

Aus dem Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung von Koloalisation und Gesamtanfärbung als Parameter  
in der Biokompatibilitätsprüfung nach Implantation  
unterschiedlicher subduraler Elektrodenmaterialien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Stefanie Kerstin Landgraf  
aus Würzburg

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 08.12.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neuroimplantate .....	1
1.2 Neurohistologie .....	1
1.2.1 Mikroglia .....	2
1.2.2 Astrozyten .....	3
1.3 Zellmarker .....	4
1.3.1 GFAP .....	4
1.3.2 IBA1.....	5
1.3.3 IL-1B.....	5
1.4 Biokompatibilität .....	5
1.5 EU-Projekt NeuroCare.....	5
1.6 Zielsetzung.....	6
<b>2 LITERATURDISKUSSION</b> .....	<b>7</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>10</b>
3.1 Materialien .....	10
3.1.1 Versuchstiere .....	10
3.1.2 Elektrodenmaterialien.....	10
3.1.3 Chemikalien.....	11
3.1.4 Puffer / Lösungen / Reagenzien .....	12
3.1.5 Sera.....	12
3.1.6 Primärantikörper.....	12
3.1.7 Sekundärantikörper .....	12
3.1.8 Weitere Fluoreszenzfärbemittel.....	12

3.1.9	Geräte, Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien .....	12
3.1.10	Medikamente und sonstige Medizinprodukte .....	14
3.1.11	Software .....	14
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.2.1	Operationsverfahren.....	15
3.2.2	Euthanasie .....	17
3.2.3	Hirnentnahme.....	17
3.2.4	Aufbereitung der Gewebsproben.....	18
3.2.5	Färbeverfahren .....	18
3.2.6	Bildaquisition – Lichtmikroskopie.....	20
3.2.7	Computerbasierte Bildanalyse.....	20
3.2.8	Statistische Verfahren .....	21
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Kollektiv.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung der Kolo­kalisierung.....</b>	<b>22</b>
4.2.1	Deskriptive Statistiken und Mittelwertvergleiche.....	22
4.2.2	Lineares gemischtes Modell .....	26
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Gesamtanfärbung .....</b>	<b>27</b>
4.3.1	Deskriptive Statistiken und Mittelwertvergleiche.....	27
4.3.2	Lineares gemischtes Modell .....	31
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>37</b>

**DANKSAGUNG**

**TABELLARISCHER LEBENS­LAUF**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIF 1	Allograft Inflammations Faktor 1
EU	Europäische Union
GFAP	Saures Gliafaserprotein / Glial fibrillary acidic protein
IBA1	Allograft inflammatory factor 1 / ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL-1B	Interleukin-1 $\beta$
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
ZNS	Zentrales Nervensystem

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Übersicht der verwendeten Materialkombinationen.....	11
Tabelle 2:	Übersicht und Verteilung der eingeschlossenen Tiere .....	22
Tabelle 3:	Deskriptive Statistik der Kolo-kalisation ohne Trennung nach Gruppe .....	22
Tabelle 4:	Globale p-Werte des linearen gemischten Modells für die Parameter der Kolo-kalisation.....	26
Tabelle 5:	Lokale p-Werte für Pearson`s Korrelationskoeffizient zwischen IL-1B und IBA1.....	26
Tabelle 6:	Lokale p-Werte für Pearson`s Korrelationskoeffizient zwischen IL-1B und GFAP.....	27
Tabelle 7:	Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter .....	27
Tabelle 8:	Globale p-Werte des linearen gemischten Modells .....	31
Tabelle 9:	Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für GFAP angefärbte Fläche .....	31
Tabelle 10:	Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für IBA1 angefärbte Fläche .....	32
Tabelle 11:	Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für IL-1B angefärbte Fläche .....	32

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1:	Ruhende Mikroglia, aktivierte Mikroglia .....	2
Abb. 1-2:	Normaler Astrozyt, reaktiver Astrozyt .....	3
Abb. 3-1:	OP-Situs mit ausgeschnittenen Knochenfenstern und rechtsseitig implantierten Elektroden .....	16
Abb. 3-2:	Lichtmikroskopie Färbungen .....	20
Abb. 4-1:	Boxplots für Pearson Korrelationskoeffizienten ohne Trennung nach Gruppen .....	23
Abb. 4-2:	Pearson Korrelationskoeffizienten getrennt für die jeweiligen Elektrodenmaterialien.....	24
Abb. 4-3:	Pearson Korrelationskoeffizienten getrennt für die jeweiligen beobachteten Zeitpunkte .....	24
Abb. 4-4:	Pearson Korrelationskoeffizienten getrennt für die jeweiligen Elektrodenmaterialien „Tag 14“ .....	25
Abb. 4-5:	Pearson Korrelationskoeffizienten getrennt für die jeweiligen Elektrodenmaterialien „Tag 84“ .....	25
Abb. 4-6:	Boxplots für angefärbte Flächen ohne Trennung nach Gruppen .....	28
Abb. 4-7:	Angefärbte Fläche getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien .....	29
Abb. 4-8:	Angefärbte Fläche getrennt für die jeweiligen beobachteten Zeitpunkte .....	29
Abb. 4-9:	Angefärbte Fläche getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien „Tag 14“ .....	30
Abb. 4-10:	Angefärbte Fläche getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien „Tag 84“ .....	30

# **1 Einleitung**

## **1.1 Neuroimplantate**

Traumatische Nervenschäden und neurodegenerative Erkrankungen haben teils dramatische Auswirkungen auf die Lebensqualität und motorischen Fähigkeiten vieler Patienten. In den USA alleine kommt es jährlich bei ca. 11.000 Patienten zu schweren Verletzungen des Rückenmarks, welche zu dauerhafter Lähmung führen (1). Um solchen Patienten wieder ein eigenständigeres Leben zu ermöglichen, zielten die meisten Forschungsbemühungen bislang auf die Rekonstruktion der verletzten Nerven und somit die Wiederherstellung der Impulsweiterleitung.

Bereits in den 80er-Jahren allerdings wurde ein alternativer Ansatz diskutiert, in dem ein direktes Interface zwischen zentralem Nervensystem und peripheren Effektoren geschaffen werden sollte – quasi ein Bypass des verletzten Nervensystems (2-4). Zu diesem Zweck werden neuronale Implantate benötigt, welche im zentralen Nervensystem extrazelluläre Potentiale ableiten, so dass diese dann in elektrische Signale umgesetzt werden können. Hierzu müssen die Implantate langfristig in Kontakt mit Hirngewebe der Patienten verbleiben und im Verlauf stabil Signale mit hoher Sensibilität aufzeichnen können. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass solche Ansätze prinzipiell möglich sind und vielversprechende Ergebnisse liefern. In Tierexperimenten gelang es so beispielsweise Versuchstiere Roboterarme bewegen zu lassen und damit Objekte zu greifen (5).

Um jedoch auch dauerhaft eine ausreichend stabile Ableitung der extrazellulären Potentiale zu ermöglichen, müssen Material und Design so gewählt werden, dass es zu einer möglichst geringen Fremdkörperreaktion auf das implantierte Material kommt.

## **1.2 Neurohistologie**

Neben den Neuronen, welche für die Erregungsweiterleitung im zentralen und peripheren Nervensystem zuständig sind, existieren eine Vielzahl weiterer Zelltypen, die unter dem Sammelbegriff Neuroglia oder Gliazellen zusammengefasst werden können. Mit Ausnahme der Mikroglia, welche mesodermalen Ursprungs sind, handelt es sich hierbei ebenfalls um Zellen, welche aus dem ektodermalen Keimblatt, genauer dem Neuroektoderm und somit der Neuralleiste bzw. dem Neuralrohr, hervorgehen.

Gliazellen stellen in etwa die Hälfte aller Zellen im menschlichen Gehirn, Neuronen hingegen stellen nur ca. 25% (6). Innerhalb der Gliazellen sind Oligodendrozyten hauptsächlich für die Bildung der Myelinscheiden zuständig und spielen in der Inflammationsantwort auf Implantate eine untergeordnete Rolle. Maßgeblich für die Immunantwort, sowohl auf Verletzung als auch auf Fremdmaterialien, sind im ZNS Astrozyten und Mikroglia.

### 1.2.1 Mikroglia

In etwa 5-10% aller Gliazellen sind Mikroglia. Sie erfüllen makrophagenähnliche Funktionen in Hirn und Rückenmark. In inaktiver Form sind sie ortsständig und verfügen über eine Vielzahl dünner und verzweigter Fortsätze. Bei Verletzungen des ZNS reagieren sie mit Hypertrophie und Proliferation, die Zellfortsätze werden kürzer und weniger verzweigt. Über eine amöboide Fortbewegung können sie zum Läsionsort migrieren und sammeln sich dort an. Durch Phagozytose bzw. Exozytose (d.h. Sekretion zytotoxischer Substanzen wie Wasserstoffperoxid oder Stickstoffmonoxid) beteiligen sie sich an der Beseitigung abgestorbener Zellsubstanz oder Fremdkörper. Über Abgabe spezifischer Zytokine wie IL-1B, TNF  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  stimulieren sie die Proliferation von Astrozyten und somit die Bildung von Glianarben, gleichzeitig wird eine weitere Immunreaktion inhibiert.

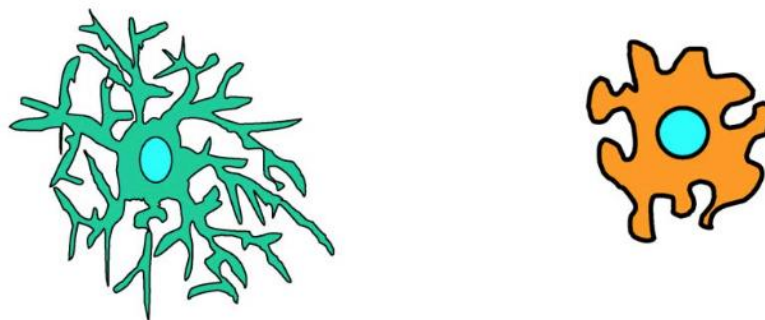


Abb. 1-1: Ruhende Mikroglia (links), aktivierte Mikroglia (rechts).

#### **ruhende Mikroglia**

- dichtes Chromatin
- 5-10% aller Gliazellen
- viele lange und dünne Fortsätze

#### **aktivierte Mikroglia**

- kurze, runde Fortsätze
- amöboide Motilität
- Phagozytose / lysische Enzyme
- Expression inflammatorischer Faktoren
- Proliferation

Darüberhinaus sezernieren Mikroglia eine Vielzahl neurotropher Faktoren, die eine Rolle in Überleben und Wachstum von Neuronen spielen, darunter NGF, BDNF und NT-3 (7,8), aber auch einige cyto- bzw. neurotoxische Faktoren (8,9) und reaktive Sauerstoffradikale im Sinne eines „respiratory burst“ (10).

### 1.2.2 Astrozyten

Astrozyten repräsentieren unter den Gliazellen mit bis zu ca. 65% den größten Anteil (11). Sie besitzen zahlreiche Fortsätze, die radiär dem Zellkörper entspringen und Kontakte mit benachbarten Neuronen bilden. Neben ihrer Funktion als Grenze zwischen Neuronen und Blutgefäßen (und somit der Blut-Hirn-Schranke) bzw. Hirnoberfläche tragen sie wesentlich zur Flüssigkeitsregulation, dem Elektrolythaushalt und auch der Informationsverarbeitung und –weiterleitung bei (6). Darüber hinaus sind sie maßgeblich beteiligt an Regulation von Wachstum und Entwicklung der Neuronen.

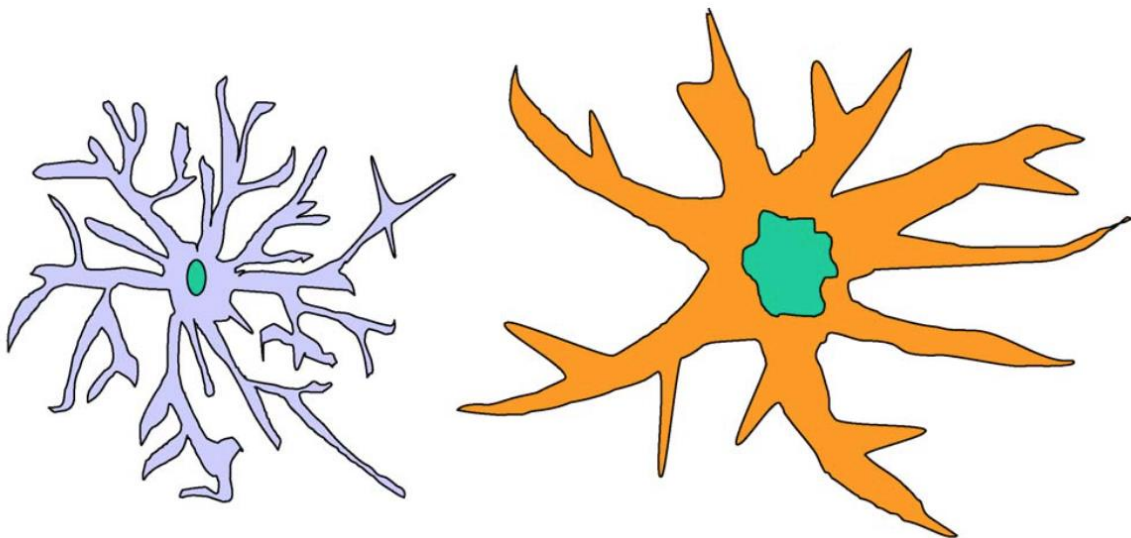


Abb. 1-2: Normaler Astrozyt (links), reaktiver Astrozyt (rechts).

