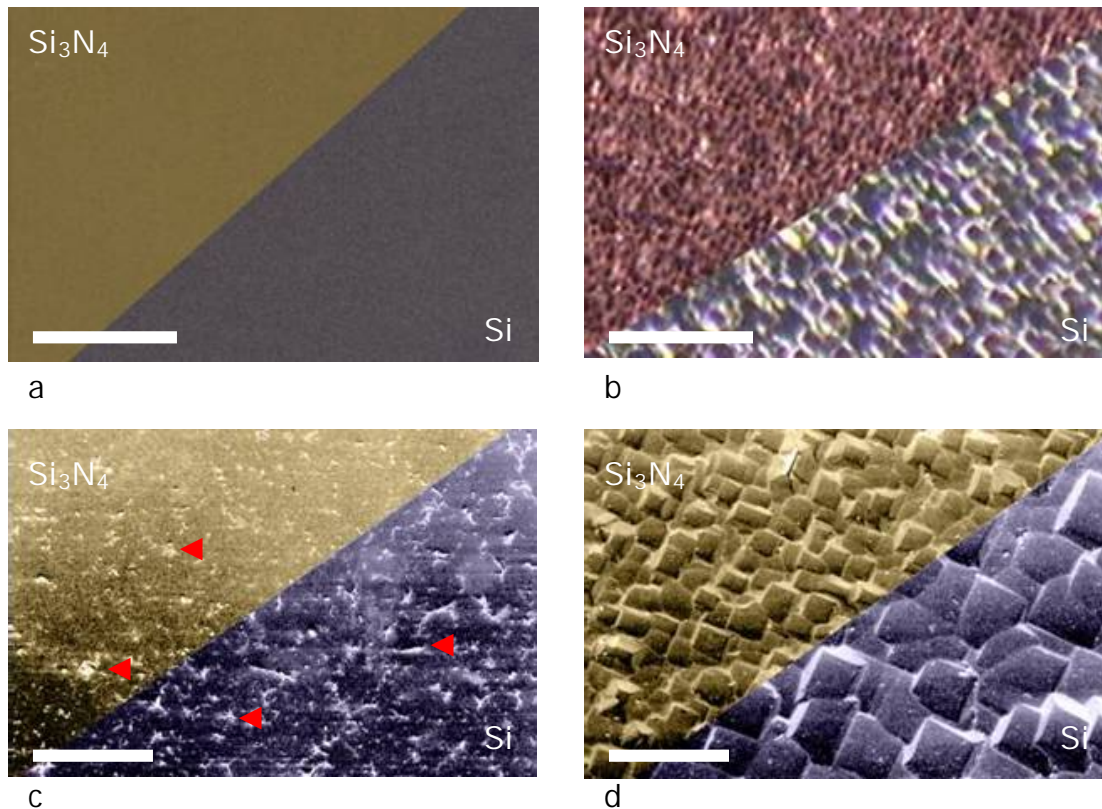


Abbildung 2-2: Die Oberflächen der verwendeten Halbleitermaterialien lichtmikroskopisch (a & b) und elektronenmikroskopisch (c & d) betrachtet. Lichtmikroskopisch (64x Vergrößerung) zeigen beide Materialien poliert eine glatte und spiegelnde Oberfläche, Si_3N_4 scheint golden und reines Silizium zeigt eine grau-silberne Farbe (a). In unpoliertem Zustand (64x) zeigt sich bereits lichtmikroskopisch eine rauere Oberflächenstruktur, wobei reines Silizium großporiger erscheint (b). Elektronenmikroskopisch (500x) zeigen poliertes Si und Si_3N_4 eine absolut glatte Oberfläche, die Pfeile markieren Artefakte durch die Lamininbeschichtung (c). In unpoliertem Zustand zeigt sich elektronenmikroskopisch (500x) der deutliche Größenunterschied von Silizium-Kristallen bzw. Si_3N_4 -Kristallen (d). Balken entspricht $400\mu\text{m}$ (a & b) bzw. $50\mu\text{m}$ (c & d). Abbildung c und d sind zur besseren Anschauung mit CorelDRAW® 6.0 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) coloriert.

2.3 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Überlebensraten der NC-Explantate und des Neuritenwachstums erfolgte lichtmikroskopisch. Das Neuritenwachstum wurde hierbei nach der Neuritenanzahl und der -länge pro Explantat beurteilt. Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mit einer digitalen Kamera (DXC 930 P, Sony, Japan) unter dem Mikroskop (Wilovert Will, Wetzlar) fotografiert und digital in einen Rechner eingelesen (pci Graber 4, Phytect Messtechnik, Mainz). Um den Abbildungsmaßstab der Fotos zu berücksichtigen wurde für jede Vergrößerung ein Objektmikrometer abgelichtet mit deren Hilfe dann Umrechnungsfaktoren für die Berechnungen bestimmt werden konnten (siehe Abbildung 2-3).

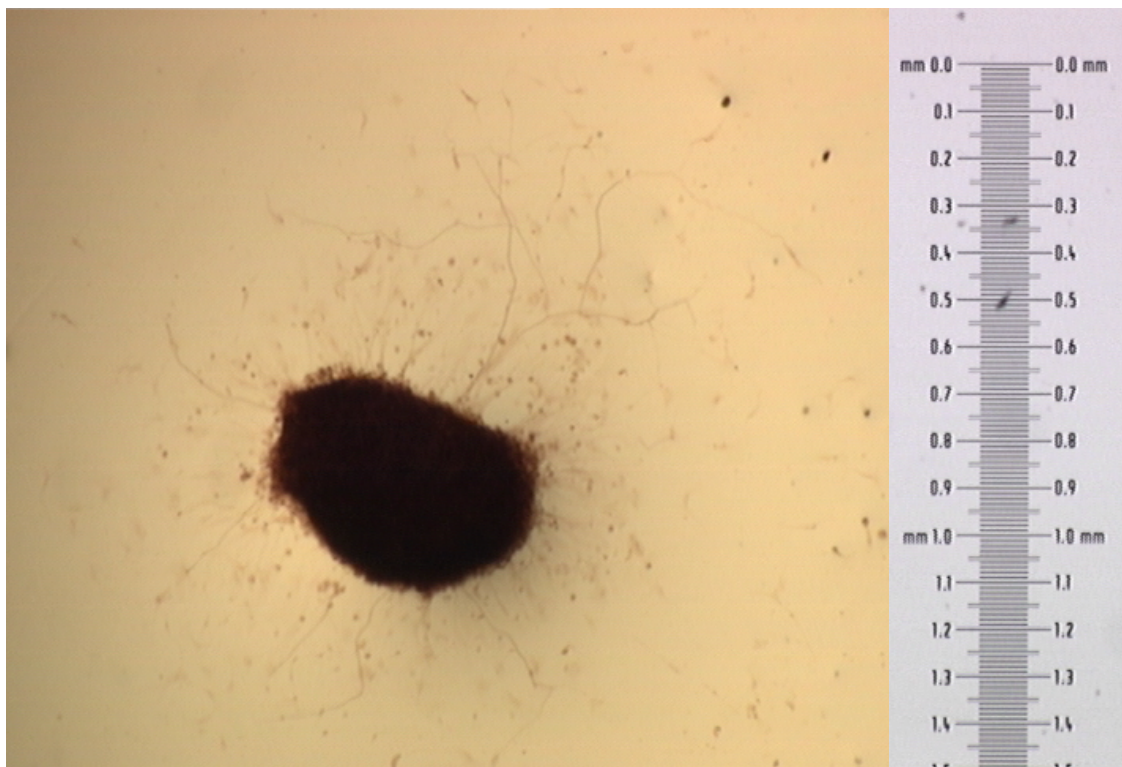


Abbildung 2-3: Nucleus cochlearis-Explantat mit Mikrometer lichtmikroskopisch betrachtet (20xVergrößerung).

2.3.1 Überlebensrate der NC-Explantate

Alle mit Gewebe beschickten Zellkultureinheiten (wells) wurden nach Abschluss der Färbung dahingehend untersucht ob das NC-Explantat disloziert oder angewachsen war. Die angewachsenen Explantate wurden in diejenigen mit und ohne feststellbares Neuritenwachstum eingeteilt und den verschiedenen Untersuchungsgruppen zugeordnet. Als „überlebende“ Gruppe wurden die Explantate definiert, die angewachsen waren und bei denen ein Neuritenwachstum detektiert werden konnte.

2.3.2 Bestimmung der Neuritenanzahl

Es wurden alle Neuriten eines Explantats ausgezählt und zwischen den Untersuchungsgruppen Vergleiche angestellt. In früheren Versuchen wurde nur das Viertel mit den meisten Neuriten eines jeden Explantats berücksichtigt. Ein statistischer Vergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden, so dass hier alle Neuriten Berücksichtigung fanden.

2.3.3 Bestimmung der Neuritenlänge

In vorangegangenen Arbeiten (Dazert et al., 1998; Aletsee et al., 2001 & 2002) wurden Auswertungsmethoden beschrieben, die auf der Messung der geraden Distanz von der Grenze des Explantats zu den Enden der Wachstumskegel basieren. Um auch die Längen nicht gerade wachsender Neuriten besser zu erfassen wurde eine Software entwickelt (Mlynski et al., 2002), geschrieben in der Programmieroberfläche Borland Delphi[®], die eine genauere Auswertung erlaubt. Da Neuriten mit all ihren Kurven und Biegungen mathematisch als Serie kurzer, gerader Linien beschrieben werden können, wurde jeder Neurit mit einer Computermaus abgefahren und als Serie kurzer, gerader Linien dargestellt, deren Summe einen Polygonzug ergibt, welcher dem gekrümmten Verlauf des jeweiligen Neuriten entspricht und so dessen Gesamtlänge abbildet. Auf diese Weise wurde die Länge aller Neuriten der Explantate bestimmt (siehe Abbildung 2-4).