#### **Normaler Astrozyt**

- Runder Zellkern
- Gap junctions zu anderen Astrozyten
- 30-65% aller Gliazellen

#### **Reaktiver Astrozyt**

- Zunahme GFAP und Glykogenspeicher
- Irregulärer Zellkern
- Zunahme Mitochondrien
- Hypertrophie / Proliferation
- Migration / Phagozytose
- Produktion extrazellulärer Matrix sowie neurotropher und proinflammatorischer Faktoren



Eine besondere Rolle kommt Astrozyten bei Schädigungen des ZNS zu, da sie hier maßgeblich an der Bildung von Glianarben beteiligt sind. Dabei handelt es sich um eine relativ unspezifische neuropathologische Reaktion auf verschiedene degenerative oder traumatische Erkrankungen des ZNS mit einer lokal erhöhten Anzahl von Gliazellen nach Untergang oder Zerstörung von Neuronen, welche aber auch das erneute Aussprosseln von Axonen verhindert.

Durch Verletzung aktivierte Astrozyten verändern ihre Form und Funktion. Es kommt zu einer Umverteilung und Vermehrung verschiedener Zellorganellen sowie zu einer deutlichen Hypertrophie. Darüber hinaus haben „reaktive“ Astrozyten verbesserte Migrations- und Phagozytoseeigenschaften (12) und produzieren Bestandteile extrazellulärer Matrix sowie verschiedene neurotrophe und proinflammatorische Faktoren.

### **1.3 Zellmarker**

#### *1.3.1 GFAP*

Das Saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) kommt als Hauptbestandteil der 8-10 nm durchmessenden Intermediärfilamente im Cytoplasma der Gliazellen des zentralen Nervensystems vor, insbesondere in Astrozyten. Es kann daher als Marker für das Vorkommen von Astrozyten verwandt werden (12). Wenngleich auch die genaue Funktion von GFAP noch nicht bekannt ist, so nimmt man an, dass es eine wichtige Rolle bei der Beweglichkeit und Form von Astrozyten spielt. Darüber hinaus zeigt die Literatur, dass es im Rahmen von Narbenbildungen im ZNS, sei es nach Trauma oder Ischämie, zu einer vermehrten Expression von GFAP in Astrozyten, aber auch in Ependymzellen (13) kommt. Zusätzlich verlängern Astrozyten hierbei auch ihre Fortsätze. Daneben spielt es eine wichtige Rolle in der Diagnostik von Hirntumoren, wie beispielsweise Astrozytomen, Glioblastomen, Ependymomen und anderen glialen Tumoren.

Das Protein besteht aus 432 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 49.883 Dalton.

### 1.3.2 IBA1

Das Ionisierte Calciumbindende Adaptermolekül 1 (IBA1) oder auch Allograft Inflammations Faktor 1 (AIF 1) wird insbesondere von aktivierten Mikroglia exprimiert, beispielsweise in Folge von Traumata oder Zerstörung. Auch bei diesem Protein ist die genaue Funktion bislang noch nicht bekannt. Aufgrund der hohen Spezifität für aktivierte Mikroglia eignet es sich aber besonders gut zur Detektion von Schäden im ZNS.

### 1.3.3 IL-1B

Interleukin-1 $\beta$  ist ein hochpotentes Zytokin und stark entzündungsfördernd. Im Blut führt es zu Fieber, Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, der Akute-Phase-Proteine sowie des zirkulierenden Interleukin-6. Es ist einer der zentralen Botenstoffe bei der Reaktion auf Fremdeinflüsse.

## 1.4 Biokompatibilität

Bei der Untersuchung der Biokompatibilität neuronaler Implantate stellen sich verschiedene Herausforderungen. Obwohl Entzündungsreaktionen möglicherweise auch durch die Einwirkung elektrischer Ströme moduliert werden, finden die meisten Untersuchungen an Gewebeproben statt, die nur Kontakt zu passiven oder nicht-funktionalen Elektrodenmaterialien hatten. Darüber hinaus finden in vielen Studien rein qualitative Kriterien zur Bewertung der Immunantwort Anwendung, in anderen wiederum kann nicht klar zwischen dem Effekt des Traumas durch die Implantation und Veränderungen durch den chronischen Kontakt zum verwendeten Elektrodenmaterial unterschieden werden.

## 1.5 EU-Projekt NeuroCare

In dem EU-Projekt NeuroCare sollen neue und bessere neuronale Implantate untersucht werden, um ein genaueres Verständnis der Kopplung elektronischer Bauteile an lebende Zellen zu erlauben. Insbesondere kostengünstige Carbonmaterialien werden untersucht, da diese einen guten Kompromiss darstellen zwischen elektrischen Eigenschaften, Materialbeständigkeit und Biokompatibilität. Darüber hinaus werden Bauteile aus nanokristallinem Diamant und Graphen untersucht, für die eine verminderte Gliosebildung auch bei höheren elektrischen

Strömen gezeigt werden konnte. Die Universität Mainz nimmt, neben zwölf weiteren Partnern, an diesem Projekt teil.

## **1.6 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen der Arbeiten zum EU-Projekt NeuroCare zwei Hauptziele etabliert werden:

- (1) eine objektive Methode zur Bestimmung der Kolo-kalisation unterschiedlicher Markerproteine
- (2) eine objektive Methode zur Bestimmung der Gesamtanfärbung unterschiedlicher Markerproteine in einem lichtmikroskopischen Bildausschnitt

Die gewählte Methode sollte sich eignen möglichst einfach und mit minimaler manueller Interaktion valide Ergebnisse von konstanter Qualität zu liefern.

## 2 Literaturdiskussion

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden unterschiedliche Materialien und Herstellungsverfahren erprobt, um Neuroimplantate zu produzieren, die optimale elektrische Eigenschaften mit minimaler Entzündungsreaktion vereinen. Diese im zentralen oder peripheren Nervensystem implantierten Elektroden müssen möglichst selektive Stimulation und/oder Signalableitung einzelner Neurone ermöglichen (14-18). Dabei sollte gleichzeitig die durch die Implantation ausgelöste entzündliche Fremdkörperreaktion minimiert werden, da diese wiederum auch Auswirkungen auf die globale kognitive Leistung haben kann (19,20).

Zwar ist noch nicht vollkommen klar, welches Material und welche Fertigungsweise sich als ideal herausstellen wird, doch finden sich dazu umfangreiche Untersuchungen in der Literatur (21).

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Materialkombinationen untersucht (22). Dazu wurden beispielsweise die Elektrodenoberflächen mit Polyethylenglykol (23,24), Polydimethylsiloxan (25) oder antiinflammatorischen Wirkstoffen beschichtet (26,27), um die auf das Fremdmaterial resultierende Inflammationsreaktion abzumildern oder zu unterdrücken. Andere Untersuchungen und Entwicklungen zielten mehr auf das eigentliche Elektrodenmaterial. So wurden beispielsweise Graphen Mikroelektroden und Kohlenstoffnanoröhrchen untersucht (28-31).

Als einer der aussichtsreichsten Kandidaten, der möglichst viele gewünschte elektrische Eigenschaften aufweist, gelten aktuell Elektrodenmaterialien aus Bor-dotiertem Diamant (BDD). Basierend auf den Arbeiten von Park et al. (32) konnten Gruppen um Roeser et al. (33) und Luong et al. (34) durch Ersetzung einzelner Kohlenstoffatome im Kristallgitter des Diamantes durch Boratome die elektrische Leitfähigkeit deutlich verbessern. Auch im Hinblick auf die von diesen Elektrodenmaterialien hervorgerufene Entzündungsreaktion konnten im Vergleich zu konventionellen Titannitrid-Elektrodenmaterialien (35) gute Ergebnisse gezeigt werden.

Die Biokompatibilität der Neuroimplantate zu untersuchen und zu bewerten, stellt im Zusammenhang der genannten Arbeiten eine nicht zu vernachlässigende Herausforderung dar. Im überwiegenden Maße wird die Entzündungsantwort anhand subjektiv visueller Abschätzungen evaluiert. Zumeist wird hierzu eine Skala von 0 =

keine Entzündung bis 3 = starke Entzündung verwandt. Obwohl die beurteilenden Untersucher generell für die implantierten Materialien oder den Zeitpunkt der Implantation verblindet sind, stellt dies eine potentielle Fehlerquelle dar, insbesondere dann, wenn mehrere Auswerter beteiligt sind.

Zwar werden in vielen Untersuchungen auch objektivere Kriterien verwandt, doch gibt es auch hierzu kein standardisiertes Vorgehen. Heo et al. nutzten neben einer subjektiven Skala in ihrer Untersuchung einen Ansatz in dem halbautomatisch das Ausmaß von Fibrose und axonaler Querschnittsfläche erfasst wurde (26). Alcaide et al. vermaßen die Dicke der fibrösen Kapsel in Umgebung der Elektrodenmaterialien, verwendeten dann aber ebenfalls einen subjektiven Score (35).

Eine möglichst genaue und idealerweise objektive, (semi-) quantitative Untersuchung der Fremdkörperreaktion wäre allerdings wünschenswert, da diese bekanntermaßen die Funktion und Sensitivität implantierter Mikroelektroden erheblich einschränken können (36). Als idealster und objektivster Messwert kann hier die tatsächliche Messung der Expression relevanter Gene gesehen werden, wie u.a. in den Arbeiten von Erefej et al. und Minnikanti et al. beschrieben (25,29). Autoradiographische Methoden, bei denen ein radioaktiver Ligand gegen ein bestimmtes Zielmolekül eingesetzt wird und anschließend die Belichtung eines entsprechenden Filmes gemessen wird, zeigten ebenfalls gute Ergebnisse (20). Diese Methoden setzen jedoch einen relativ hohen Aufwand voraus, sodass einfachere Methoden von Vorteil wären. Eine diesbezüglich vielversprechende Alternative zeigten Kozlowski und Weimer (37). In ihrer Arbeit präsentierten sie eine vollautomatisierte Methode zur Segmentierung der Mikroglia in entsprechend gefärbten Gewebepräparaten. Ein Algorithmus identifizierte zunächst Pixel mit Helligkeitswerten über einem bestimmten Grenzwert und nahm dann Gruppen von Pixeln mit hohen Helligkeitswerten, die größer als  $50\mu\text{m}^2$  waren, als Mikroglia an, deren Umrisse dann über weitere Algorithmen bestimmt wurden. Hier ergab sich ein deutlicher und signifikanter Zusammenhang zwischen Zellgröße (in  $\mu\text{m}^2$ ) und Aktivierungszustand der Mikroglia. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zellgröße am besten und stärksten mit der Expression von IBA-1 korrelierte und, dass der Parameter Zellgröße sich gut eignete, um Veränderungen der Mikrogliaaktivierung über die Zeit zu verfolgen (37).

Eine weitere Methode, die zur automatischen Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Bilder hilfreich sein könnte, ist die Untersuchung der Kollokalisierung verschiedener

Anfärbungen. So ließe sich beispielsweise untersuchen, ob die Genexpression für bestimmte Proteine im zeitlichen und räumlichen Verlauf variiert. So ließe sich beispielsweise zeigen, ob nach einer bestimmten Intervention, wie der Implantation subduraler Elektrodenmaterialien, die Expression proinflammatorischer Zytokine auch von Zellen übernommen wird, die zunächst an der Expression dieser Mediatoren nicht beteiligt waren. Hierzu stehen verschiedene Maßzahlen zur Verfügung, wie beispielsweise der Mander's Overlap Coefficient (MOC) und der Pearson Correlation Coefficient (PCC). Zwar erscheint zunächst der MOC als einfacher und intuitiver verständlich, doch konnte gezeigt werden, dass der PCC für Veränderungen in den untersuchten Proben sensitiver und stabiler ist als der MOC (38). Im Gegensatz zum MOC, welcher den Anteil der Pixel, die für einen Farbstoff anfärbten, an der Menge der Pixel, die für den jeweils anderen Farbstoff anfärbten, angibt, berücksichtigt der PCC auch Änderungen in der Intensität der jeweiligen Anfärbung und gibt nur einen Wert für die Korrelation der Anfärbungen untereinander an.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

Im Folgenden werden die Materialien aufgeführt, die im Rahmen der Arbeit Verwendung fanden.

#### 3.1.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Tierversuche wurden insgesamt 164 neun Wochen alte, männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River) mit einem Gewicht von  $327 \pm 13$  g genutzt. Von diesen wurden für die vorliegende Arbeit 119 Tiere in die Auswertung eingeschlossen. Insgesamt 21 Tiere wurden aufgrund intraoperativer Komplikationen aus der Auswertung ausgeschlossen, weitere 20 Tiere dienten zur Optimierung der Methodik und kamen daher für die weitere Auswertung ebenfalls nicht in Betracht. Bei vier Tieren kam es während der Aufbereitung der Proben zu Fehlern, weshalb diese ebenfalls nicht für die Auswertung eingeschlossen wurden.