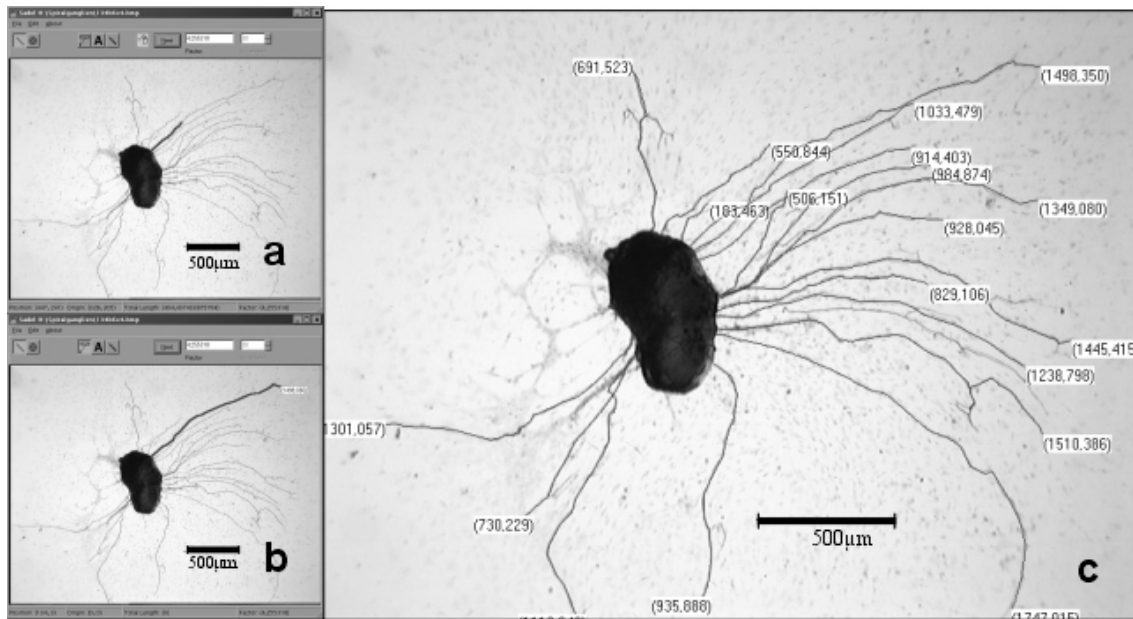


Abbildung 2-4: Bestimmung der Neuritenlänge. Um den gesamten Neuritenverlauf zu erfassen, wurden die einzelnen Neuriten in gerade Einzelstrecken unterteilt und mit der Computermaus abgefahren (a). Die Summe dieser Einzelstrecken ergibt die Gesamtlänge eines Neuriten (b). Ein komplett vermessenes Explantat ist in (c) dargestellt.

2.4 Statistik

Die Wahl der angewandten statistischen Tests war abhängig von den erhaltenen Daten. Ist die Voraussetzung der Normalverteilung nicht zu garantieren, wie dies oft bei kleinen Stichproben der Fall ist, kann man so genannte verteilungsfreie Varianzanalysen wie den Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben einsetzen (Guggenmoos-Holzmann et Wernecke, 1995). Dementsprechend werden zumeist die Medianwerte, sowie die 25%- und die 75%-Perzentile in Klammern angegeben. In den anderen Fällen wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der Vergleich und die statistische Auswertung der unterschiedlichen Gruppen erfolgte durch Kruskal-Wallis ANOVA (analysis of variance of groups) und bei paarweisem Vergleich mit der Dunn-Methode anhand des Programms Statview 5.0 (Fa. SAS, Cary, USA).

Allen Methoden wurde ein Signifikanzlevel von 0.05 im Vergleich zur Nullhypothese zu Grunde gelegt.

2.5 Elektronenmikroskopische Auswertung

Nach der Fixation wurden die Halbleiterplättchen mit den Präparaten aus der Kulturplatte genommen und die Explantate auf der Plastikoberfläche des Plattenbodens für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit einem Diamantbohrer aus der Platte herausgeschnitten. Um das Gewebe für die Elektronenmikroskopie vorzubereiten, verwendeten wir eine aufsteigende Ethanolreihe (50, 60, 70, 80, 90, 100%), gefolgt von einer 30minütigen Inkubation in Aceton (100%). Für die kritische Punkttrocknung benutzten wir eine CPD 030 (Bal-Tec Inc.). Die Untersuchungsmaterialien wurden zuerst für 30min in Hexamethyldisilazane (Sigma) in Ethanol (1:1), dann für 60min in reiner Hexamethyldisilazane inkubiert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend erfolgte die Beschichtung der Präparate mit Gold-Palladium (SCD 005, Bal-Tec Inc.). Zur Elektronenmikroskopie diente bei 20-10000facher Vergrößerung ein DSM 962 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena).

3. ERGEBNISSE

3.1 Zellkultur

3.1.1 Model zur Kultur von Nucleus cochlearis-Zellen

Die gewählten Techniken zur Gewinnung, Aufarbeitung und Zellkultur der Gewebe stellen einen geeigneten Versuchsaufbau dar, mit dem Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten von NC-Zellen gewonnen werden können. NC-Zellen erscheinen hierbei für den gewählten Untersuchungszeitraum von 96 Stunden, und auch darüber hinaus, überlebensfähig und zeigen dabei ein auswertbares Neuritenwachstum.

Der Versuch, mit den unter 2.1.3 beschriebenen Bedingungen auch NC-Zellen von adulten Tieren zu kultivieren und zu einem Neuritenwachstum anzuregen blieb dagegen erfolglos.

3.1.2 Kulturmedium

Zu Beginn der Untersuchungen zeigte sich, dass mit dem beschriebenen Spiralganglienzellkulturmedium kein geeignetes Medium vorlag, um Aussagen über das Wachstumsverhalten von NC-Zellen machen zu können. Bei keinem der zunächst mit SGZ-Kulturmedium ernährten Explantate (n=24) konnte ein lichtmikroskopisch detektierbares Neuritenwachstum nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen kristallisierte sich ein mit B27-Supplement angereichertes Neurobasalmedium als geeignetes Kulturmedium heraus. Hier ergaben die Vorversuche ein verwertbares Neuritenwachstum. Der Zusatz von Glutamax zeigte im gewählten Untersuchungszeitraum ebenso keinen signifikanten Unterschied in der Neuritenausprossung, wie die Anreicherung des Kulturmediums mit NT-3, weshalb auf die Verwendung beider Substanzen in den folgenden Untersuchungen verzichtet wurde.

3.2 Lichtmikroskopie

Bei nachweisbarem Neuritenwachstum fand sich ein sehr ähnliches generelles Wachstumsmuster der Nervenfortsätze auf den verschiedenen Materialien und Oberflächenbeschaffenheiten. Die Neuriten zeigten ein radiäres Aussprossen vom Rand des NC-Explantats in die Peripherie. Mit zunehmender Distanz zum Explantat entwickelten sich die einzelnen Faszikel durch zahlreiche Verzweigungen zu immer dünneren Fasern (Abbildung 3-1).

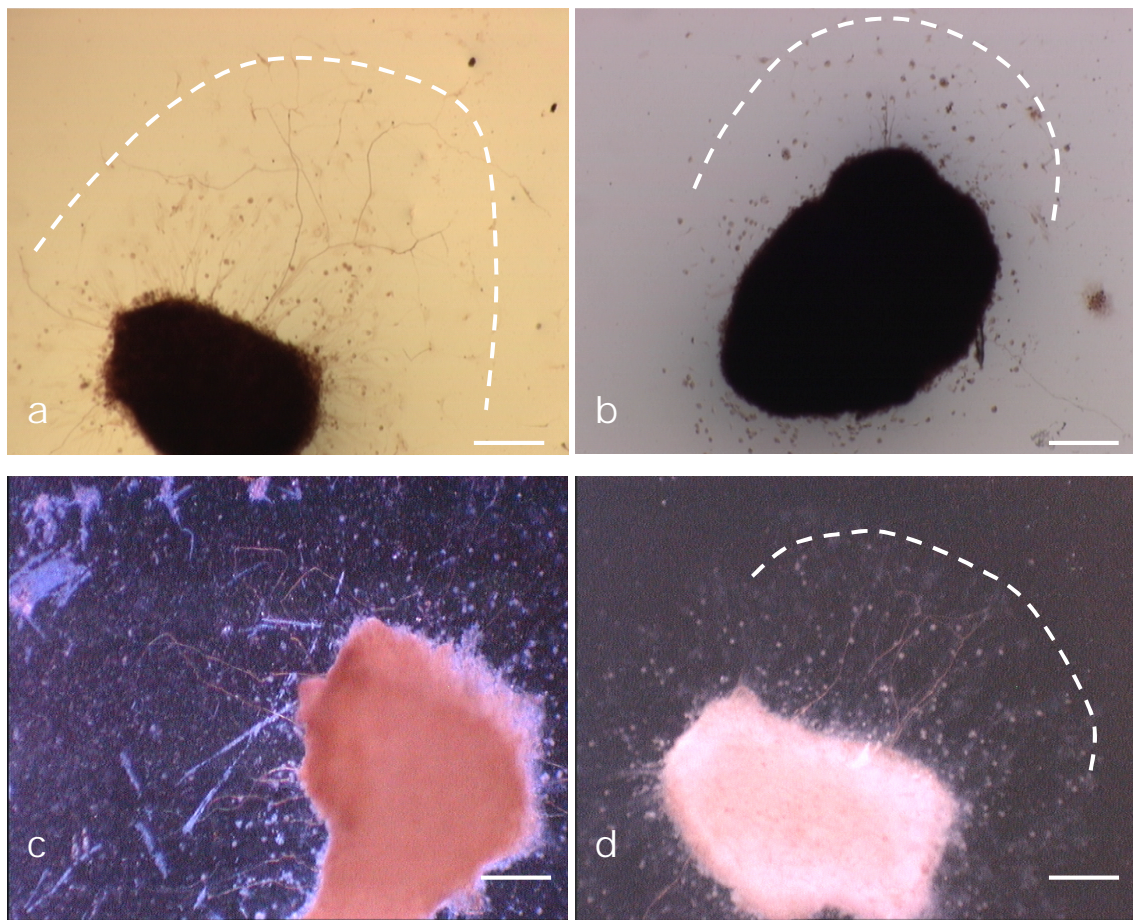


Abbildung 3-1: Lichtmikroskopische Betrachtung von NC-Explantaten. Typische NC-Explantate auf Plastik mit (a) und ohne Lamininbeschichtung (b), auf poliertem Silizium (c), sowie auf poliertem Si_3N_4 kultiviert (d). Laminin stimuliert das Längenwachstum genauso wie die Ausdehnung nicht-neuronaler Zellen (gestrichelte, weiße Linien). (Balken=100µm)

3.2.1 Einfluss der Oberflächenbehandlung

Auf unpolierten Oberflächen konnte sowohl bei Si_3N_4 als auch bei Si kein Neuritenwachstum beobachtet werden. Die NC-Explantate hefteten zwar zum großen Teil zusammen mit Fibroblasten auf den unpolierten Oberflächen an, jedoch konnten bei keinem der Präparate mit oder ohne Lamininbeschichtung (n=93) Neuritenfortsätze detektiert werden. Im Weiteren sind deshalb bzgl. Neuritenanzahl und -länge nur Vergleiche polierter Halbleitermaterialien mit den Kontrollgruppen aufgeführt.

3.2.2 Überlebensrate der Nucleus cochlearis-Explantate

Die höchste Überlebensrate, definiert als das Verhältnis der angewachsenen Explantate mit detektierbarem Neuritenwachstum im Vergleich zur Gesamtzahl der Explantate einer jeweiligen Gruppe, ergab sich mit 84% auf der mit Laminin beschichteten Plastikoberfläche der Kulturschalen im Vergleich zu 32% ohne Beschichtung. Bei Si_3N_4 lag diese Rate bei 59% auf der beschichteten Oberfläche und bei 61% ohne Beschichtung mit Laminin. Auf unbeschichtetem Si zeigte sich mit 61% eine höhere Überlebensrate als auf dem gleichen beschichteten Material (38%, Abbildung 3-2).

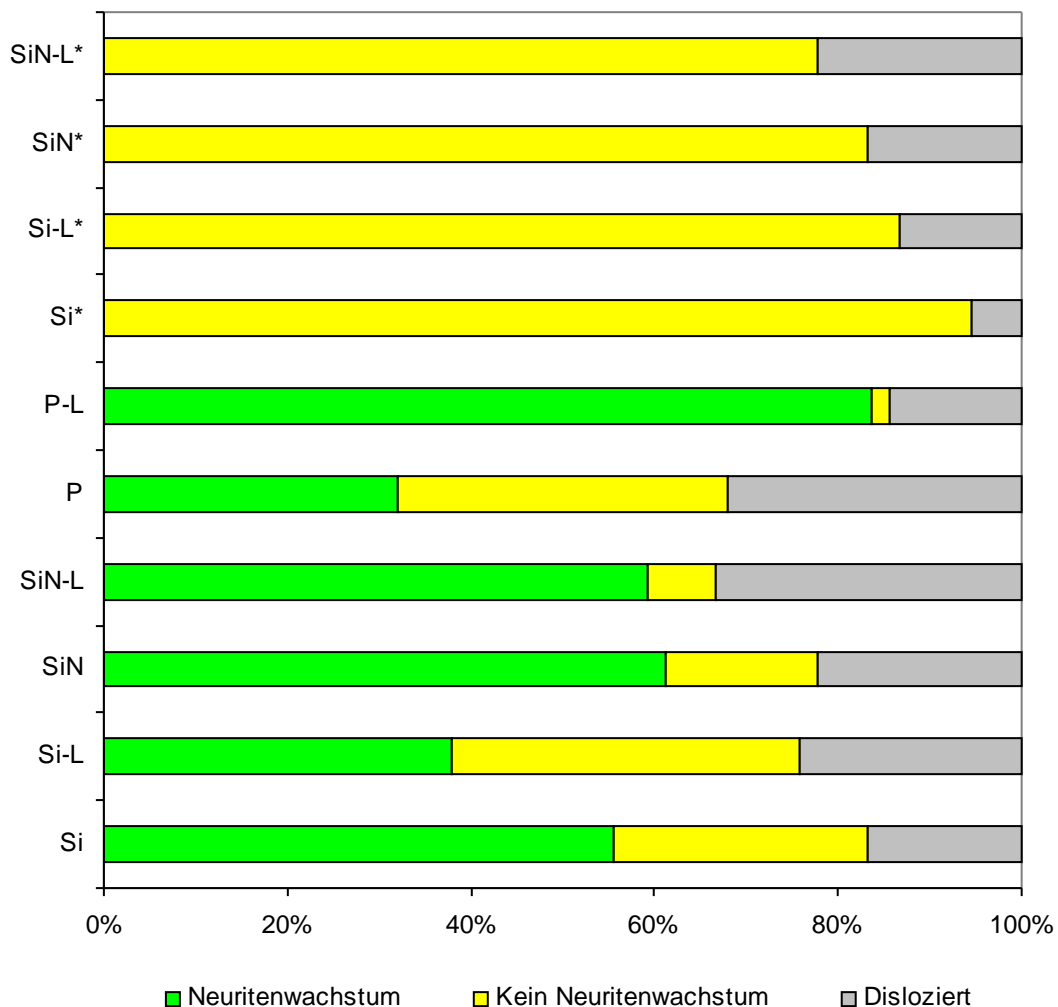


Abbildung 3-2: Überlebensraten der Nucleus cochlearis Explantate auf den verschiedenen Materialien. Auf keinem der unpolierten Materialien (*) –mit und ohne Laminin Beschichtung- konnte ein Neuritenwachstum beobachtet werden, wobei hier die Adhäsion und damit das alleinige Anwachsen größer ist als in den anderen Gruppen. Die höchste Überlebensrate, definiert als angewachsene Explantate mit detektierbarem Neuritenwachstum im Vergleich zur Gesamtzahl der Explantate, zeigte sich auf der laminierten Plastikoberfläche. Auf Plastik zeigte sich auch einzig ein signifikanter Unterschied zwischen Laminin beschichteter Oberfläche und unbehandelter Oberfläche (*=unpoliertes Material, L=Laminin, P=Plastikoberfläche, Si=Silizium, SiN= Si_3N_4).

3.2.3 Neuritenanzahl

Der Median der Neuritenanzahl pro Explantat lag in der Kontrollgruppe bei 10 Neuriten mit Lamininbeschichtung und 5 Neuriten je Explantat ohne diese Beschichtung. Bei Si betrug der Median 5 Neuriten pro Explantat in der mit Laminin beschichteten Gruppe, 4 Neuriten je Explantat in der unbeschichteten Gruppe. Bei Si_3N_4 lagen die Werte bei 5 Neuriten pro Explantat mit Beschichtung und 3 Neuriten ohne Beschichtung mit Laminin (Abbildung 3-3; Tabelle 3-1).

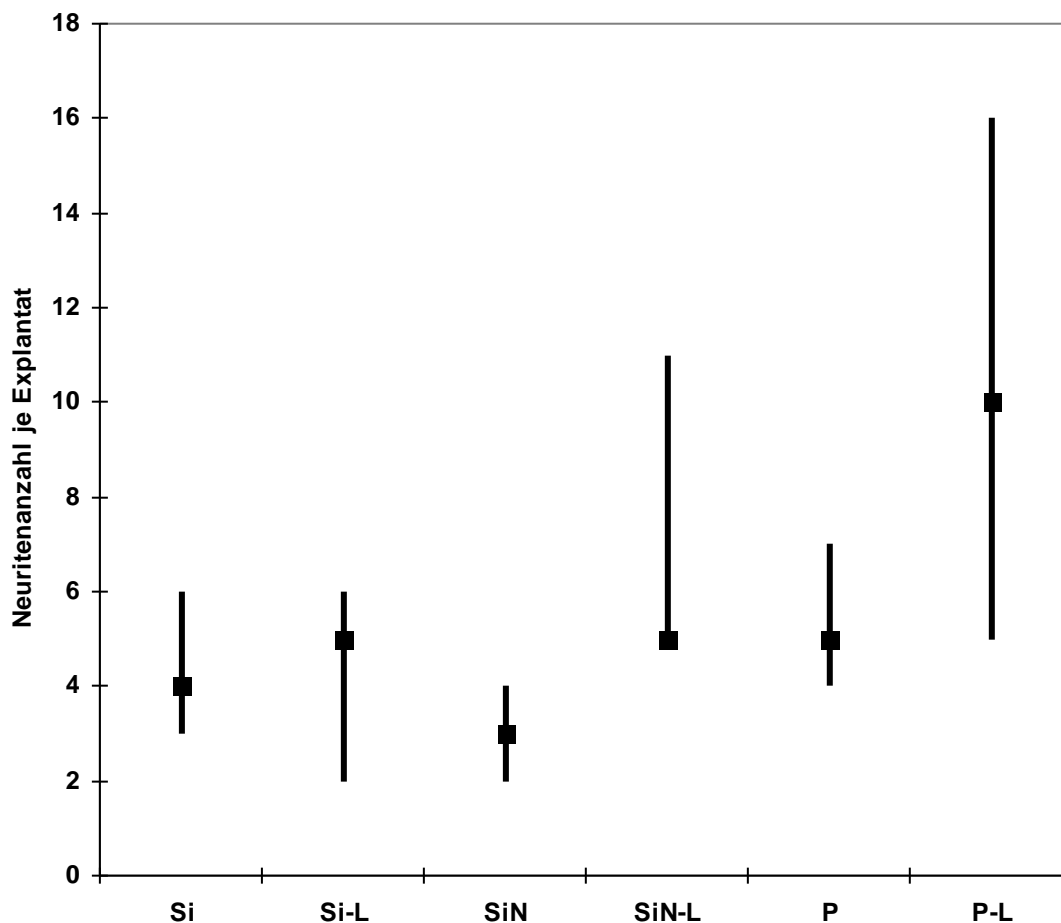


Abbildung 3-3: Neuritenanzahl je Explantat auf den verschiedenen Oberflächen. Dargestellt ist der Median der Neuritenlänge von Nucleus cochlearis Explantaten auf den untersuchten Materialien mit und ohne Laminin-Beschichtung. Das Quadrat stellt den Median der Neuritenanzahl dar, die Linien zeigen die 25% bzw. 75%-Quartile an (L=Laminin, Si=Silizium, SiN= Si_3N_4 , P=Plastikoberfläche).

Gruppe	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Si	7	4	2,25	6,25
Si-L	11	5	1,50	5,75
Si ₃ N ₄	11	3	1,25	4,00
Si ₃ N ₄ -L	11	5	4,25	10,75
P	15	5	3,25	6,75
P-L	41	10	5,00	16,00

Tabelle 3-1: Anzahl der Neuriten je Explantat auf den zu vergleichenden Materialien, jeweils mit und ohne Lamininbeschichtung. Der Unterschied der Median-Werte in den einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Bei paar weisem Vergleich der einzelnen Gruppen zueinander besteht für alle Vergleiche ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$, Dunn-Methode), mit Ausnahme des Vergleichs von Si₃N₄-L zu P-L: zwischen diesen beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

3.2.4 Neuritenlänge

Der Median der Neuritenlänge betrug in der Kontrollgruppe 209 μm mit Lamininbeschichtung und 96 μm ohne Beschichtung. Auf lamininbeschichtetem Si_3N_4 lies sich die größte Neuritenlänge erzielen, der Median lag hier bei 236 μm und zeigte einen signifikanten Unterschied zur lamininbeschichteten Plastikoberfläche der Kontrollen. Bei unbeschichtetem Si_3N_4 betrug der Median 162 μm , auf laminiertem Si lag er bei 195 μm und auf nicht beschichtetem Si bei 109 μm (Abbildung 3-4, Tabelle 3-2).