Sämtliche Versuche wurden gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt (39). Die Tiere wurden einzeln in geeigneten Tierställen bei geeigneten Umgebungsbedingungen gehalten (Luftfeuchtigkeit ca. 57%, Temperatur ca. 23° C), entsprechende Protokolle wurden angefertigt und sind hinterlegt. Es bestand ein zwölfständiger Tag-/Nacht-Rhythmus mit Beleuchtung von 07:00 bis 19:00 Uhr. Wasser und Nahrung waren stets in ausreichendem Maße zugänglich. Zwischen Lieferung und Operation lag eine Akklimatisierungsphase von durchschnittlich einer Woche Dauer. Postoperativ wurde das Gewicht der Tiere täglich protokolliert.

#### 3.1.2 Elektrodenmaterialien

Tabelle 1 zeigt die der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen des EU-Projektes Neurocare<sup>1</sup> übergebenen Materialkombinationen, die für die vorliegende Arbeit verwandt wurden.

---

<sup>1</sup> <http://neurocare-project.eu>

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Materialkombinationen

ID	Träger	Elektrodenmaterial
D0	Polymid	-
D2	Polymid	Diamant
E0	Parylene	-
E2	Parylene	Platin
E4	Polymid	Platin
Graph EI	-	Graphen
Graph Tr	Graphen	-
PEI Tr	Platin-Iridium	-
PEI BDD	Platin-Iridium	Borodierter nanokristaliner Diamant

Mit Ausnahme der Platin-Iridium-Proben hatten alle Proben eine Stärke von 10 µm, die Platini-Iridium-Proben hatten eine Stärke von 100 µm. Die Gesamtlänge der Proben betrug in allen Fällen 4,4 mm. Proben mit zusätzlichem Elektrodenmaterial enthielten zwei jeweils 1 mm durchmessende Proben mit einer zusätzlichen Stärke von 300 nm.

### 3.1.3 Chemikalien

Folgende Substanzen wurden zur Aufbereitung der Gewebeproben verwandt:

- Aqua Dest; Firma B. Braun Meslungen AG
- Eindeckmedium Fluorescent Mounting Medium, Firma Dako
- Essigsäure; Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH
- Ethanol 70%, 100%; Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH
- Histoacryl-Kleber; Firma B. Braun Meslungen AG
- Isofluran Forene®; Firma Abbott GmbH & Co. KG
- Isopropylalkohol GMP; Firma Aug. Hedinger GmbH & Co. KG
- 2-Methylbutan; Firma Carl Roth GmbH & Co. KG
- Natriumchlorid 0,9%; Firma B. Braun Meslungen AG
- Paraformaldehyd DAC; Firma Carl Roth GmbH & Co. KG
- PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Firma Gibco
- Povidon-Iod; Firma Mundipharma GmbH
- Rotihistol; Firma Carl Roth GmbH & Co. KG
- Saccharose; Firma Carl Roth GmbH & Co. KG



- Triton X 100; Firma Merck KGaA
- Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%; Firma Merck KGaA
- Zitronensäure; Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH

#### 3.1.4 *Puffer / Lösungen / Reagenzien*

- 0,02 M phosphate buffered saline triton (PBST): PBS mit 3 ml Triton/l
- 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA): 10 g Paraformaldehyd in 250 ml 0,2 M PBS bei 60°C gelöst, pH 7,4 eingestellt mit 1.2 Trpf. NaOH
- 20%ige Saccharose-Lösung: 40 g Saccharose in 200 ml 0,2 M PBS

#### 3.1.5 *Sera*

- Bovine serum albumin (BSA); Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH

#### 3.1.6 *Primärantikörper*

- Goat Anti-Interleukin-1-beta; Firma Neuromics
- Mouse Anti-glia fibrillary acidic protein; Firma BD Pharmingen
- Rabbit Anti-ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1; Firma Wako Pure Chemical Industries

#### 3.1.7 *Sekundärantikörper*

- Alexa Fluor 488 donkey anti goat (Absorption: 490 nm, Emission: grün 525 nm); Firma Life Technologies
- Alexa Fluor 647 donkey anti mouse (Absorption: 650 nm, Emission: rot 665 nm); Firma Life Technologies
- Alexa Fluor 568 donkey anti rabbit (Absorption: 578 nm, Emission: orange 603 nm); Firma Life Technologies

#### 3.1.8 *Weitere Fluoreszenzfärbemittel*

- 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1 mg/ml (Absorption 358 nm, Emission: blau 461 nm); Firma Carl Roth GmbH & Co. KG

#### 3.1.9 *Geräte, Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien*

- Bohrer Microtron; Firma B. Braun
- Bohrkopf Diamant (0,6 mm); Firma B. Braun

- Deckgläschen (60mm, Stärke 1); Firma Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH
- Digitalkamera Cybershot W380; Firma Sony
- Dreiwegehahn; Firma B. Braun
- Einmalskalpell Cutoff; Firma B. Braun
- Einmalspritze Omnifix F Spritzen 1 ml; Firma B. Braun
- Feuchte Kammern: Färbekammer Stain Tray; Firma Carl Roth GmbH & Co. KG
- Fluoreszenzlichtquelle, extern; Firma LEJ GmbH
- Gefäße
- Gefrierschrank Hera freeze; Firma Thermo Fisher Scientific Inc.
- Gefrierspray Ice-It; Firma Thermo Fisher Scientific Inc.
- Glasplatten
- Handschuhe; Firma Mai Med GmbH
- Infusionsständer
- Kanülen Microlance 3; Firma Becton, Dickinson and Company
- Klemme, gebogen, nach Halsted; Firma B. Braun
- Kryostat CM 1900, Modell1850; Firma Leica Mikrosystems
- Kryostaten-Gel: Cryo-Gei™; Firma Surgipath MedicalIndustries, USA
- Kühlschrank; Firma Liebherr
- Kurzhaarschneider, elektrisch; Firma B. Braun
- Lampe (230  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )
- Mikrofederschere; Firma B. Braun
- Fluoreszenzmikroskop, Orthoplan; Firma Leitz, Wetzlar (Erregung / Spiegel / Emission)
  - BP629/60 / 660 / BP700/75;
  - BP545/30 / 570 / BP610/75;
  - BP480/40 / 505 / BP527/30;
  - BP360/40 / 400 / BP470/40;
- Mikroskopkamera, Rolera Bolt Model 01-ROL-BOLT-M-12; Firma QImaging Model
- Nadelhalter; Firma B. Braun
- Nagelzange Firma B. Braun
- Nierenschale
- Objektträger Super Frost Plus; Firma Menzei-Gläser

- Objektträgerhalter; Firma Thermo Fisher Scientific Inc.
- Objektträgerkästen aus Glas
- Operationsmikroskop; Firma Carl Zeiss AG
- Papierhandtücher; Firma CWS-boco
- Pinzette, anatomisch; Firma B. Braun
- Pinzette, chirurgisch; Firma B. Braun
- Pipetten 1000 µl, 100 µl und 10 µl; Firma Eppendorf AG
- Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl; Firma Eppendorf AG
- Präzisionspinzette, nach Uhrmacher; Firma B. Braun
- Rotlichtlampe ( $<5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ )
- Schere, spitz, gebogen; Firma B. Braun
- Schüttler Vortex-Genie 2; Firma Scientific Industries, Inc.
- Spatel; Firma B. Braun
- Splitterpinzette; Firma B. Braun
- Stereotaxie; Firma David Kopf Instruments
- Stoppuhr; Firma Heathrow Scientific
- Tonne für Gefahrenstoffe
- Wärmepad mit Temperatursonde; Firma Harvard Apparatus
- Wattestäbchen; Firma Hartmann
- Zentrifugenröhrchen, 50ml; Firma Becton, Dickinson and Company

#### *3.1.10 Medikamente und sonstige Medizinprodukte*

- Atipamezolhydrochlorid; Firma Pfizer
- Corneregel; Firma Bausch & Lomb
- Ketaminhydrochlorid: Ketanest, Firma Parke-Davis GmbH
- Medetomidinhydrochlorid: Domitor; Firma Zoetis
- Nahtmaterial Prolene; Johnson & Johnson
- Saugtupfer, steril; Firma Kettenbach GmbH & Co. KG
- Tramadol: Tramadol-Ratiopharm, Ratiopharm GmbH

#### *3.1.11 Software*

- Image-Pro Plus 7.0; Firma MediaCybernetics
- Microsoft Office 2011; Firma Microsoft
- Fiji / ImageJ; Open Source

- SAS; Firma SAS Institute
- SPSS 22; Firma IBA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Operationsverfahren

Alle Operationen erfolgten in Übereinstimmung mit der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (39) und nach standardisiertem Operationsverfahren.

Zu jeder Operation wurde ein entsprechendes Protokoll angefertigt und hinterlegt. Erfasst wurden unter anderem Gewicht, Uhrzeit der Gasnarkose, Menge applizierter Anästhetika, Uhrzeit des OP-Beginns, Bezeichnung des randomisiert zugewiesenen Probenmaterials, Zeitpunkt der Probenimplantation und Uhrzeit des OP-Endes sowie eventuell aufgetretene Komplikationen.

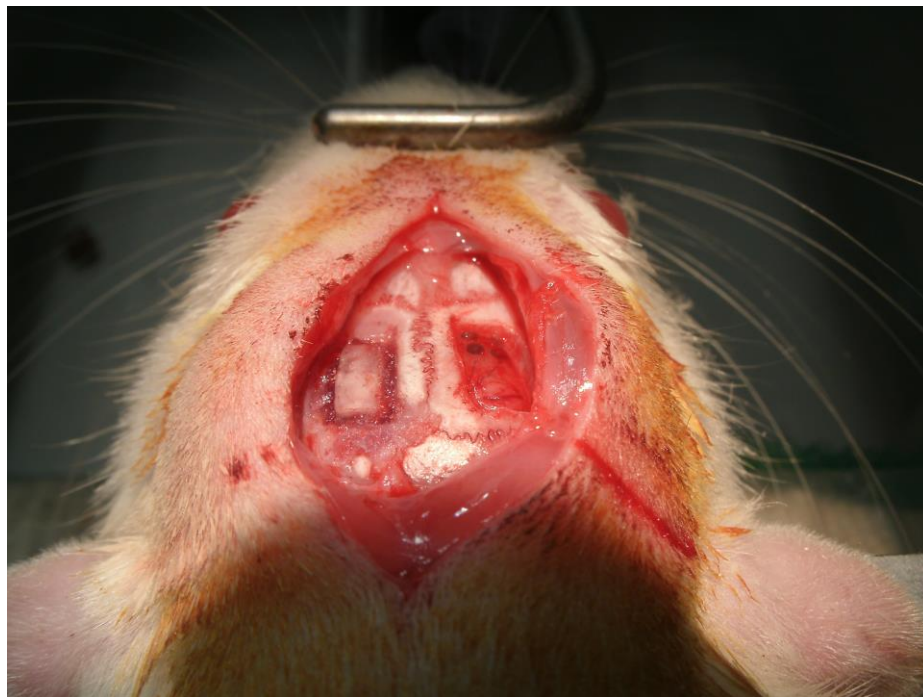
Zunächst wurden die Tiere mittels 5%igem Isofluran narkotisiert, um Stressreaktionen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Injektionsnarkose mit 0,37 mg Medetomidin pro kg Körpergewicht und 70 mg Ketamin pro kg Körpergewicht subkutan (26G Kanüle, 1 ml Einmalspritze). Um Auskühlung zu vermeiden und eine konstante Körpertemperatur von 37° C zu halten, wurde intraoperativ eine Wärmeplatte verwendet und die Körpertemperatur rektal gemessen. Als Vorbeugung gegen eine bei fehlendem Lidschlag mögliche Hornhautaustrocknung wurde prophylaktisch Corneregel® appliziert.

Bei Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe (ausbleibende Reaktion auf Schmerzreiz), wurde der Kopf des Tieres rasiert, in die Stereotaxie eingespannt und anschließend von Stirn bis Nacken gründlich desinfiziert.

Es erfolgte dann, nach einem 2 cm langen Hautschnitt von rostral des Bregmas bis okzipital der Sutura lambdoidea, die chirurgische Präparation bis auf den Schädelknochen. Mithilfe des Rosenbohrers wurde sodann ein Knochenfenster von 6 mm Länge und 4 mm Breite jeweils rechts und links lateral der Sutura sagittalis hergestellt. Zur Durchtrennung der Dura mater und Schonung des Hirnparenchyms wurde vor Durchbrechen der Lamina interna ein Diamantbohrer eingesetzt. Der so

entstandene Knochendeckel wurde zur späteren Reposition abgenommen und aufbewahrt. Es erfolgte dann von okzipital die Punktion der Dura mater und Erweiterung der Punktion auf einen 3 mm messenden Schnitt mittels Mikro-Federschere sowie die Trennung von Dura und Pia mater mittels Uhrmacher-Mikropinzette.

Vor Implantation der zuvor randomisierten Proben wurden diese in 70% und 100% Ethanol jeweils eine Minute desinfiziert und anschließend mit 0,9% Kochsalzlösung gespült. Die Implantation der Proben erfolgte subdural mittels Uhrmacher-Mikropinzette. Zur Vergrößerung der Kontaktflächen wurden pro Implantationsstelle zwei Proben implantiert. Die Probenlage wurde mittels Digitalkamera mit aufliegendem Millimetermaß und Positionsmarkierungen dokumentiert (Abb. 3-1).