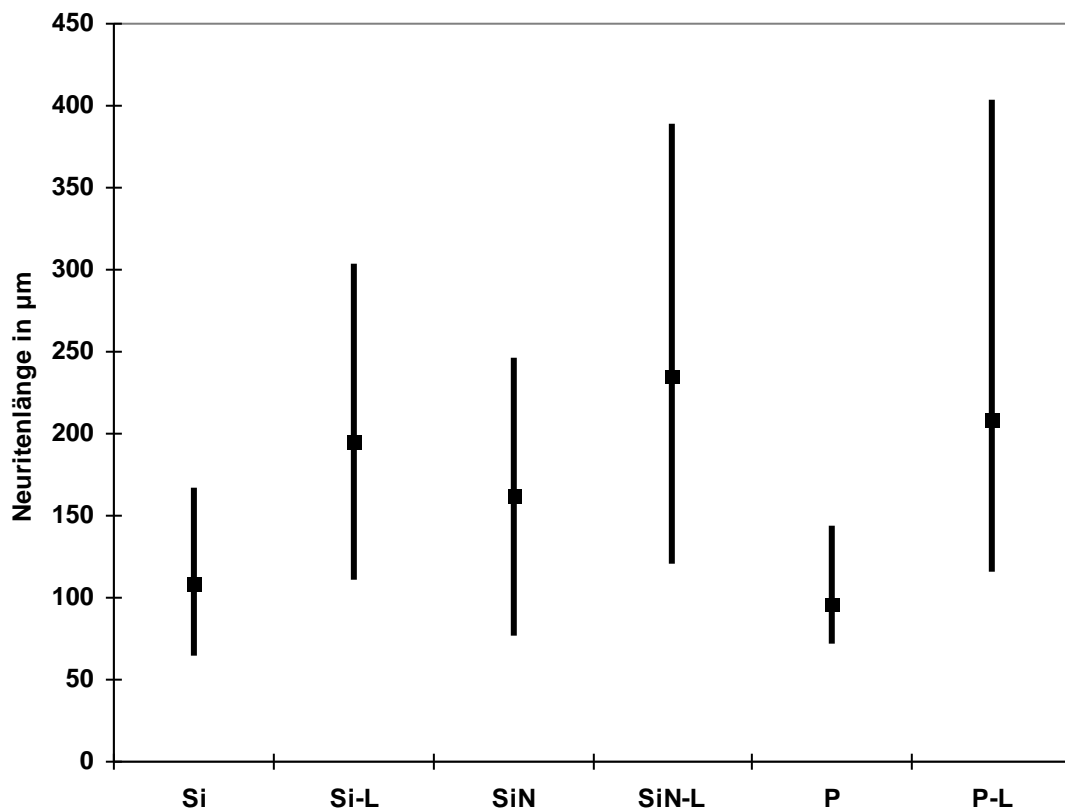


Abbildung 3-4: Neuritenlänge auf den verschiedenen Oberflächen. Dargestellt ist der Median der Neuritenlänge in μm auf den untersuchten Oberflächen. Hierbei zeigt sich auf allen Materialien nach Laminin-Beschichtung eine signifikant größere Länge im Vergleich zu dem unbeschichteten Material. Insgesamt zeigt sich die signifikant größte Neuritenlänge auf laminiertem Si_3N_4 im Vergleich zu Laminin beschichtetem Silizium bzw. der Laminin beschichteten Plastikoberfläche der Kulturschale. Das Quadrat stellt den Median der Neuritenlänge dar, die Linien zeigen die 25% bzw. 75%-Quartile an (L=Laminin, Si=Silizium, SiN= Si_3N_4 , P=Plastikoberfläche).

Gruppe	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Si	34	109	64	167
Si-L	51	195	111	304
Si ₃ N ₄	34	162	77	247
Si ₃ N ₄ -L	83	236	121	389
P	47	96	72	143
P-L	468	209	116	404

Tabelle 3-2: Neuritenlänge auf den zu vergleichenden Materialien, jeweils mit und ohne Lamininbeschichtung. Der Unterschied der Median-Werte in den einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Bei paarweisem Vergleich der einzelnen Gruppen zueinander besteht für alle Vergleiche ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$, Dunn-Methode), insbesondere gilt dies für den jeweiligen Vergleich der einzelnen Materialien mit und ohne Lamininbeschichtung.

3.3 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse bezüglich der Neuritenanzahl und -länge, die unter geringeren Vergrößerungen lichtmikroskopisch beschrieben wurden. Zusätzlich konnten durch die höheren Vergrößerungen bei der Elektronenmikroskopie weitere Aspekte des Wachstumsverhaltens genauer betrachtet werden. Es ließen sich beispielsweise einzelne Neuriten, deren Verhalten und Beziehung zur Umgebung besser darstellen (Abbildung 3-5b). Neuriten konnten in die Peripherie verfolgt und deren Aufteilung in kleinere Faszikel oder einzelne Nervenfasern beobachtet werden. Einzelne Neuriten wuchsen dicht nebeneinander, divergierten und kamen danach zum Teil wieder zusammen. Selten konnten auch sich überkreuzende Nervenfasern dargestellt werden (Abbildung 3-6). Von besonderer Bedeutung war bei diesen Beobachtungen, im Hinblick auf die Beeinflussbarkeit und die gezielte Steuerbarkeit des Neuritenwachstums, neben dem Verhalten von Neuriten an mechanischen Hindernissen wie Vertiefungen oder Erhabenheiten (Abbildung 3-7), der Mechanismus des Anhaftens der Neuriten an der Oberfläche (Abbildung 3-5a). Hierbei zeigte sich, dass Neuriten Vertiefungen bis zu einer bestimmten Ausdehnung überwinden können, indem sie nicht-neuronale Zellen als Wachstumsmatrix verwendeten. Wie in der Literatur für andere neuronale Gewebe beschrieben, wachsen auch die NC-Neuriten in enger Beziehung zu nicht-neuronalen Zellen verschiedenen Typs, die über Ausläufer sowohl untereinander als auch mit den Neuriten in Kontakt stehen (Abbildung 3-5a), wodurch die Neuriten selbst an diesen Zellen oder deren Ausläufern zu haften scheinen.

Auf elektronenmikroskopischer Ebene stellt sich auch der deutliche Unterschied in der Oberflächenbeschaffenheit zwischen poliertem und unpoliertem Halbleitermaterial dar (Abbildung 2-2). Bei der unpolierten Abbildung zeigt sich die Kristallstruktur der Halbleiter, die bei Si_3N_4 feiner ist als bei reinem Silizium (Abbildung 2-2d).

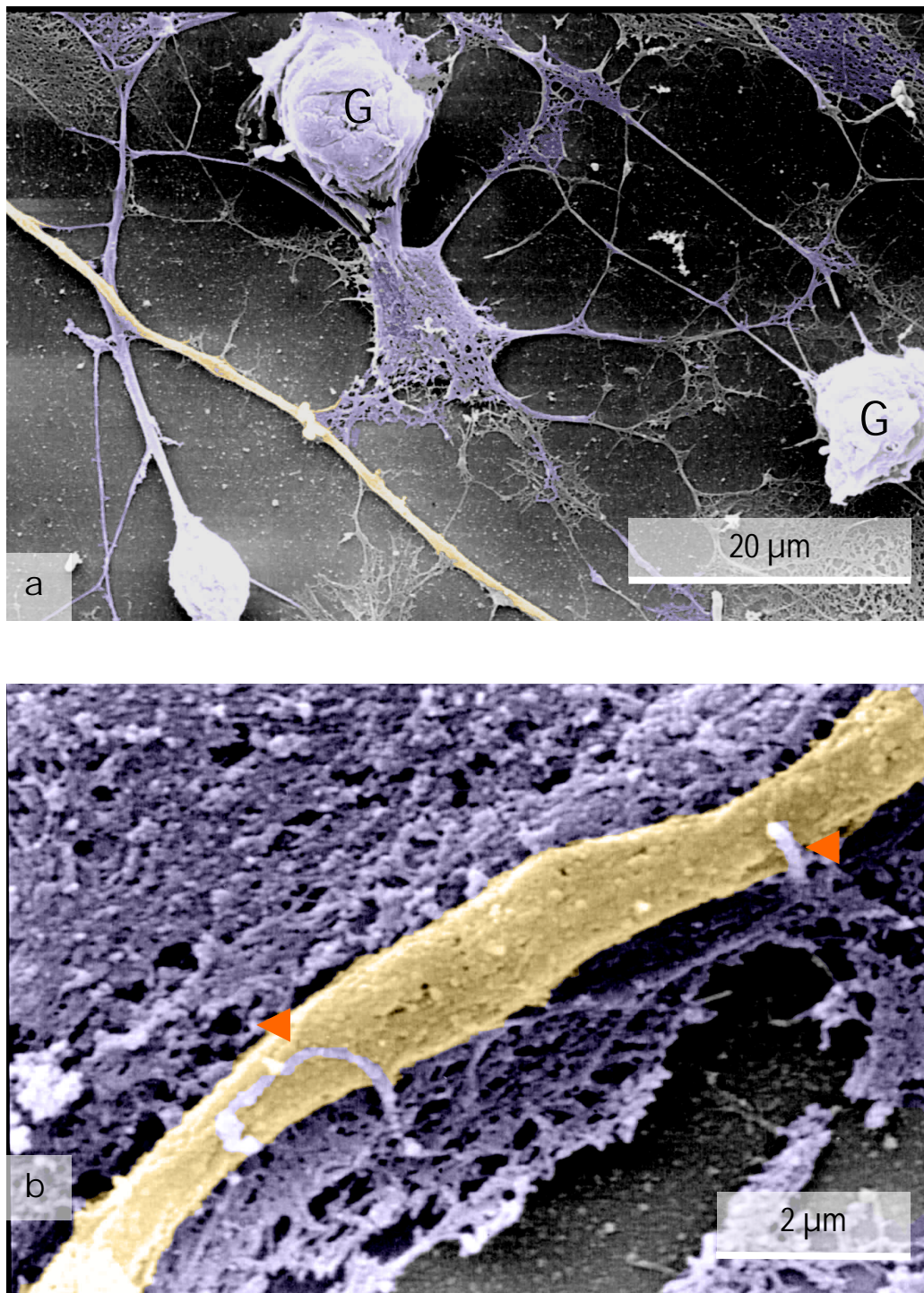


Abbildung 3-5: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Bilder von NC-Explantaten. REM eines Neuriten (2000xVergrößerung) auf Si_3N_4 entlang von nicht-neuronalen Zellen (G) gewachsen (a). REM eines einzelnen Neuriten (10000xVergrößerung) der durch nicht-zelluläres Material (Pfeilspitzen) mit der Oberfläche verbunden ist (b). Die Abbildungen sind zur besseren Anschauung mit CorelDRAW[®] 6.0 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) coloriert.

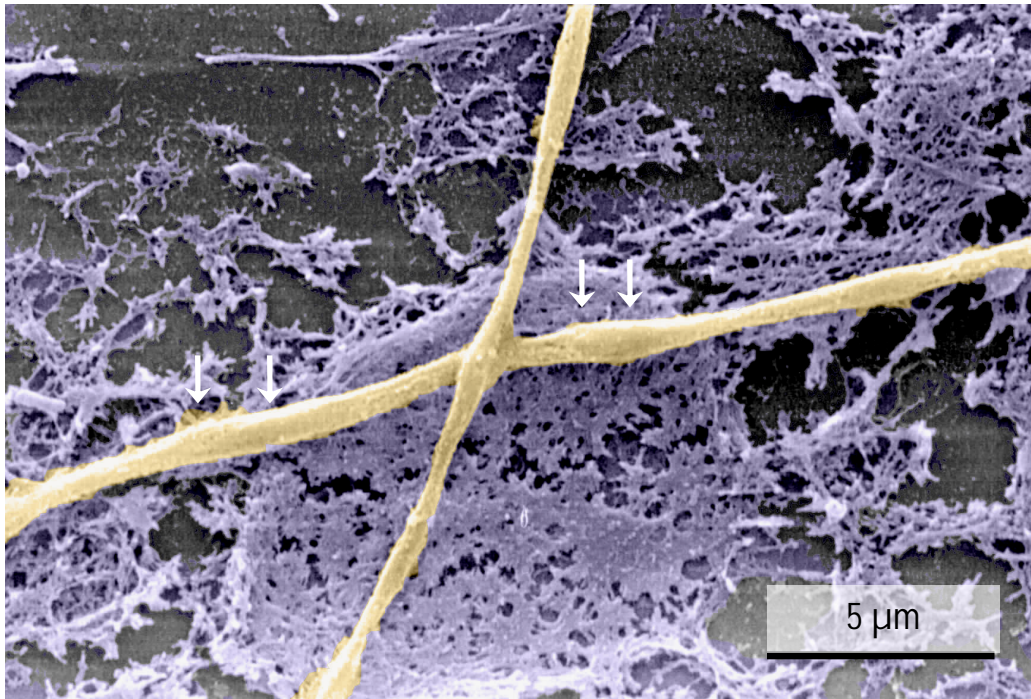


Abbildung 3-6: REM Bild (5000xVergrößerung) zweier unabhängiger, auf Silizium gewachsener Neuriten die sich auf flachen Zellausläufern kreuzen. Deutlich sind hier auch die für Neuriten typischen Kalibersprünge zu erkennen (Pfeile).

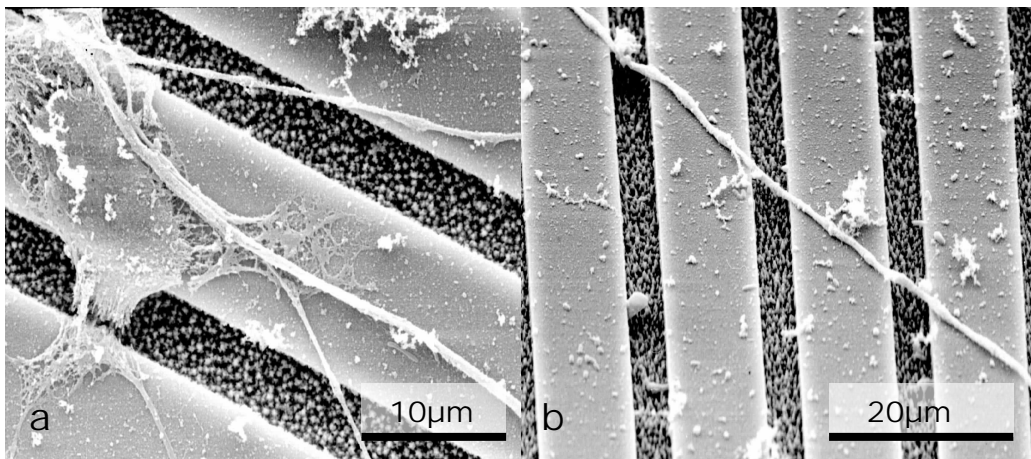


Abbildung 3-7: REM Bilder zur Darstellung des Verhaltens einzelner Neuriten gegenüber lithographisch eingebrachten Vertiefungen auf Silizium. Neuriten sind in der Lage mechanische Hindernisse bis zu einer gewissen Größe und Ausdehnung zu überwinden (a: 3000xVergrößerung, b: 2000xVergrößerung).

4. DISKUSSION

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte eine Versuchsanordnung etabliert werden, die es ermöglichte, Nucleus cochlearis-Zellen neugeborener Ratten zu präparieren, aufzuarbeiten und zu kultivieren sowie deren qualitatives und quantitatives Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kultur von NC-Zellen auf den untersuchten Halbleitermaterialien prinzipiell möglich ist. Dabei haben die Oberflächenbehandlung, die Beschichtung mit Laminin und das Material selbst einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der NC-Zellen. Unter den untersuchten Halbleitermaterialien mit den verschiedenen Versuchsparametern wies poliertes, mit Laminin beschichtetes Si_3N_4 hinsichtlich der Überlebensrate und des Neuritenwachstums die günstigste Biokompatibilität auf. Bei den beiden untersuchten Halbleitermaterialien zeigte sich zwar auf den unpolierten Oberflächen eine höhere Adhäsionsrate und ein damit verbundenes Anwachsen der NC-Explantate als auf polierter Oberfläche, doch war gleichzeitig kein auswertbares Neuritenwachstum feststellbar. Die vor allem durch die Kristallstruktur der Halbleiter hervorgerufene Rauheit der Oberfläche scheint somit für das Anhaften der Explantate gute Bedingungen darzustellen. Die Explantate können zusammen mit nicht-neuronalen Zellen anscheinend gut an den rauen Oberflächenstrukturen anhaften, was zu dem guten Anwachsen führte. Jedoch scheinen die dann vorgefundenen Gegebenheiten für das Aussprossen von Neuriten eher ungeeignet. Dies lässt sich vielleicht durch das allgemeine Wachstumsmuster von Neuriten erklären. Hierbei wachsen am sogenannten Wachstumskegel der Neuritenspitze Filopodien aus. Diesen scheint die Möglichkeit, mechanische Hindernisse oder Unebenheiten überwinden zu können nicht in dem Maße gegeben zu sein wie es auf der unpolierten Oberfläche nötig wäre.

Eine der Hauptaufgaben dieser Untersuchung bestand in der Etablierung eines serumfreien Mediums zur Kultur von NC-Explantaten. Kulturmedien unter

Zusatz von fetalen Seren sind für viele Fragestellungen ungeeignet, insbesondere wenn die Effekte von Wachstumsfaktoren oder anderen Proteinen auf das Überleben und die Neuritenaussprossung von Nervenzellen untersucht werden sollen. Das Vorhandensein der genannten Faktoren in fetalen Seren stellt unter Umständen eine nur schwer kalkulierbare Fehlerquelle dar. Um dies zu vermeiden und in zukünftigen Versuchen mit definierten Kulturmedien arbeiten zu können, wurden hierfür zwei kommerziell verfügbare Ansätze serumfreier Medien miteinander verglichen. Zum einen das bereits beschriebene Spiralganglienzellkulturmedium ergänzt mit N2-Supplement, das ursprünglich für eine Neuroblastomzellreihe entwickelt wurde (Bottenstein et Sato, 1979) und auf der anderen Seite das mit B27 angereicherte Neurobasalmedium wie es von Brewer et al. (1993 & 1994) für Untersuchungen zur Entwicklung neuronalen Gewebes vorgeschlagen und erfolgreich eingesetzt wurde. Unsere Ergebnisse bestätigten die Resultate von Fitzakerley et al. (1997), dass in Abwesenheit von Serum das Neurobasalmedium/B27-System adäquate Wachstumsbedingungen für NC-Zellen bietet. Im Gegensatz zu den vielfältigen Experimenten zur Neuritogenese von Spiralganglienzellkulturen postnataler Ratten (Dazert et al., 1998; Aletsee et al., 2002; Brors et al., 2002) zeigte sich in den hier durchgeführten Versuchen mit N2-Medium ein nicht verwertbares Überleben der NC-Zellen. Diese Daten bestätigen die Resultate mit Kulturen von embryonalen Hippokampuszellen und kortikalen Neuronen in diesem Medium (Aizenman et de Vellis, 1987). In Reinkulturen neuronaler Zellen wurde durch Fitzakerley (1997) postuliert, dass in Neurobasalmedium das Gelingen dieser Versuche mehr von dem Entnahmezeitpunkt und somit dem Alter der Zellen abhängt als von der spezifischen Zusammensetzung des Kulturmediums selbst. Weiterhin wird dort bei Mischkulturen, wie in den vorliegenden Untersuchungen, auf die Problematik des Vorhandenseins von nicht neuronalen Zellen bei der Untersuchung von Wachstumsfaktoren, Hormonen etc. hingewiesen. Gliazellen stehen mit den neuronalen Zellen in Konkurrenz um trophische Substanzen, genauso wie deren Versorgung durch Gliazellen beschrieben ist. Vor allem in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kommt

die Bedeutung dieser nicht-neuronalen Zellen für das Neuritenwachstum und die Haftung der Neurone an der Oberfläche zur Darstellung. Hier scheinen vor allem Fibroblasten (Dazert et al., 1998) und Gliazellen eine bedeutende Stellung einzunehmen, weswegen die Verwendung von Kulturmedien, die deren Wachstum gezielt unterdrücken, hinsichtlich des Neuritenwachstums sicher genauer hinterfragt werden muss.

Die durchgeführte Kulturdauer von 96 Stunden ist von ausreichender Länge, da anatomische Studien gezeigt haben, dass der Großteil des Neuritenwachstums 48 Stunden nach Kulturbeginn nahezu abgeschlossen ist (Stichel et Muller, 1991; Neale et al., 1993).