*Abb. 3-1: OP-Situs mit ausgeschnittenen Knochenfenstern und rechtsseitig implantierten Elektroden.*

Zum Wundverschluss wurde der zuvor aufbewahrte Knochendeckel reponiert und mit Histoacryl-Kleber fixiert sowie der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten versehen. Nach Entfernung der rektalen Temperatursonde und der Stereotaxie erfolgte eine Antagonisierung mittels 1 mg Atipamezolhydrochlorid pro kg Körpergewicht subkutan. Während der Aufwachphase wurde das Tier über eine Wärmelampe gewärmt, zur postoperativen Analgesie wurde ein Frischwassertopf mit 1mg Tramadol pro ml angeboten (durchschnittliche Dosis 115 mg Tramadol pro kg Körpergewicht pro Tag).

### 3.2.2 Euthanasie

Postoperativ wurden die Tiere randomisierten Gruppen mit definiertem postoperativem Zeitintervall bis zur Euthanasie zugewiesen. Auch hierbei wurden die Tiere zunächst mittels 5%igem Isofluran narkotisiert, um Stressreaktionen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Injektionsnarkose mit  $\geq 0,37$  mg Medetomidin pro kg Körpergewicht und  $\geq 70$  mg Ketamin pro kg Körpergewicht subkutan (26G Kanüle, 1 ml Einmalspritze). Nach Feststellen einer ausreichenden Narkosetiefe, erfolgte die Eröffnung des Abdomens, wobei die Abdominalorgane auf etwaige Krankheitszeichen hin inspiziert wurden. Sodann wurde das Diaphragma inzidiert, wodurch es zu einem vollständigen Kollaps beider Lungen kam. Die folgenden Schritte waren aufgrund der sich durch den Lungenkollaps ergebenden Hypoxiegefahr zeitkritisch und wurden unter Wahrung der notwendigen Sorgfalt zügig durchgeführt. Es erfolgten nun beidseits paraaortale Schnitte, um, nach Luxation des Sternums, Zugang zu Herz und Mediastinalgefäßen zu erhalten. Das Perikard wurde stumpf entfernt und der linke Ventrikel sowie die Aorta dargestellt. Über eine linksventrikuläre Kardiomyotomie wurde eine atraumatische großlumige Kanüle bis in die Aorta ascendens geführt und fixiert. Hierüber wurden zunächst für 30 Sekunden 5°C kalte 0,9%ige NaCl-Lösung infundiert und anschließend eine zuvor vorbereitete 4°C kalte 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) infundiert. Nach etwa 10 Minuten zeigte sich eine ausgeprägte Muskelsteife, welche die vollständige Wirkung anzeigte.

### 3.2.3 Hirnentnahme

Zur Entnahme der Hirne wurde, im Anschluss an die Euthanasie, zunächst die Haut im Bereich des Halses eröffnet und Halsweichteile sowie Halswirbelsäule durchtrennt. Über einen okzipitalen Zugang wurde unter Schonung der Dura mater die kraniale Schädelkalotte entfernt und die Position der zuvor implantierten Proben erneut dokumentiert. Die Hirne wurden, nach Entfernen des übrigen Schädeldaches und Durchtrennung der Hirnnerven, in Gänze entnommen und auf makroskopische Schäden untersucht.

Die so entnommenen Hirne wurden anschließend für 48 Stunden in 4%ige PFA-Lösung gegeben und bei 4°C gelagert. Um Gefrierschäden zu vermeiden, wurden sie

dann in 20%ige Saccharose-Lösung gegeben und so weitere 48 Stunden gelagert. Die folgende Schockfrostung erfolgte mit tiefgekühltem 2-Methylbutan bei  $-78^{\circ}\text{C}$ , sodass die Hirne bis zur Herstellung der Kryoschnitte bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert werden konnten.

#### *3.2.4 Aufbereitung der Gewebeproben*

Die Herstellung der histologischen Schnittpräparate erfolgte im Kryostat bei  $-30^{\circ}\text{C}$ . Hierzu wurden die Hirne mit der kaudalen Seite auf Objektplatten mit Kryostaten-Gel angedrückt und mit Gefrierspray vereist. Von frontal beginnend wurden sodann  $12\ \mu\text{m}$  dicke Transversalschnitte angefertigt.

Insgesamt wurden pro Hirn fünf Objektträger mit je drei Schnitten aufbewahrt, von denen vier für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit anzufertigenden Fluoreszenzfärbungen vorgesehen wurden. Die Auswahl der relevanten Schnittebenen war Gegenstand einer anderen Arbeit und wird daher im vorliegenden nicht weiter beschrieben. Die Objektträger wurden fortlaufend beschriftet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *3.2.5 Färbeverfahren*

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Fluoreszenzfärbung der Gewebeschnitte für folgende Markerproteine festgelegt: Iba1 (Mikroglia), GFAP (Astrozyten) und IL-1B (Entzündungsmediator).

Zur Fluoreszenzfärbung wurden die vorbereiteten Objektträger zunächst für 30 Minuten aufgetaut und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung mit Triton (PBST, 2 ml Triton + 1 l PBS) 5 Minuten lang gespült. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit den Schnitten nach unten zeigend so auf einer Glasplatte positioniert, dass die Objektträger nur an den Rändern Kontakt zu dem erhöhten Rand der Glasplatte hatten. Hierdurch entstand zwischen Objektträgern und Glasplatte ein schmaler Raum, über den eine zuvor hergestellte Lösung aus  $256,5\ \mu\text{l}$  PBST,  $0,0135\ \text{g}$  Bovinem Serum-Albumin (BSA) und  $13,5\ \mu\text{l}$  Normal Donkey Serum (1:20) mittels Kapillarkräften an die Gewebeschnitte herangeführt werden konnte. Die so präparierten Objektträger wurden zur weiteren Inkubation für 30 Minuten in eine mit feuchten Papierhandtüchern gefüllte Färbekammer gegeben.

Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit den Primärantikörpern bei völliger Dunkelheit für 24h bei 3°C in der feuchten Färbekammer inkubiert. Die Lösung für die Primärantikörper bestand aus 251,1 µl PBST, 0,0135 g BSA und 13,5 µl IL-1B (1:20), 2,7 µl GFAP (1:100) sowie für 2,7 µl Iba1 (1:100) pro Objektträger.

Hiernach wurden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in PBST gespült und für die Inkubation mit den Sekundärantikörpern vorbereitet. Hierfür wurde erneut eine Lösung aus 256,5 µl PBST und 0,0135 g Bovinem Serum-Albumin (BSA) hergestellt, zu welcher die Sekundärantikörper hinzugefügt wurden. Für GFAP wurden pro Objektträger 13,5 µl Alexa 647 donkey anti-mouse (1:20), für Iba1 2,7 µl Alexa 568 donkey anti-rabbit (1:100) und für IL-1B Alexa 488 2,7 µl donkey anti-goat (1:100) hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation mit diesen Sekundärantikörpern, erfolgte eine zusätzliche 10-minütige Inkubation mit 270 µl DAPI-Sekundärantikörper (1:1000) pro Objektträger zur Verwendung in einem anderen Projekt.

Zuletzt wurden die Objektträger mit Fluoreszenz-Eindeckmedium und Deckglas versehen und zur weiteren Aufbewahrung in den Kühlschrank gelegt.



### 3.2.6 Bildakquisition – Lichtmikroskopie

Die digitale Bilddatenakquisition erfolgte an einem mit einer Mikroskopkamera versehenen Orthoplan Fluoreszenzmikroskop.

Nach vorangehender Übersicht in 10-facher Vergrößerung und anschließender Auswahl einer repräsentativen Bildregion im exakt unterhalb der Proben gelegenen Kortexareal, wurden Aufnahmen in 25facher Vergrößerung mit den Wellenlängen 490 nm (IL-1B), 578 nm (iba1) und 650 nm (GFAP) angefertigt und mithilfe der Software ImagePro Plus 7.0 unbearbeitet in Grauwerten als TIFF-Dateien mit einer Bittiefe von 12bit gespeichert (Abb. 3-2).

Die Benennung der Dateien folgte zur besseren Zuordenbarkeit einem festgelegten Schema, welches Rückschluss auf Schnitt, Position, Vergrößerung und Färbung zuließ.

Die zusätzlich mit einer Wellenlänge von 358 nm für DAPI-Fluoreszenz angefertigten Aufnahmen, sowie die aus den unbearbeiteten Grauwerten abgeleiteten farbigen Auspielungen der Bilddaten wurden für andere Projekte benötigt und werden daher nicht weiter beschrieben.

### 3.2.7 Computerbasierte Bildanalyse

Die Auswertung der digitalen Bilddaten erfolgte mit dem freien Softwarepaket Fiji (<http://fiji.sc>), welches letztlich auf der Bildbe- und -verarbeitungssoftware ImageJ (<http://imagej.net>) basiert.

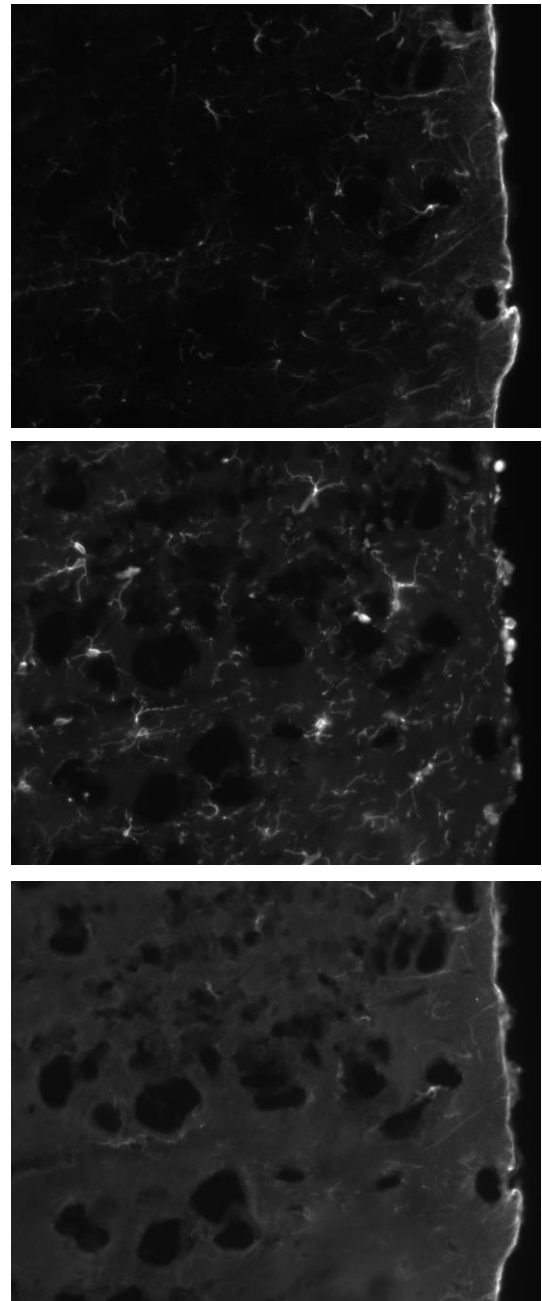


Abb. 3-2: Lichtmikroskopie Färbungen (von oben nach unten: GFAP, IBA1, IL-1B)

Zur Berechnung der zu untersuchenden Maßzahlen wurde in jedem Bilddatensatz ein Grenzwert subjektiv so festgelegt, dass zwischen Hintergrundfärbung und eigentlicher Anfärbung des jeweiligen Markerproteins eine möglichst gute Trennung bestand. Darauf basierend wurde mittels der Software die Fläche berechnet, die für das jeweilige Markerprotein anfärbte. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Kolo-kalisation zwischen den unterschiedlichen Anfärbungen anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten. Hierzu wurde das frei verfügbare Plugin JACoP verwendet (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) (40).

Sämtliche dieser Schritte erfolgten vollständig verblindet für die Gruppenzugehörigkeit in Bezug auf Euthanasiezeitpunkt und implantierte Elektrodenmaterialien.

### *3.2.8 Statistische Verfahren*

Das Datenmanagement und die statistischen Auswertungen erfolgten mit Microsoft Excel, SAS sowie dem SPSS-Softwarepaket (v24, IBM).

Die komplexeren Analysen statistischer Unterschiede in der Expression der betrachteten Marker zwischen den jeweils implantierten Elektrodenmaterialien und den jeweiligen Zeitpunkten nach Implantation erfolgte in SAS mittels eines linearen gemischten Modells. Hierbei wurde auch die Tatsache berücksichtigt, dass jedes Tier zweimal in die Auswertung einfließt, die Tiere untereinander also als unverbundene Stichproben betrachtet werden können, innerhalb derer aber jeweils zwei verbundene Stichproben existieren (innerhalb und außerhalb der Region, welche mit den Proben Kontakt hatte). Als Referenz wurden jeweils die Werte der Stichproben zum Zeitpunkt „Tag 0“, das heißt im nativen Modell ohne subdural implantierte Elektrodenmaterialien, gesetzt. Bei allen statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde gelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kollektiv

Insgesamt konnten in die Auswertung 119 Tiere eingeschlossen werden. Von den eingeschlossenen Tieren wurden 7 zum Zeitpunkt „Tag 0“ ohne subdural implantierte Elektrodenmaterialien eingeschlossen (nativ). Die übrigen verteilten sich wie folgt:

*Tabelle 2: Übersicht und Verteilung der eingeschlossenen Tiere. Hinzu kommen 7 Tiere zum Zeitpunkt „Tag 0“, denen kein Elektrodenmaterial implantiert wurde und als Kontrollgruppe dienen.*

Elektrodenmaterial	Tag 4	Tag 14	Tag 28	Tag 84
sham	19		5	
D0 (polymid)	2	7	10	7
D2 (polymid + diamant)	4	6	9	7
E0 (parylene)	1	5	7	8
E2 (parylene + platin)	2	6	11	7
E4 (polymid + platin)	2	6	9	9
Graph EI	0	6	7	9
Graph Tr	0	6	6	9
PEI BDD	0	0	8	7
PEI-Tr	0	0	8	7

Zweimal wurden andere Elektrodenmaterialien implantiert (M-10 bzw. Q-14), die aufgrund der niedrigen Fallzahl aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden.