Der Einfluss des Extrazellulärmatrixproteins Laminin auf das Wachstumsverhalten von NC-Neuronen war ein weiterer zu untersuchender Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Substanzen der Extrazellulärmatrix sind als wichtige Faktoren zur Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in morphologisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen (Lochter et al., 1995) bekannt. Im Gegensatz zu Retinagewebe, in dem Laminin keine Stimulation des Neuritenwachstums induzierte (Kleitman et al., 1988), konnte der positive Einfluss von Laminin auf das Neuritenwachstum für verschiedene Zelltypen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (Lander, 1987). Das ECM-Protein Fibronectin soll selektiv das Wachstum von Dendriten im Vergleich zu Axonen stimulieren (Chamak et Prochiantz, 1989). In Experimenten mit Einzelzellen des NC von Mäusen fand Fitzakerley (2001) auf Laminin beschichteten Oberflächen signifikant geringere Dichten überlebender Zellen im Vergleich zu einer Poly-D-Lysin-Beschichtung sowie signifikant kürzere Neuriten. Im Gegensatz dazu zeigen die hier vorgelegten Ergebnissen einen positiven Effekt der Lamininbeschichtung auf die Neuritenaussprossung der NC-Explantate. Diese Unterschiede könnten sowohl durch die Art der Zellkultur (Einzelzellkultur im Vergleich zu der hier vorliegenden Kultur von NC-Explantaten) als auch durch den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkt des NC (postnataler Tag 4 (P4) im Vergleich zu P10 hier) bedingt sein. Insgesamt

scheint die Kultur vielzelliger Explantate einen positiven Effekt auf die Neuritenelongation zu bewirken, da die auswachsenden Neuriten die Fibroblasten und Gliazellen als Matrix benutzen. Weiterhin ist zu bedenken, dass für unterschiedliche Arten und Isoformen von Laminin verschiedene Effekte auf neuronale Zellen nachgewiesen wurden (Frade et al., 1996). Allerdings fand sowohl bei Fitzakerley (2001) als auch in unseren Experimenten Laminin-1, das aus Sarkomzellen gewonnen wird, Verwendung. All dies muss unter Berücksichtigung des fehlenden Nachweises einer Laminin-1-Expression in NC-Zellen vor Tag P10 (Varghese, 2000) betrachtet werden.

In den kommenden Jahren und Jahrzehnten wird es auch in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde ein großes Interesse an neuen Entwicklungen der Neuroelektronik, die sich mit der Interaktion von Nervenzellen und Mikrochips beschäftigt, geben. Zunächst werden vor allem grundlegende Eigenschaften und Bedingungen erforscht werden müssen, die dann später zu einer klinischen Anwendung und zur Weiterentwicklung und Verbesserung von Cochlea- oder Hirnstammimplantaten gelangen könnten. So wäre durch eine weitere Miniaturisierung solcher Implantate eine Verkleinerung des Abstandes zwischen Reiz- und Referenzelektrode denkbar, was möglicherweise zur Erregung kleinerer Zellgruppen und damit einer selektiveren Weiterleitung der elektrisch umgewandelten Schallereignisse führen sollte. Auch die elektrotechnischen Vorteile eines Siliziumleiters, wie zum Beispiel der schnelle Spannungsabfall könnten zu einer besseren zeitlichen Auflösung und Weiterleitung der im Sprachprozessor erzeugten Impulse führen.

Der heutige Entwicklungsstand ist von einer solchen Anwendung jedoch noch weit entfernt. Der erste funktionierende elektrische und nichtinvasive Schaltkreis, der aus einer Verbindung zwischen Nervenzellen und einem Silizium-Mikrochip besteht wurde 2001 beschrieben (Zeck et Fromherz, 2001). Dabei wurden Nervenzellen der Teichschnecke (*Lymnaea stagnalis*) auf einem Siliziumchip platziert und nach Auswachsen von Zellfortsätzen sowohl zwischen den Neuronen selbst als auch zwischen den Neuronen und den Mikrochips unter

anderem eine nichtinvasive Signaltransduktion von einem Mikrochip über zwei immobilisierte Nervenzellen zu einem anderen Mikrochip erzielt. Dabei ist es gelungen, einem der Hauptprobleme bei dem Versuch einer Verbindung von lebendem Gewebe und inerter Technik herzustellen, nämlich der Bewegung der Nervenzellen nach Ausbildung von synaptischen Verbindungen untereinander, entgegenzuwirken. Durch „Einzäunung“ und der damit verbundenen Immobilisation der Einzelzellen war mit der Entwicklung eines Schaltkreises unter Einbezug von Nervenzellen und Halbleitermaterial einer der Grundsteine auf dem Gebiet der Neuroelektronik gelegt. Seitdem sind verschiedene Arbeiten zu diesem Thema erschienen, die sich vor allem mit synaptischen Verbindungen von Nervenzelle und Mikrochip (Birmingham et al., 2004; Kaul et al., 2004), sowie mit der Reizaufnahme und der Nervenzellstimulation beschäftigen (Fromherz, 2002). Die Schnittstelle dieser Verbindung liegt dabei zwischen der präsynaptischen Membran der Zelle und der leitenden Oberfläche des verwendeten Halbleitermaterials. Wegen der Notwendigkeit, neuronale Elemente im Mikrometerbereich zu konstruieren, prägte Rutten (2002) den Begriff der Neurotechnologie als Teilgebiet der Mikroelektronik, während er mit Gedanken zu Elektrodendesigns eine Überleitung zu ersten medizinischen Anwendungen findet. Weitere, teilweise bereits eingesetzte klinische Anwendungen finden hierbei in der Biosensorik, beispielsweise zur Testung toxischer oder pharmakologischer Substanzen auf Nervenzellen oder der Wiederverbindung durchtrennter Nervenstrukturen, statt (Pearson, 2001).

Um eine klinische Anwendung solcher Techniken, beispielsweise im Zusammenhang mit implantierbaren Hörsystemen, zu ermöglichen, sind weitere grundlegende Kenntnisse erforderlich. Ein wesentlicher Gesichtspunkt sollte hierbei vor allem die Möglichkeit einer gezielten Beeinflussung des Neuritenwachstums zu definierten „Kontaktstellen“ sein. Eine derartige Steuerung oder Lenkung der Wachstumsrichtung von Neuriten ist, wie in einigen Versuchen mit strukturierten Oberflächen angedeutet, beispielsweise durch mechanische Gegebenheiten wie Vertiefungen, Rillen oder Ähnliches

denkbar. Eine andere Möglichkeit stellt die selektive Beschichtung von definierten Teilen der Oberflächen auf denen Neuriten wachsen sollen, beispielsweise mit Extrazellulärmatrixproteinen wie dem Laminin dar. Grenzen, die von Neuriten nicht überschritten werden sollen, könnten durch Substanzen die einen gegenteiligen Effekt haben, definiert werden. Auch verschiedene Applikationsformen von Wachstumsfaktoren, zusätzlich in auf- oder absteigenden Konzentrationen, könnten eine gezielte Steuerbarkeit des Neuritenwachstums unterstützen. Weitere Schritte zur klinischen Anwendung könnten die Kultur adulter auditorischer Neurone und das Verhalten solcher Zellen gegenüber elektrischer Stimulation sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit einer fortgeschrittenen sensorineuralen Schwerhörigkeit oder Taubheit können von der Versorgung mit implantierbaren Hörsystemen, wie dem Cochlea-Implantat (CI) oder dem Hirnstammimplantat (ABI=auditory brainstem implant), profitieren. Hierbei werden Höreindrücke unter Umgehung der Cochlea durch direkte elektrische Stimulation auditorischer Neurone erzeugt. Eine günstigere „bioelektronische“ Ankopplung solcher Systeme könnte zukünftig zu einer weiteren Verbesserung der Hörqualität führen. Zielsetzung dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten und die Beeinflussbarkeit von Nucleus cochlearis(NC)-Explantaten auf verschiedenen Halbleitermaterialien zu gewinnen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden NC-Explantate von 10 Tage alten Raten für 96 Stunden in Neurobasalmedium auf den beiden Halbleitermaterialien Silizium (Si) und Siliziumnitrid (Si_3N_4), jeweils mit verschiedenen Oberflächenbehandlungen und der Beschichtung mit Extrazellulärmatrixproteinen durchgeführt. Dabei wurde nach immunhistochemischer Färbung der Neuriten die Überlebensrate der NC-Explantate, die Neuritenanzahl pro Explantat und die Neuritenlänge in den unterschiedlichen Gruppen bestimmt. Des Weiteren sollten durch elektronenmikroskopische Betrachtung nähere Details über die Wechselwirkung der Neuriten mit ihrer biologischen und alloplastischen Umgebung beobachtet werden.

Auf unpolierten Halbleitermaterialien konnte zwar ein gutes Anwachsen, aber keine Neuritenelongation beobachtet werden, weder auf Si noch auf Si_3N_4 . Von den untersuchten Gruppen zeigte poliertes und mit Laminin beschichtetes Si_3N_4 bezüglich Neuritenlänge und -anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe die beste Biokompatibilität. Unter diesen Bedingungen erreichten die Neuriten eine

durchschnittliche Länge von 236 μ m und waren damit signifikant länger als in allen Vergleichsgruppen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Zellkultur von NC-Explantaten auf Halbleitermaterialien prinzipiell möglich ist. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, die Neuritenlänge und –anzahl betreffend, deuten auf eine Beeinflussung des Wachstums von NC-Explantaten durch das verwendete Material, die Oberflächenbeschaffenheit und –beschichtung mit Extrazellulärmatrixproteinen hin. Für weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet mit dem Ziel der engen Adaptation von auditorischen Neuronen und Mikrochipsystemen bietet sich somit poliertes und mit Laminin beschichtetes Si₃N₄ an. Durch implantierbare Mikrochiptechnologie und deren Einbindung in neuronale Netzwerke, beispielsweise im Hirnstamm, könnte eine Verbesserung der Hörrehabilitation bei ertaubten Patienten erwartet werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aizenman, Y., Vellis, J. de (1987) Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res.* 406(1-2): 32-42
- Aletsee, C., Mullen, L., Kim, D., Pak, K., Brors, D., Dazert, S., Ryan, A.F. (2001) The disintegrin kistrin inhibits neurite extension from spiral ganglion explants cultured on laminin. *Audiol. Neurootol.* 6(2): 57-65
- Aletsee, C., Beros, A., Mullen, L., Palacios, S., Pak, K., Dazert, S., Ryan, A.F. (2001a) Ras/MEK but not p38 signalling mediates NT-3-induced neurite extension from spiral ganglion neurons. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2(4): 377-387
- Aletsee, C., Brors, D., Mlynski, R., Ryan, A.F., Dazert, S. (2002) Wortmannin, ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase, beeinflusst das neurotrophin-induzierte Wachstum von Spiralganglienneuriten. *Laryngo-Rhino-Otol.* 81(3): 189-195
- Aletsee, C., Brors, D., Mlynski, R., Ryan, A.F., Dazert, S. (2003) Branching of spiral ganglion neurites is induced by focal application of fibroblast growth factor-1. *Laryngoscope* 113(5): 791-796
- Arnold, W., Ganzer, U. (1999): Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Arts, H.A., Jones, D.A., Anderson, D.J. (2003) Prosthetic stimulation of the auditory system with intraneural electrodes. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* 191(10): 20-25
- Ashmore, J.F., Chambard, J.-M., Richmond, S. (2002) Cochlear transduction: from models to molecules and back again. *Audiol. Neurootol.* 7(1): 6-8

-
- Ashmore, J.F., Gale, J. (2004) The cochlear amplifier. *Curr. Biol.* 14(11): 403-404
- Badi, A.N., Kertesz, T.R., Gurgel, R.K., Shelton, C., Normann, R.A. (2003) Development of a novel eight-nerve intraneural auditory neuroprosthesis. *Laryngoscope* 113(5): 833-842
- Becker, W., Naumann, H.H., Pfaltz, C.R. (1994): *Ear, Nose, and Throat Diseases*. 2nd edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Békésy, G. v. (1960) *Experiments in Hearing*. McGraw Hill, New York
- Birmingham, J.T., Graham, D.M., Tauck, D.L. (2004) *Lymnaea stagnalis* and the development of neuroelectronic technologies. *J. Neurosci. Res.* 76(3): 277-281
- Bjare, U. (1992) Serum-free cell culture. *Pharmacol. Ther.* 53(3): 355-374
- Boenninghaus, H.-G., Lenarz, T. (1996): *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Studierende der Medizin*. 10. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bottenstein, J.E., Sato, G.H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(1): 514-517
- Brackmann, D.E. (1976) The cochlear implant; basic principles. *Laryngoscope* 86(3): 373-388
- Brackmann, D.E., Hitselberger, W.E., Nelson, R.A., Moore, J., Waring, M.D., Pertillo, F., Shennon, R.V., Telischi, F.F. (1993) Auditory brainstem implant: I. Issues in surgical implantation. *Otolaryngol. Head and Neck Surg.* 108(6): 624-633
- Brawer, J.R., Morest, D.K., Kane, E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 155(3): 251-300

-
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35(5): 567-576
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J. (1994) Neurobasal medium/B27 supplement: A new serum-free medium combination for survival of neurons. *Focus* 16: 6-9
- Brors, D., Aletsee, C., Schwager, K., Mlynski, R., Hansen, S., Schäfers, M., Ryan, A.F., Dazert, S. (2002) Interaction of spiral ganglion neuron processes with alloplastic materials in vitro (1). *Hear. Res.* 167(1-2): 110-121
- Brors, D., Bodmer, D., Pak, K., Aletsee, C., Schäfers, M., Dazert, S., Ryan, A.F. (2003) EphA4 provides repulsive signals to developing cochlear ganglion neurites mediated through ephrin-B2 and -B3. *J. Comp. Neurol.* 462(1): 90-100
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., Ribaupierre, Y. de (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227(4683): 194-196
- Chamak, B., Prochiantz, A. (1989) Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development* 106(3): 483-491
- Chao, M.V. (1992) Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9(4): 583-593
- Colletti, V., Carner, M., Miorelli, V., Guida, M., Colletti, L., Fiorino, F. (2004) Cochlear implant failure: is an auditory brainstem implant the answer? *Acta. Otolaryngol.* 124(4): 353-357
- Dallos, P., Evans, B.N. (1995) High-frequency motility of outer hair cells and the cochlear amplifier. *Science* 267: 2006-2009

-
- Dazert, S., Kim, D., Luo, L., Aletsee, C., Garfunkel, S., Maciag, T., Baird, A., Ryan, A.F. (1998) Focal delivery of fibroblast growth factor-1 by transfected cells induces spiral ganglion neurite targeting in vitro. *J. Cell Physiol.* 177(1): 123-129
- Edgerton, B.J., House, W.F., Hitselberger, W. (1982) Hearing by cochlear nucleus stimulation in humans. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* 91(2 Pt. 3): 117-124
- Evans, E.F., Nelson, P.G. (1973) The response of single neurones in the cochlear nucleus of the cat as a function of their location and the anaesthetic state. *Exp. Brain Res.* 17(4): 402-427
- Evans, E.F., Nelson, P.G. (1973a) On the functional relationship between the dorsal and ventral divisions of the cochlear nucleus of the cat. *Exp. Brain Res.* 17(4): 428-442
- Fechter, L.D. (2004) Promotion of noise-induced hearing loss by chemical contaminants. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67 (8-10): 727-740
- Fee, W.E. Jr. (1980) Aminoglycoside ototoxicity in the human. *Laryngoscope* 90(10 Pt. 2 Suppl. 24): 1-19
- Fitzakerley, J.L., Schaefer, K.L., Kitko, R.A., Manis, P.B. (1997) Properties of cochlear nucleus neurons in primary culture. *Hear. Res.* 114(1-2): 148-168
- Fitzakerley, J.L. (2001) Survival and differentiation of neurons cultured from the mouse cochlear nucleus on extracellular matrix components. *Neurosci. Lett.* 316(3): 183-187
- Frade, J.M., Martinez-Morales, J.R., Rodriguez-Tebar, A. (1996) Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. *Exp. Cell. Res.* 222(1): 140-149

-
- Frank, G., Hemmert, W., Gummer, A.W. (1999) Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4420-4425
- Fraser, A.D. (1979) *The Physics of Semi-conductor Devices*. 2nd Edition, Oxford University Press.
- Fromherz, P. (2002) Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chemphyschem*. 3(3): 276-284
- Giebel, W., Galić, M. (1998) *Die medizinische Doktorarbeit*. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage, Kohlhammer, Stuttgart, Berlin, Köln.
- Gopal, K.V., Gross, G.W. (1996) Auditory cortical neurons in vitro: Cell culture and multichannel extracellular recording. *Acta Otolaryngol.* 116(5): 690-696
- Grayeli, A.B., Bouccara, D., Kalamarides, M., Ambert-Dahan, E., Coudert, C., Cyna-Gorse, F., Sollmann, W.P., Rey, A., Sterkers, O. (2003) Auditory brainstem implant in bilateral and completely ossified cochleae. *Otol. Neurotol.* 24(1): 79-82
- Guggenmoos-Holzmann, I., Wernecke, K.D. (1995) *Medizinische Statistik*. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien.
- Hausler, R. (2004) The effects of acoustic overstimulation. *Ther. Umsch.* 61(1): 21-29
- Hillman, T., Badi, A.N., Normann, R.A., Kertesz, T., Shelton, C. (2003) Cochlear nerve stimulation with a 3-dimensional penetrating electrode array. *Otol. Neurotol.* 24(5): 764-768
- Jackson, K.B., Mark, G., Helms, J., Mueller, J., Behr, R. (2002) An auditory brainstem implant system. *Am. J. Audiol.* 11(2): 128-133

- Jacobs, H.T., Hutchin, T.P., Kappi, T., Gillies, G., Minkkinen, K., Walker, J., Thompson, K., Rovio, A.T., Carella, M., Melchionda, S., Zelante, L., Gasparini, P., Pyykko, I.I., Shah, Z.H., Zeviani, M., Mueller, R.F. (2004) Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur. J. Hum. Genet.* Advance online publication, 4 August 2004; doi:10.1038/sj.ejhg.5201250
- Johnsrude, I.S., Giraud, A.L., Frackowiak, R.S.J. (2002) Functional Imaging of the Auditory System: The Use of Positron Emission Tomography. *Audiol. Neurootol.* 7: 251-276
- Jürgens, K.D. (2004) Hören und Gleichgewicht. Vorlesungsskript SS 2004, Zentrum Physiologie, Medizinische Hochschule Hannover.
- Kandler, K., Friauf, E. (1993) Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 328(2): 161-184
- Kaplan, D.R., Stephens R.M. (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25(11): 1404-1417
- Kaul, R.A., Syed, N.I., Fromherz, P. (2004) Neuron-semiconductor chip with chemical synapse between identified neurons. *Phys. Rev. Lett.* 92(3): 038102. Epub 2004 Jan. 23
- Kleitman, N., Wood, P., Johnson, M.I., Bunge, R.P. (1988) Schwann cell surfaces but not extracellular matrix organized by Schwann cells support neurite outgrowth from embryonic rat retina. *J. Neurosci.* 8(2): 653-663
- Kuchta, J., Otto, S.R., Shannon, R.V., Hitselberger, W.E., Brackmann, D.E. (2004) The multichannel auditory brainstem implant: how many electrodes make sense? *J. Neurosurg.* 100(1): 16-23
- Kuchta, J. (2004) Neuroprosthetic hearing with auditory brainstem implants. *Biomed. Tech.* 49(4): 83-87

- Kupka, S., Bodden-Kamps, B., Baur, M., Zenner, H.-P., Pfister, M. (2004) Mitochondriale A1555G-Mutation Molekulargenetische Diagnostik bei sporadischen Fällen nichtsyndromaler Schwerhörigkeit. HNO 2004 Aug. 12 [Epub ahead of print] doi:10.1007/s00106-003-0994-8
- Lander, A.D. (1987) Molecules that make axons grow. Mol. Neurobiol. 1(3): 213-245
- Laszig, R., Aschendorff, A., Schipper, J., Klenzner, T. (2004) Current developments in cochlear implantation. HNO 52(4): 357-362
- Lautermann, J., Dehne, N., Schacht, J., Jahnke, K. (2004) Aminoglycoside- and cisplatin-ototoxicity: from basic science to clinics. Laryngorhinootologie 83(5): 317-323
- Lefebvre, P.P., Leprince, P., Weber, T., Rigo, J.M., Delree, P., Moonen, G. (1990) Neuronotrophic effect of developing otic vesicle on cochleo-vestibular neurons: evidence for nerve growth factor involvement. Brain Res. 507(2): 254-260
- Lefebvre, P.P., Weber, T., Leprince, P., Rigo, J.M., Delree, P., Rogister, B., Moonen, G. (1991) Kainate and NMDA toxicity for cultured developing and adult rat spiral ganglion neurons: further evidence for a glutamatergic excitatory neurotransmission at the inner hair cell synapse. Brain Res. 555(1): 75-83
- Lochter, A., Taylor, J., Braunewell, K.H., Holm, J., Schachner, M. (1995) Control of neuronal morphology in vitro: interplay between adhesive substrate forces and molecular instruction. J. Neurosci. Res. 42(2): 145-158
- Loeb, G.E. (1990) Cochlear prosthetics. Annu. Rev. Neurosci. 13: 357-371
- Lorente de No, R. (1933) Anatomy of the eight nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. Laryngoscope 43: 1-38