### 4.2 Untersuchung der Kolo-kalisation

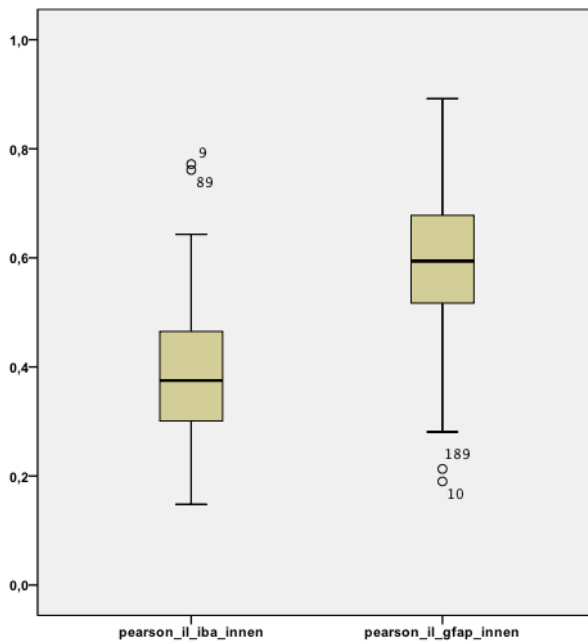
#### 4.2.1 Deskriptive Statistiken und Mittelwertvergleiche

Unabhängig von implantiertem Elektrodenmaterial und postoperativer Verweildauer des Implantates ergab sich für die Parameter der Kolo-kalisation die in Tabelle 3 beschriebene Verteilung der gemessenen Parameter.

*Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Kolo-kalisation ohne Trennung nach Gruppe.*

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Std-Abw.
pearsons_il_iba	0,388	0,148	0,772	0,118
pearsons_il_gfap	0,595	0,190	0,892	0,118

Im gruppenweisen Vergleich ergab sich ein signifikanter Unterschied für die Kolokalisationsparameter zwischen IL/GFAP und IL/IBA ( $p < 0,001$ , Abb. 4-1).



	p-Wert
pearsons_il_iba / pearsons_il_gfap	<0,001

Abb. 4-1: Boxplots für Pearson Korrelationskoeffizienten ohne Trennung nach Gruppen.

Es zeigte somit eine signifikant engere Kolokalisation der Anfärbung von IL-1B mit der Anfärbung von GFAP als von IL-1B mit IBA1.

Auch bei nach implantiertem Elektrodenmaterial oder beobachtetem Zeitpunkt getrennter Betrachtung blieben diese Unterschiede bestehen (Abb. 4-2 und Abb. 4-3).

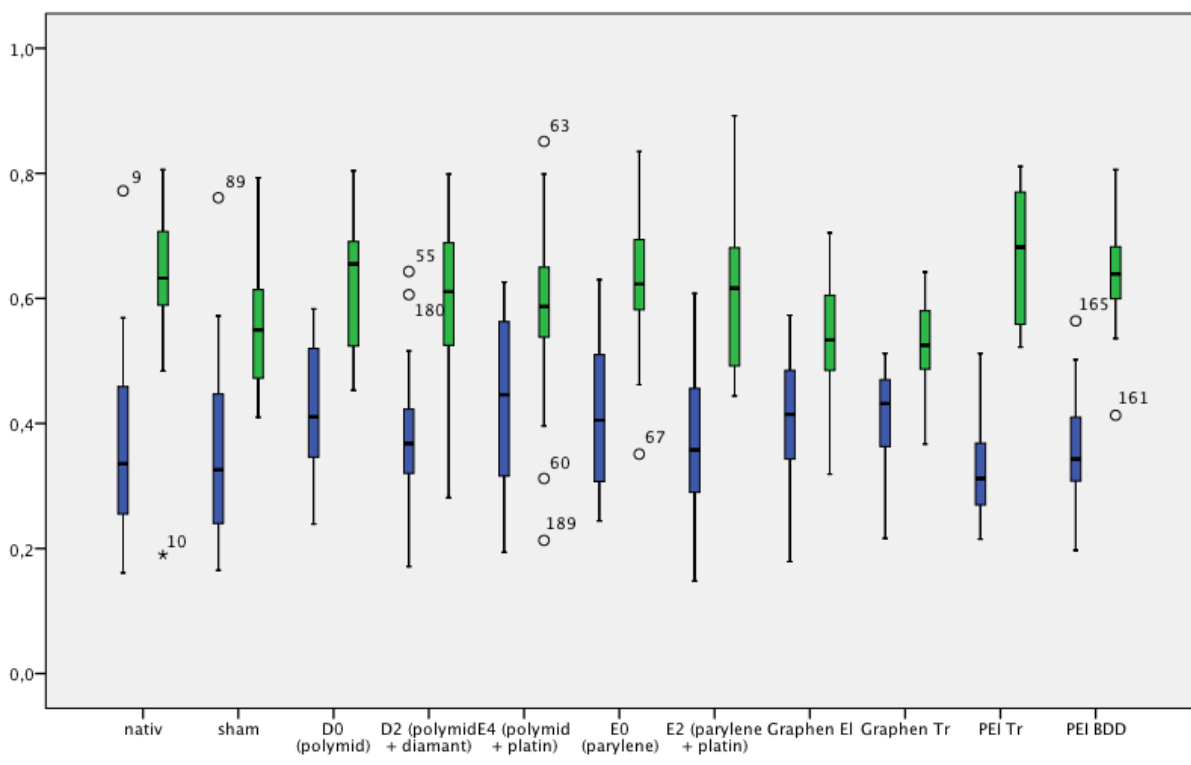


Abb. 4-2: Pearson Korrelationskoeffizienten (*pearson\_il\_iba*: blau, *pearson\_il\_gfap*: grün) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien.

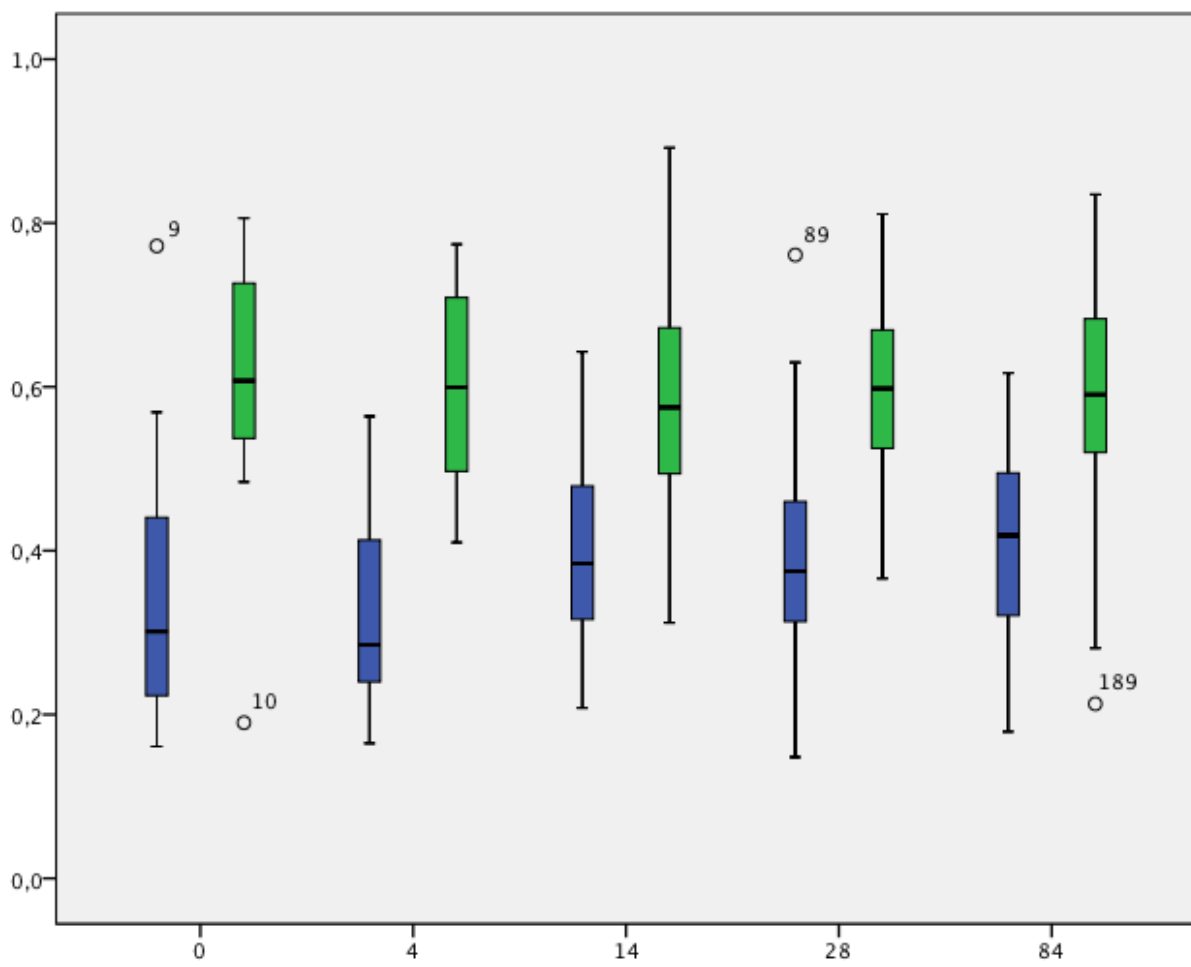


Abb. 4-3: Pearson Korrelationskoeffizienten (*pearson\_il\_iba*: blau, *pearson\_il\_gfap*: grün) getrennt für die jeweiligen beobachteten Zeitpunkte.

Betrachtet man diese Korrelationsparameter nun nach implantiertem Elektrodenmaterial getrennt zu einzelnen Zeitpunkten, ergeben sich ähnliche Verteilungen (Abb. 4-4 und Abb. 4-5).

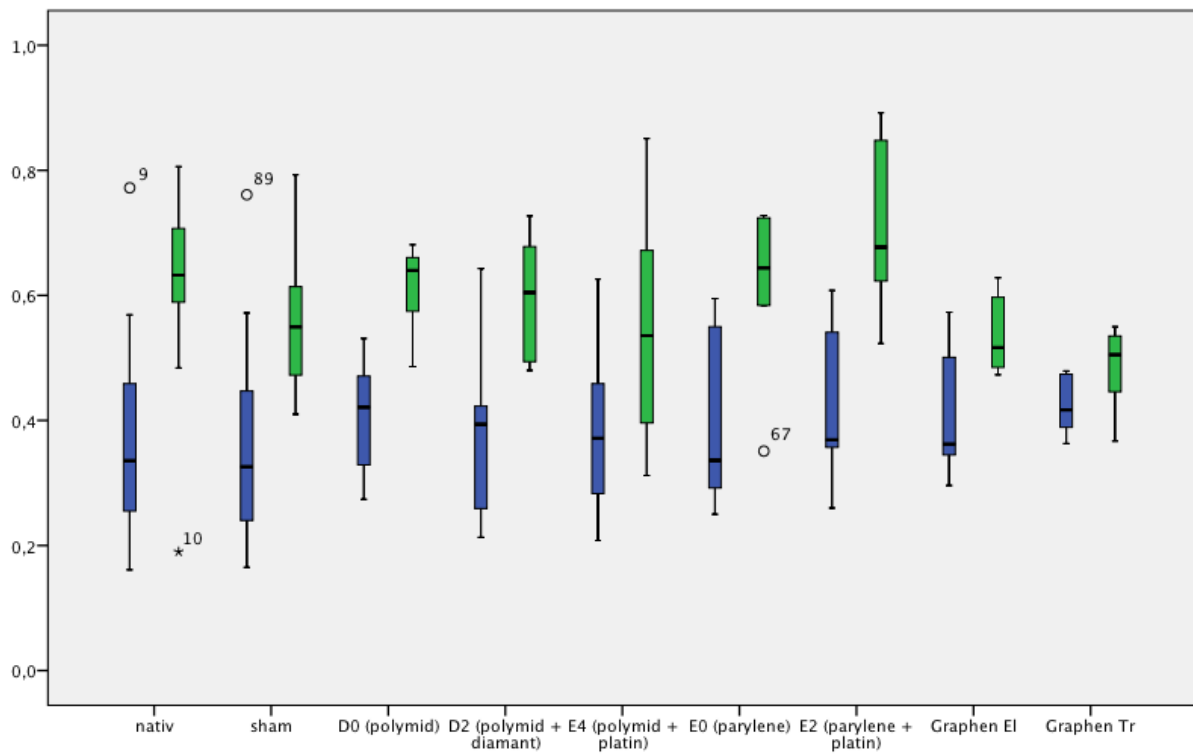


Abb. 4-4: Pearson Korrelationskoeffizienten (*pearson\_il\_iba*: blau, *pearson\_il\_gfap*: grün) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien zum Zeitpunkt „Tag 14“ (jeweils „nativ“ und „sham“ als Vergleichsgruppe).

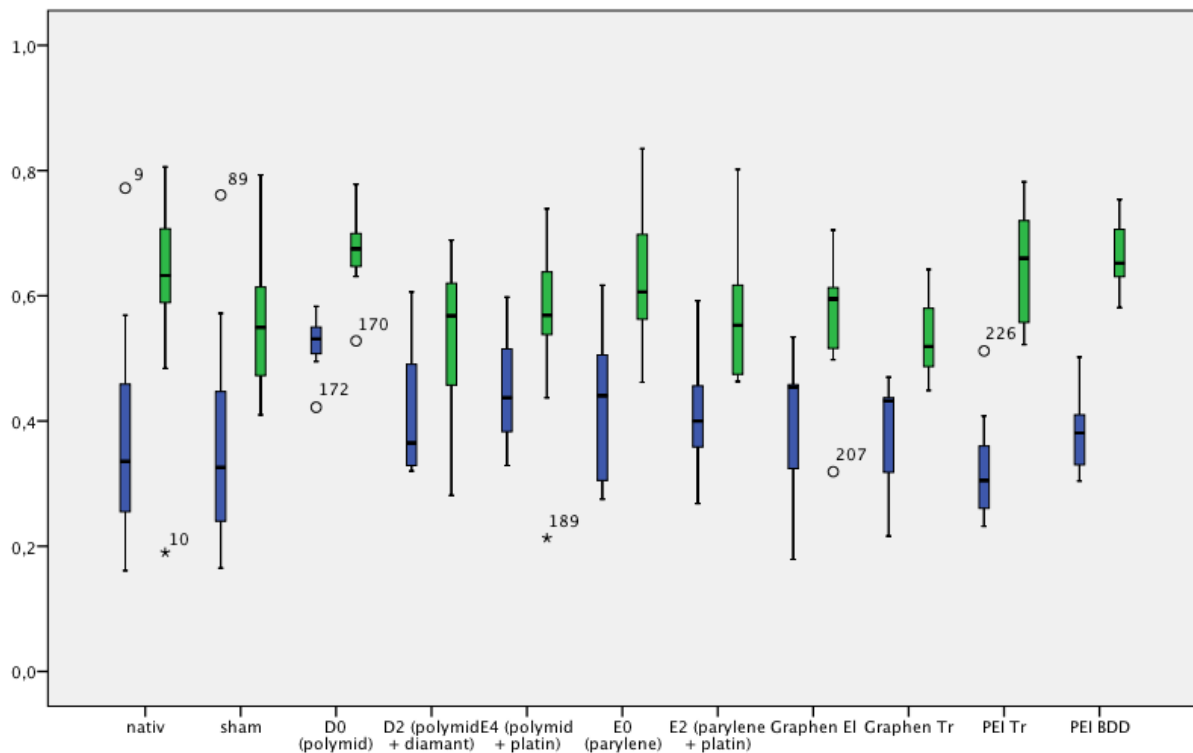


Abb. 4-5: Pearson Korrelationskoeffizienten (*pearson\_il\_iba*: blau, *pearson\_il\_gfap*: grün) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien zum Zeitpunkt „Tag 84“ (jeweils „nativ“ und „sham“ als Vergleichsgruppe).

#### 4.2.2 Lineares gemischtes Modell

Aufgrund der Komplexität der Studie mit einer Vielzahl untersuchter Elektrodenmaterialien und Beobachtungszeitpunkte, lassen sich mit einfachen statistischen Mitteln keine Aussagen treffen, ob eine bestimmte Kombination von implantiertem Elektrodenmaterial und Beobachtungszeitpunkt signifikant von der Vergleichsgruppe „Tag 0“ abweicht. Es wurde daher ein lineares gemischtes Modell angewandt, um wechselwirkende Effekte von Elektrodenmaterial und Beobachtungszeitpunkt zu untersuchen.

Tabelle 4: Globale p-Werte des linearen gemischten Modells für die Parameter der Kolokalisation

	Elektrodenmaterial	Tage
pearsons_il_iba	0,318	0,410
pearsons_il_gfap	0,247	0,937

Bereits die globalen Ergebnisse des linearen gemischten Modelles zeigen keinen signifikanten Einfluss der eingebrachten Elektrodenmaterialien oder untersuchten Zeitpunkte auf das Maß der Kolokalisation der Anfärbungen für die verschiedenen untersuchten Markerproteine. Als Bezugsgruppe dienten jeweils die nativen Tiere. Die ausführlichen Ergebnisse der Datenanalyse finden sich in den folgenden Tabellen.

Tabelle 5: Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für Pearson's Korrelationskoeffizient zwischen IL-1B und IBA1

<b>pearsons_il_iba</b>					
<b>Elektrodenmaterial</b>	Schätzwert	p-Wert	<b>Tag</b>	Schätzwert	p-Wert
sham	-0.00531	0.9143	Tag 4	0.04714	0.3324
D0	0.04922	0.2763	Tag 14	0.04495	0.3354
D2	0.04419	0.3295	Tag 28	0.04222	0.5087
E0	0.03263	0.4796	Tag 84	0.04264	0.2439
E2	0.004789	0.9155			
E4	0.04606	0.3056			
Graph EI	0.05376	0.2533			
Graph Tr	0.05381	0.2491			
PEI Tr	-0.03178	0.5284			
PEI BDD	0.003086	0.9512			

Tabelle 6: Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für Pearson's Korrelationskoeffizient zwischen IL-1B und GFAP

pearsons_il_gfap					
Elektrodenmaterial	Schätzwert	p-Wert	Tag	Schätzwert	p-Wert
sham	-0.05800	0.1802	Tag 4	-0.02540	0.5762
D0	0.006896	0.8659	Tag 14	-0.03119	0.4718
D2	-0.01692	0.6796	Tag 28	-0.01351	0.7398
E0	0.01093	0.7959	Tag 84	-0.02320	0.5725
E2	-0.01148	0.7791			
E4	-0.03194	0.4336			
Graph EI	-0.06998	0.1007			
Graph Tr	-0.08333	0.0511			
PEI Tr	0.05027	0.2685			
PEI BDD	0.02127	0.6389			

### 4.3 Untersuchung der Gesamtfärbung

#### 4.3.1 Deskriptive Statistiken und Mittelwertvergleiche

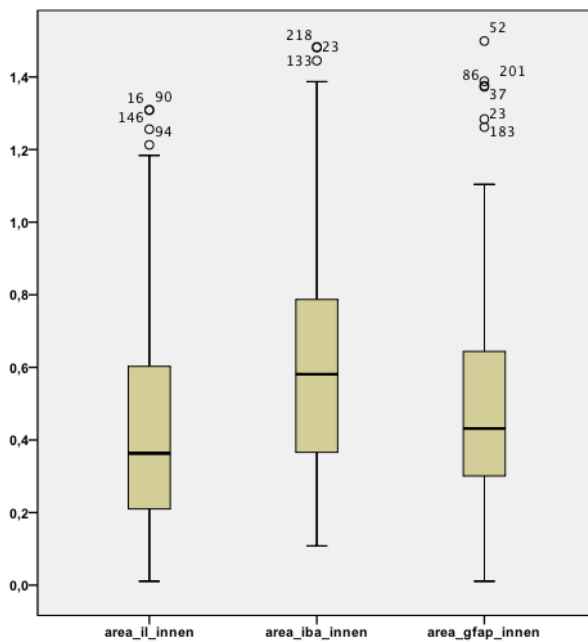
Unabhängig von implantiertem Elektrodenmaterial und postoperativer Verweildauer des Implantates, ergab sich für die Parameter der Gesamtfärbung die in Tabelle 7 beschriebene Verteilung der gemessenen Parameter.

Tabelle 7: Deskriptive Statistik der gemessenen Parameter ohne Trennung nach Gruppe.

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Std-Abw.
area_gfap	0,516	0,011	1,499	0,296
area_iba	0,611	0,108	1,483	0,311
area_il	0,450	0,011	1,330	0,309

Im gruppenweisen Vergleich ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied für die Maße der Gesamtfärbung ( $p < 0,001$ , Abb. 4-6).





	p-Wert
area_il / area_iba	<0,001
area_il / area_gfap	<0,001
area_iba / area_gfap	<0,001

Abb. 4-6: Boxplots für angefärbte Flächen ohne Trennung nach Gruppen.

Betrachtet man die anfärbenden Flächen, so zeigen sich jeweils signifikante Unterschiede zwischen den betrachteten Markerproteinen. Am flächenmäßig stärksten war hier die Anfärbung für IBA1, gefolgt von GFAP und der flächenmäßig geringsten Anfärbung für IL-1B.

Auch bei nach implantierten Elektrodenmaterialien (Abb. 4-7) oder nach beobachteten Zeitpunkten (Abb. 4-8), blieben diese Unterschiede für die angefärbten Flächen bestehen.

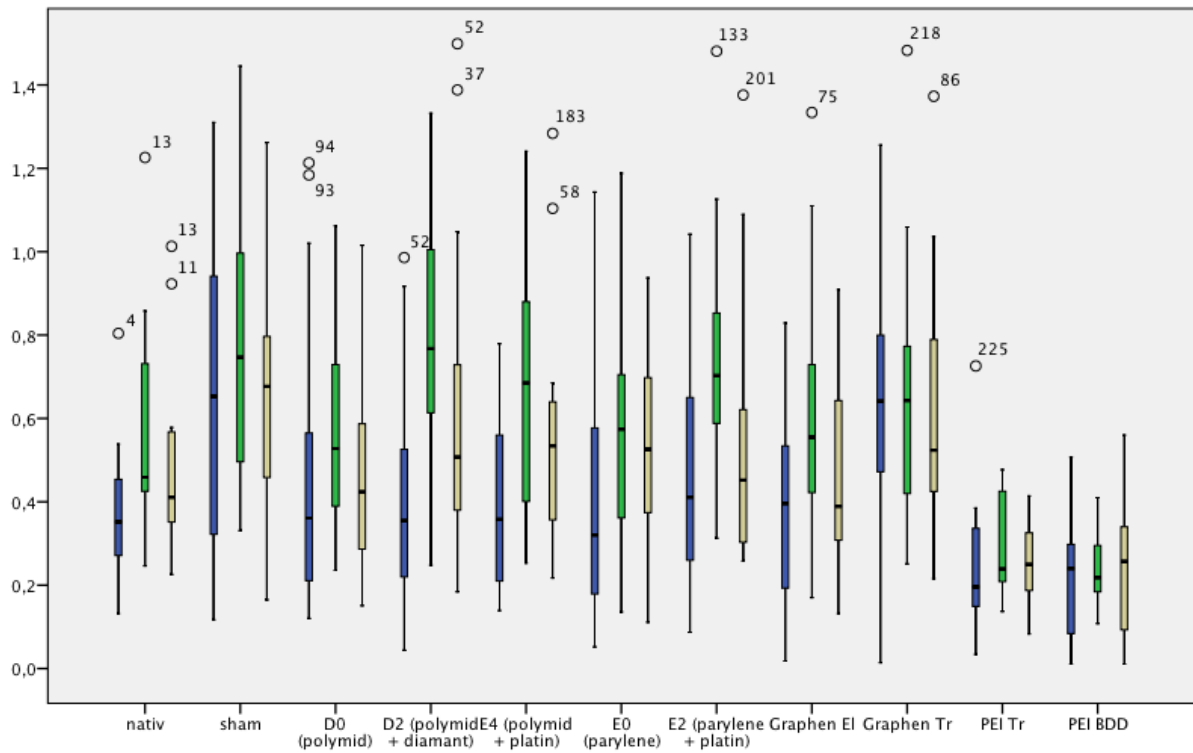


Abb. 4-7: Angefärbte Fläche (area\_il: blau, area\_iba: grün, area\_gfap: gelb) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien.

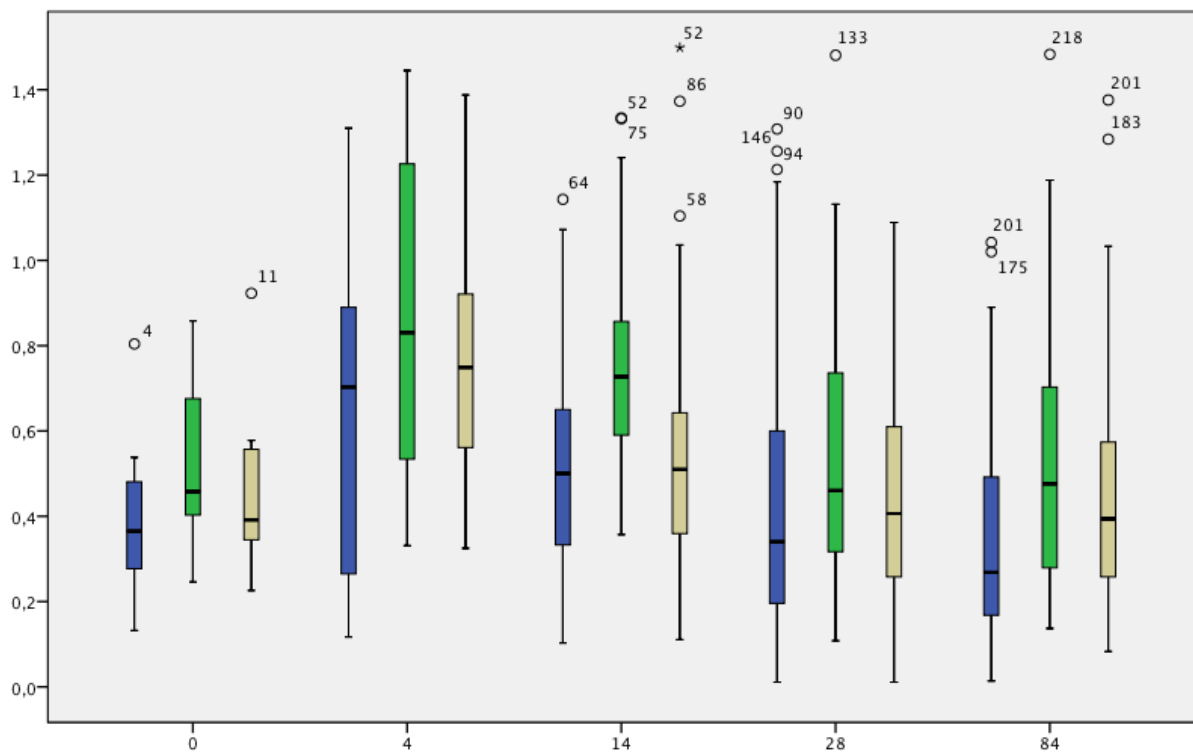


Abb. 4-8: Angefärbte Fläche (area\_il: blau, area\_iba: grün, area\_gfap: gelb) getrennt für die jeweiligen beobachteten Zeitpunkte.