-
- Manis, P.B., Marx, S.O. (1991) Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J. Neurosci.* 11(9): 2865-2880
- Manis, P.B., Spirou, G.A., Wright, D.D., Paydar, S., Ryugo, D.K. (1994) Physiology and morphology of complex spiking neurons in the guinea pig dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 348(2): 261-276
- Masuda, A., Fisher, L.M., Oppenheimer, M.L., Iqbal, Z., Slattery, W.H. (2004) Hearing changes after Diagnosis in Neurofibromatosis Type 2. *Otol. & Neurotol.* 25: 150-154
- McCreery, D.B., Shannon, R.V., Moore, J.K., Chatterjee, M. (1998) Accessing the tonotopic organization of the ventral cochlear nucleus by intranuclear microstimulation. *IEEE Trans. Rehabil. Eng.* 6(4): 391-399
- Mlynski, R., Brors, D., Aletsee, C., Dazert, S. (2002) Histomorphometrische Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Spiralganglienzellneuriten in vitro. *Laryngorhinootologie* 81(3): 184-188
- Mou, K., Hunsberger, C.L., Cleary, J.M., Davis, R.L. (1997) Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 386(4): 529-539
- Neale, E.A., Bowers, L.M., Smith, T.G. Jr. (1993) Early dendrite development in spinal cord cell cultures: a quantitative study. *J. Neurosci. Res.* 34(1): 54-66
- Niblock, M.M., Brunso-Bechtold, J.K., Henkel, C.K. (1995) Fiber outgrowth and pathfinding in the developing auditory brainstem. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85(2): 288-292
- Oertel, D., Wu, S.H., Garb, M.W., Dizack, C. (1990) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the posteroventral cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 295(1): 136-154
- Osen, K.K. (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.* 136(4): 453-484

-
- Osen, K.K. (1969a) The intrinsic organization of the cochlear nuclei. *Acta Otolaryngol.* 67(2): 352-359
- Pearson, H. (2001) Nerve chip goes live. *Nature science update [Epub]* 2001 August 28
- Pfeiffer, R.R. (1966) Classification of response patterns of spike discharges for units in the cochlear nucleus: tone burst stimulation. *Exp. Brain Res.* 1(3): 220-235
- Poe, B.H., Brunso-Bechthold, J.K. (1998) Directed outgrowth from a subset of cochlear nucleus fibers in a collagen-gel matrix. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 105(1): 153-157
- Probst, R., Grevers, G., Iro, H. (2004): *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.* 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rauschecker, J.P. (1999) Making brain circuits listen. *Science* 285(5434): 1686-1687
- Rauschecker, J.P., Shannon, R.V. (2002) Sending sound to the brain. *Science* 295(5557): 1025-1029
- Rees, G., Frith, C.D. (1998) How do we select perceptions and actions? Human brain image studies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 1283-93
- Riemann, K., Pfister, M., Blin, N., Kupka, S. (2004) Mitochondrial hearing impairment. Background, genetic predisposition and possibilities for diagnosis. *HNO* 52(6): 503-509
- Romijn, H.J. (1988) Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol. Cell* 63(3): 263-268
- Rost, R. (1966) *Silicium als Halbleiter.* Berliner Union, Stuttgart.

-
- Rusznak, Z., Harasztosi, C., Stanfield, P.R., Szucs, G. (2001) An improved cell isolation technique for studying intracellular Ca(2+) homeostasis in neurones of cochlear nucleus. *Brain Res. Protoc.* 31(2): 68-75
- Rutten, W.L. (2002) Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 407-452
- Ryan, A., Dallos, P. (1975) Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature* 253: 44-46
- Santos-Sacchi, J., Dilger, J.P. (1988) Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells. *Hear. Res.* 35: 143-150
- Scott, S.K., Blank, C.C., Rosen, S., Wise, R.J. (2000) Identification of a pathway for intelligible speech in the left temporal lobe. *Brain* 123: 2400-06
- Seidler, H., Walter, R. (2001) Prävention und Rehabilitation von Hörschäden in einem modernen Gesundheitswesen - Memorandum des Präsidenten. Stellungnahme Deutscher Schwerhörigenbund e.V., Internetveröffentlichung unter www.schwerhoerigkeit.de/DSB/stellungnahmen
- Seki, Y., Samejima, N., Kumakawa, K., Komatsuzaki, A. (2003) Subtonsillar placement of auditory brainstem implant. *Acta. Neurochir. Suppl.* 87: 85-87
- Sergent, J. (1993) Music, the brain and Ravel. *Trends Neurosci.* 16: 168-172
- Shepherd, R.K., Hardie, N.A. (2001) Deafness-induced changes in the auditory pathway: implications for cochlear implants. *Audiol. Neurootol.* 6(6): 305-318
- Shepherd, R.K., Xu, J. (2002) A multichannel scala tympani electrode array incorporating a drug delivery system for chronic intracochlear infusion. *Hear. Res.* 172(1-2): 92-98

-
- Sobkowicz, H.M., Loftus, J.M., Slapnick, S.M. (1993) Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 502: 3-36
- Sohn, W., Jörgenshaus, W. (2001) Schwerhörigkeit in Deutschland – Repräsentative Hörscreening-Untersuchung bei 2000 Probanden in 11 Allgemeinpraxen. *Z. All. Med.* 77: 143ff.
- Stichel, C.C., Muller, H.W. (1991) Dissociated cell culture of rat cerebral cortical neurons in serum-free, conditioned media: GABA-immunopositive neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 64(1-2): 145-154
- Thaler, E.R. (2002) The diagnostic utility of an electric nose: rhinologic applications. *Laryngoscope* 112(9): 1533-1542
- Trautwein, A., Kreibitz, U., Oberhausen, E., Hüttermann, J. (1999) *Physik für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten.* 5., neu bearbeitete Auflage, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York.
- Varghese, S. (2000) Pattern of laminin-1 and 1-integrin expression in the developing cochlear nucleus of mouse. M.S. Thesis, University of Minnesota
- Zeck, G., Fromherz, P. (2001) Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98(18): 10457-10462
- Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., Dallos, P. (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405: 149-55
- Zheng, J., Madison, L.D., Oliver, D., Fakler, B., Dallos, P. (2002) Prestin, the motor protein of outer hair cells. *Audiol. Neurootol.* 7: 9-12
- Zhou, X., Hossain, W.A., Rutledge, A., Baier, C., Morest, D.K. (1996) Basic fibroblast growth factor (FGF-2) affects development of acoustic-vestibular neurons in the chick embryo brain in vitro. *Hear. Res.* 101(1-2): 187-207

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Dazert nicht nur für die Überlassung des Themas und die Motivation zur Durchführung dieser Arbeit, sondern auch für die stetige wissenschaftliche Diskussion und seine wissenschaftliche wie klinische Förderung.

Herrn Prof. Dr. med. Jan Helms, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Universität Würzburg, möchte ich für die Nutzung der klinischen und wissenschaftlichen Einrichtungen in seiner Klinik danken, an der ein Großteil dieser Arbeit entstand.

Frau Petra Joa danke ich für die großartige Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten und der Auswertung der Versuche sowie für die Versorgung der Tiere.

Danken möchte ich besonders auch Herrn Dr. med. Robert Mlynski für seine Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung dieser Arbeit, die Unterstützung bei der Präparation der Tiere und die stetige Diskussion, verbunden mit vielen hilfreichen Anregungen und Ideen, bis zum Abschluss dieser Arbeit. Weiterhin danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Innenohrbiologie in Würzburg, Herrn Dr. med. Christoph Aletsee, Herrn Dr. med. Dominik Brors, Stefan Hansen und René Hartensuer.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Ein letztes Dankeschön auch an Claudia, für die andauernde Ermutigung und Motivation zur Beendigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Volkenstein
Geburtsdatum: 15. April 1978
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschohle Zellingen
1988 - 1997 Johann-Schöner-Gymnasium Karlstadt
27. Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium

05/1998 – 05/2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
03/2000 Physikum (Note „gut“)
03/2001 Erstes Staatsexamen (Note „gut“)
03/2003 Zweites Staatsexamen (Note „gut“)
05/2004 Drittes Staatsexamen (Note „sehr gut“)

Praktika & Famulaturen

10/1997 – 04/1998 Krankenpflegepraktikum und Krankenpflegehelfer in der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg
09/2000 Famulatur in der Gefäßchirurgie am Klinikum Ingolstadt
08/2001 – 10/2001 Forschungsaufenthalt und Famulatur an der Universität San Diego, Kalifornien, USA bei Prof. A.F. Ryan bzw. Prof. J. Harris in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
03/2002 Famulatur in der Berufsgenossenschaftlichen Klinik der Keramik- und Glasindustrie in Bad Reichenhall

Praktisches Jahr

04/2003 – 08/2003 Wahlfach HNO am Charing Cross Hospital, Royal Brompton Hospital und Chelsea & Westminster Hospital in London, Großbritannien
08/2003 – 12/2003 Tertial Innere Medizin als Unterassistent am Spital GZO Wetzikon (Lehrkrankenhaus der Universität Zürich) in Wetzikon, Schweiz
12/2003 – 03/2004 Tertial Chirurgie als Unterassistent am Spital Limmattal (Lehrkrankenhaus der Universität Zürich) in Schlieren, Schweiz

Berufserfahrung

07/2004 - 09/2004 Arzt im Praktikum an der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Essen, Direktor Prof. Dr. med. K. Jahnke
seit 10/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Essen, Direktor Prof. Dr. med. K. Jahnke

Preise

11/2004

Posterpreis am 3. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen für die Arbeit
„Wachstumsverhalten auditorischer Neurone auf Halbleitermaterialien zur Weiterentwicklung implantierbarer Hörsysteme“

Sonstiges

Fremdsprachen

Englisch (sicher in Wort und Schrift), Latein

Zusatzqualifikation

EDV-Kenntnisse (v.a. Word, Exel, Power Point),
Übungsleiter Tennis (C-Trainer des Bay. Tennisverbandes)

Sonst. Aktivitäten

Seit mehreren Jahren Jugendwart im Tennisverein und Betreuung von Wettkampfmannschaften

Hobbys

Tennis, Skifahren, Wandern

Essen, 20.12.2004