Betrachtet man die Gesamtanfärbung nun nach implantiertem Elektrodenmaterial getrennt zu einzelnen Zeitpunkten ergeben sich ähnliche Verteilungen (Abb. 4-9 und Abb. 4-10).

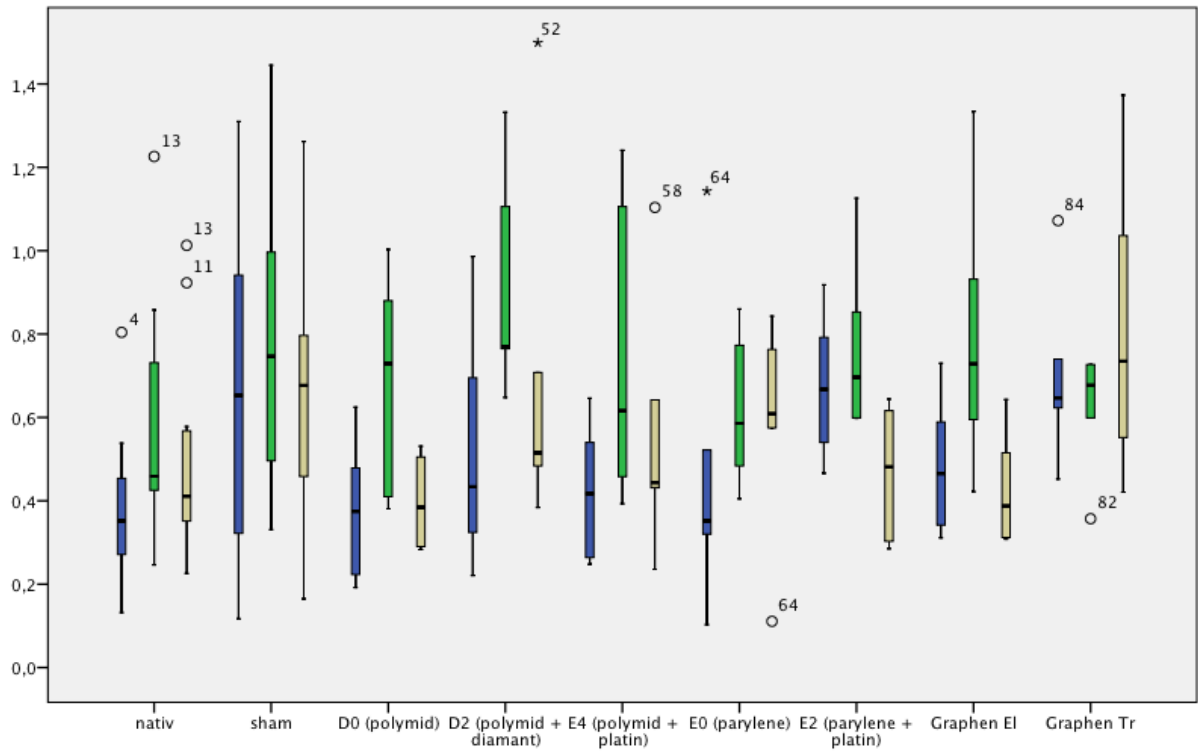


Abb. 4-9: Angefärbte Fläche (area\_il: blau, area\_iba: grün, area\_gfap: gelb) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien zum Zeitpunkt „Tag 14“ (jeweils „nativ“ und „sham“ als Vergleichsgruppe).

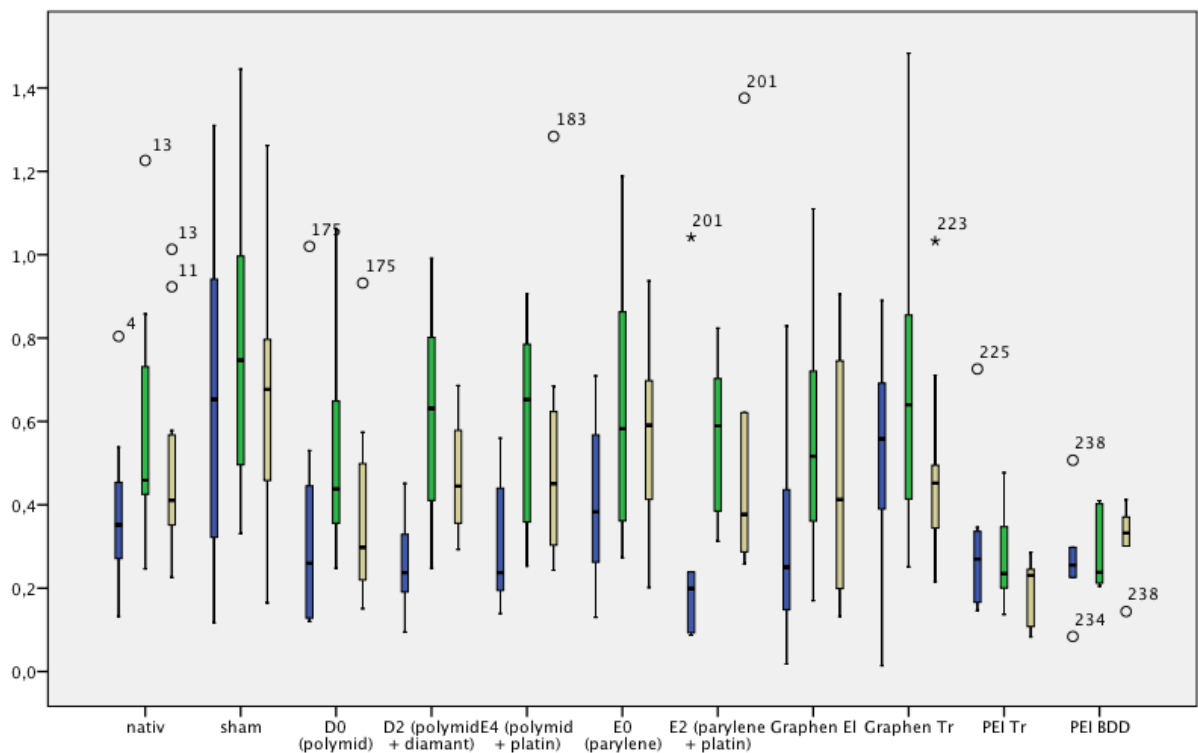


Abb. 4-10: Angefärbte Fläche (area\_il: blau, area\_iba: grün, area\_gfap: gelb) getrennt für die jeweiligen implantierten Elektrodenmaterialien zum Zeitpunkt „Tag 84“ (jeweils „nativ“ und „sham“ als Vergleichsgruppe).

### 4.3.2 Lineares gemischtes Modell

Auch für die Maße der Gesamtfärbung wurde ein lineares gemischtes Modell angewandt, um zu untersuchen, ob eine bestimmte Kombination von implantiertem Elektrodenmaterial und Beobachtungszeitpunkt signifikant von der Vergleichsgruppe „Tag 0“ abweicht.

Tabelle 8: Globale p-Werte des linearen gemischten Modells

	Elektrodenmaterial	Tage
area_gfap	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
area_iba	<u>&lt;0,001</u>	<u>0,001</u>
area_il	<u>&lt;0,001</u>	<u>&lt;0,001</u>

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Koloalisation, zeigen hier die globalen p-Werte einen signifikanten Einfluss sowohl der implantierten Elektrodenmaterialien als auch des Untersuchungszeitpunktes für die Gesamtfärbung. Als Bezugsgruppe dienen auch hier jeweils die nativen Tiere. Die ausführlichen Ergebnisse der Datenanalyse finden sich in den folgenden Tabellen. Auffällig war insbesondere, dass sich eine durchgehende Signifikanz für den Zeitpunkt „Tag 4“ fand, sowie teilweise auch für die Platin-Iridium-Proben.

Tabelle 9: Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für GFAP angefärbte Fläche

area_gfap					
Elektrodenmaterial	Schätzwert	p-Wert	Tag	Schätzwert	p-Wert
sham	0.1416	0.2154	Tag 4	<u>0.2617</u>	<u>0.0321</u>
D0	-0.00024	0.9982	Tag 14	0.02579	0.8115
D2	0.08707	0.4204	Tag 28	-0.07727	0.4487
E0	-0.02118	0.8445	Tag 84	-0.09988	0.3315
E2	-0.02143	0.8412			
E4	-0.01041	0.9220			
Graph EI	-0.08664	0.4235			
Graph Tr	0.03952	0.7135			
PEI Tr	<u>-0.3006</u>	<u>0.0105</u>			
PEI BDD	<u>-0.3097</u>	<u>0.0092</u>			

Tabelle 10: Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für IBA1 angefärbte Fläche

area_iba					
Elektrodematerial	Schätzwert	p-Wert	Tag	Schätzwert	p-Wert
sham	<u>0.2434</u>	<u>0.0301</u>	Tag 4	<u>0.2876</u>	<u>0.0239</u>
D0	0.03572	0.7264	Tag 14	0.1551	0.1695
D2	0.1941	0.0635	Tag 28	-0.02192	0.8363
E0	0.01150	0.9135	Tag 84	-0.03733	0.7264
E2	0.1897	0.0674			
E4	0.07476	0.4719			
Graph EI	0.01626	0.8769			
Graph Tr	0.04134	0.6928			
PEI Tr	<u>-0.2831</u>	<u>0.0128</u>			
PEI BDD	<u>-0.3353</u>	<u>0.0034</u>			

Tabelle 11: Lokale p-Werte des gemischten linearen gemischten Modells für IL-1B angefärbte Fläche

area_il					
Elektrodematerial	Schätzwert	p-Wert	Tag	Schätzwert	p-Wert
sham	<u>0.3173</u>	<u>0.0060</u>	Tag 4	<u>0.3334</u>	<u>0.0052</u>
D0	0.04947	0.6441	Tag 14	0.09821	0.3584
D2	0.04921	0.6550	Tag 28	0.01369	0.8924
E0	0.02769	0.8030	Tag 84	-0.07504	0.4617
E2	0.006439	0.9533			
E4	-0.02005	0.8521			
Graph EI	-0.03090	0.7805			
Graph Tr	0.2031	0.0700			
PEI Tr	-0.1726	0.1430			
PEI BDD	-0.2091	0.0767			

## 5 Diskussion

Bislang konnte sich in der Untersuchung der Biokompatibilität von Neuroimplantaten kein Verfahren zur einfachen und gleichzeitig objektiven Messung der Fremdkörperreaktion durchsetzen. Die in der Literatur überwiegend genutzte Methode zur Evaluation der durch die Implantation ausgelösten Entzündungsreaktion stellt weiterhin die subjektive visuelle Abschätzung dar. Bei Untersuchung großer Datenmengen stellt diese neben einem nicht zu vernachlässigenden Personalaufwand auch eine potentielle Fehlerquelle dar.

In der aktuellen Literatur wurden daher auch verschiedene Methoden zur objektivierten Auswertung verwandt, die aber oft parallel auch einen subjektiven Score verwenden. Eine Vielzahl der verwandten objektiven Ansätze bedarf aber ebenfalls eines erheblichen Aufwandes und könnte daher für große Datenmengen unpraktisch sein. So erfordern Methoden der Vermessung von Fibrose oder axonaler Querschnittsfläche beispielsweise manuelle Querschnittsmessungen oder Planimetrien (26,35). Andere Verfahren wie autoradiographische Verfahren oder vollautomatische Methoden zur Segmentierung der Mikrogila zeigen gute Ergebnisse, setzen aber spezielle Vorbereitungen der Proben voraus (20,37).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine weitere Methode zur einfachen semiautomatischen Untersuchung der Fremdkörperreaktion untersucht werden, die keine weitere Vorbereitung der histologischen Schnitte voraussetzt. Zusätzlich sollte ebenfalls untersucht werden, ob sich Aussagen zum örtlichen Zusammenhang verschiedener Markerproteine im zeitlichen Verlauf der Fremdkörperreaktion treffen lassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fügen sich gut in die Befunde ähnlicher Untersuchungen ein bzw. bestätigen bekannte Befunde und können daher als valide angesehen werden. Generell wird in der Literatur das Maximum der Entzündungsreaktion in der Frühphase nach Implantation subduraler Elektrodenmaterialien beschrieben. Alcaide et al. konnten zeigen, dass die Entzündungsreaktion zum frühesten nach Implantation untersuchten Zeitpunkt höher ist als in Woche 4 (35). Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Befund und zeigen im linearen gemischten Modell als konstantesten Einflussfaktor für Unterschiede in anfärbter Fläche der

jeweiligen Markerproteine „Tag 4“ nach Implantation der Elektrodenmaterialien (bzw. OP im Falle von Sham). D.h. für alle untersuchten Markerproteine zeigt sich eine signifikante Zunahme der angefärbten Fläche für den Zeitpunkt „Tag 4“ im Vergleich zur nativen Kontrolle. Dieser Befund deutet auf eine relevante Aktivierung der Mikroglia und der Astrozyten hin. Reaktive Astrozyten zeigen eine vermehrte GFAP Expression und Hypertrophie, beides würde zu einer entsprechenden Vergrößerung der anfärbenden Fläche führen. Ähnlich verhält es sich für Mikroglia, bei welchen eine Aktivierung zu vermehrter Expression von IBA1 und IL-1B führt, entsprechend ist also eine vergrößerte anfärbende Fläche zu erwarten.

Betrachtet man den Einfluss der verschiedenen Elektrodenmaterial-Gruppen so fällt auf, dass ein Einfluss der „Sham“-Gruppe vorzuliegen scheint. Dies lässt sich aber vor allem so interpretieren, dass in dieser Gruppe Tiere zum Zeitpunkt „Tag 4“ stark überrepräsentiert waren. Darüber hinaus zeigte sich lediglich für die PEI-Gruppen ein signifikanter Einfluss. Auch dieser Befund reiht sich gut in bisher publizierte Ergebnisse ein, die auf eine Überlegenheit der Materialien PEI und BDD hindeuten (32-35).

In der Kolokalisationsanalyse zeigen sich keine signifikanten Einflüsse im gemischt linearen Modell. Es kann daher gesagt werden, dass sich unabhängig von Tag und Elektrodenmaterial keine signifikanten Unterschiede in der Korrelation von IL-1B mit IBA1 bzw. GFAP finden lassen. Auch diese Befunde zeigen die Validität der Methode, da IL-1B vor allem in Mikroglia exprimiert wird, wohingegen eine Expression von IL-1B in Astrozyten weniger zu erwarten wäre. Dies zeigt sich nicht nur im linearen gemischten Modell, sondern auch im direkten einfachen Gruppenvergleich (pearsons\_il\_iba / pearsons\_il\_gfap,  $p < 0,001$ ).

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Methode bekannte Ergebnisse reproduzieren konnte und sich als durchaus valide gezeigt hat. Ein weiterer Vorteil der gewählten Methode besteht darin, dass der benutzte Pearson's Korrelationskoeffizient relativ stabil gegen inkonstante Färbungen oder übermäßige Hintergrundanfärbung ist und im Gegensatz beispielsweise zum Mander's Overlap Coefficient keine Schwellenwerteneinstellung benötigt (38). In der vorliegenden Arbeit war zur semiautomatischen Flächenmessung im betrachteten Bildausschnitt noch eine manuelle Schwellenwerteneinstellung nötig, da in einigen Färbungen eine beträchtliche Hintergrundanfärbung zu verzeichnen war. Es bleibt allerdings zu hoffen, dass, eine

präzise und reproduzierbare Färbung vorausgesetzt, dieser Schritt entfallen könnte bzw. ein konstanter Schwellenwert für alle Schnitte einer Färbung benutzt werden könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierte Methodik könnte daher in Zukunft für effiziente Analysen großer Datenmengen genutzt werden und gleichzeitig objektivere Aussagen ermöglichen, da eine subjektive Bewertung der Bilder überflüssig gemacht werden könnte.



## 6 Zusammenfassung

Üblicherweise erfolgt die Bewertung der Biokompatibilität von Neuroimplantaten bislang anhand subjektiver visueller Abschätzungen der ausgelösten Entzündungsreaktion. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb objektivere Methoden zur Abschätzung der Entzündungsreaktion zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass sich für zwei relevante Parameter auf einfache Weise objektive Ergebnisse gewinnen lassen:

- (1) Bestimmung der Kolo-kalisation verschiedener Markerproteine: Mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten konnte nachgewiesen werden, dass, unabhängig von dem Zeitpunkt der Untersuchung und implantiertem Elektrodenmaterial, das proinflammatorische Zytokin IL-1B in hohem Maße mit der Expression von IBA1 korreliert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass IL-1B von Mikroglia produziert wird und nur in geringerem Maße von Astrozyten.
- (2) Bestimmung der Gesamtanfärbung verschiedener Markerproteine: Mithilfe einer einfachen Schwellenwert-basierten Methode konnte halb-automatisch die in einem Bildausschnitt angefärbte Fläche bestimmt werden. Es konnte so in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen gezeigt werden, dass die durch Mikroglia vermittelte Entzündungsreaktion an früh postoperativen Zeitpunkten am höchsten ist und Platin-Iridium-basierte Elektrodenmaterialien verglichen mit anderen Materialien signifikant weniger Entzündungsreaktion verursachen.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierte Methodik könnte daher insbesondere bei Analyse größerer Datenmengen helfen, potentielle Fehler und den nötigen Personalaufwand bei der subjektiv visuellen Beurteilung von Entzündungsreaktionen nach Implantation unterschiedlicher nano-beschichteter Elektrodenmaterialien zu reduzieren.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Nobunaga AI, Go BK, Karunas RB. Recent demographic and injury trends in people served by the model spinal cord injury care systems. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 1999 Nov;80(11):1372–82.
2. Schmidt EM. Single neuron recording from motor cortex as a possible source of signals for control of external devices. *Ann Biomed Eng*. Kluwer Academic Publishers; 1980;8(4-6):339–49.
3. Li Y-T, Peng C-W, Chen L-T, Lin W-S, Chu C-H, Chen J-JJ. Application of Implantable Wireless Biomicrosystem for Monitoring Nerve Impedance of Rat After Sciatic Nerve Injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 21(1):121–8.
4. Heiduschka P, Thanos S. Implantable bioelectric interfaces for lost nerve functions. *Prog Neurobiol*. 1998 Aug;55(5):433–61.
5. Carmena JM, Lebedev MA, Crist RE, O'Doherty JE, Santucci DM, Dimitrov DF, et al. Learning to control a brain-machine interface for reaching and grasping by primates. Idan Segev, editor. *PLoS Biol*. Public Library of Science; 2003 Nov;1(2):193–208.
6. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A, McNamara JO, et al. *Neuroscience*. Second Edition. Sunderland: Sinauer Associates; 2001.
7. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*. 1996 Apr 15;16(8):2508–21.
8. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res*. John Wiley & Sons, Inc; 2001;65(4):322–31.
9. GIULIAN D, CORPUZ M, CHAPMAN S, MANSOURI M, ROBERTSON C. Reactive Mononuclear Phagocytes Release Neurotoxins After Ischemic and Traumatic Injury to the Central-Nervous-System. *J Neurosci Res*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1993;36(6):681–93.
10. GIULIAN D, BAKER TJ. Characterization of Ameboid Microglia Isolated From Developing Mammalian Brain. *J Neurosci*. Society for Neuroscience; 1986 Aug;6(8):2163–78.
11. Nathaniel E, Nathaniel D. The reactive astrocyte. In: Federoff S, editor. *Advances in cellular neurobiology*. 1981. pp. 249–301.
12. Eng LF, DeArmond SJ. Immunohistochemical studies of astrocytes in normal development and disease. In: Federoff S, editor. *Advances in cellular neurobiology*. Academic Press; 1982. pp. 145–71.
13. Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17(1):133–51.

14. Navarro X, Krueger TB, Lago N, Micera S, Stieglitz T, Dario P. A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. *J Peripher Nerv Syst.* 3rd ed. 2005 Sep;10(3):229–58.
15. Grill WM, Norman SE, Bellamkonda RV. Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions. - PubMed - NCBI. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009 Aug;11(1):1–24.
16. Stieglitz T, Schuettler M, Koch KP. Implantable biomedical microsystems for neural prostheses. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2005 Sep;24(5):58–65.
17. Boretius T, Badia J, Pascual-Font A, Schuettler M, Navarro X, Yoshida K, et al. A transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) to interface with the peripheral nerve. - PubMed - NCBI. *Biosensors and Bioelectronics.* 2010 Sep 15;26(1):62–9.
18. Cheung KC. Implantable microscale neural interfaces. *Biomed Microdevices.* 2007 Dec;9(6):923–38.
19. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods.* 2005 Oct 15;148(1):1–18.
20. Hirshler YK, Polat U, Biegon A. Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol.* 2010 Mar;222(1):42–50.
21. Schendel AA, Eliceiri KW, Williams JC. Advanced Materials for Neural Surface Electrodes. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2014 Dec 1;18(6):301–7.
22. Fattahi P, Yang G, Kim G, Abidian MR. A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces. *Adv Mater Weinheim.* 2014 Mar 26;26(12):1846–85.
23. Ma H, Li D, Sheng X, Zhao B, Chilkoti A. Protein-resistant polymer coatings on silicon oxide by surface-initiated atom transfer radical polymerization. - PubMed - NCBI. *Langmuir.* 2006 Apr;22(8):3751–6.
24. Bridges AW, García AJ. Anti-Inflammatory Polymeric Coatings for Implantable Biomaterials and Devices. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2008 Nov;2(6):984–94.
25. Ereifej ES, Cheng MM-C, Mao G, VandeVord PJ. Examining the inflammatory response to nanopatterned polydimethylsiloxane using organotypic brain slice methods. *J Neurosci Methods.* 2013 Jul 15;217(1-2):17–25.
26. Heo DN, Song S-J, Kim H-J, Lee YJ, Ko W-K, Lee SJ, et al. Multifunctional hydrogel coatings on the surface of neural cuff electrode for improving electrode-nerve tissue interfaces. *Acta Biomater.* 2016 Jul 15;39:25–33.
27. Astolfi L, Guaran V, Marchetti N, Olivetto E, Simoni E, Cavazzini A, et al. Cochlear implants and drug delivery: In vitro evaluation of dexamethasone release. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2014 Feb;102(2):267–73.

28. Keefer EW, Botterman BR, Romero MI, Rossi AF, Gross GW. Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. - PubMed - NCBI. *Nature Nanotech.* 2008 Jun 29;3(7):434–9.
29. Minnikanti S, Pereira MGAG, Jaraiedi S, Jackson K, Costa-Neto CM, Li Q, et al. In vivo electrochemical characterization and inflammatory response of multiwalled carbon nanotube-based electrodes in rat hippocampus. *J Neural Eng.* 2010 Feb;7(1):16002.
30. Shein M, Greenbaum A, Gabay T, Sorkin R, David-Pur M, Ben-Jacob E, et al. Engineered neuronal circuits shaped and interfaced with carbon nanotube microelectrode arrays. *Biomed Microdevices.* 2009 Apr;11(2):495–501.
31. Du X, Wu L, Cheng J, Huang S, Cai Q, Jin Q, et al. Graphene microelectrode arrays for neural activity detection. *J Biol Phys.* 2015 Sep;41(4):339–47.
32. Park J, Show Y, Quaiserova V, Galligan JJ, Fink GD, Swain GM. Diamond microelectrodes for use in biological environments. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2005 Sep;583(1):56–68.
33. Roeser J, Alting NFA, Permentier HP, Bruins AP, Bischoff R. Boron-doped diamond electrodes for the electrochemical oxidation and cleavage of peptides. *Anal Chem.* 2013 Jul 16;85(14):6626–32.
34. Luong JHT, Male KB, Glennon JD. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst.* 2009 Oct;134(10):1965–79.
35. Alcaide M, Taylor A, Fjorback M, Zachar V, Pennisi CP. Boron-Doped Nanocrystalline Diamond Electrodes for Neural Interfaces: In vivo Biocompatibility Evaluation. *Front Neurosci.* 2016;10:87.
36. Kozai TDY, Jaquins-Gerstl AS, Vazquez AL, Michael AC, Cui XT. Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS Chem Neurosci.* 2015 Jan 21;6(1):48–67.
37. Kozlowski C, Weimer RM. An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS one.* 2012;7(2):e31814.
38. Adler J, Parmryd I. Quantifying colocalization by correlation: The Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2010 Mar 30;77A(8):733–42.
39. European Council. European Commission (2010) Directive 2010/63/Eu on the protection of animals used for scientific purposes. 2010.
40. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* Blackwell Publishing Ltd; 2006 Dec;224(Pt 3):213–32.

## Danksagung

Die vorliegende Studie wurde von der medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz als Dissertation angenommen.

Ohne die Mitwirkung zahlreicher Personen und Institutionen hätte die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht realisiert werden können und so möchte ich mich an dieser Stelle für die zahlreich erfahrene Hilfe bedanken.

An allererster Stelle gilt mein besonderer Dank ..... für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Für die vielen fachlichen Hinweise und die vielfältige Unterstützung möchte ich hiermit ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für neurochirurgische Pathophysiologie danken. Insbesondere für die zuverlässige Beratung bei fachlichen Fragen und zahlreichen konstruktiven Anregungen danke ich .....

Des Weiteren möchte ich hiermit auch meinen Dank an die Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) für die gute Beratung und Hilfe hinsichtlich der Auswertung aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben Freunden meinen Eltern, welche mir dieses Studium auf vielfältige Weise erleichtert, ermöglicht und mich immer wieder motiviert haben.

# Lebenslauf