

# Laserbedingte Collagen-Remodellierung in der Basilarmembran bei Mäusen

Gentiana I. Wenzel<sup>1</sup>, Bahman Anvari<sup>3</sup>, Amaan Mazhar<sup>3</sup>, Brian Pikkula<sup>3</sup>, Parmeswaran Diagaradjane<sup>3</sup>, T. Lenarz<sup>1</sup>, John S. Oghalai<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medizinische Hochschule Hannover Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Hannover Deutschland <sup>2</sup> Bobby R. Alford Dept. of Otolaryngology- Head and Neck Surgery, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA <sup>3</sup>Dept. of Bioengineering, Rice University, Houston, TX 77005-1892, USA

## Einleitung

Die Tonotopie der Basilarmembran entsteht durch Variationen in ihrer Masse, Steifigkeit und Dämpfung. Diese biophysikalischen Eigenschaften der Basilarmembran werden durch Collagen Typ II, IV, Proteoglykane, Glycosaminoglykane und adhäsive Proteine (Fibronectin, Laminin) bedingt (Alberts et al. 1994). Nichtablative Laserbestrahlung verschiedener collagenhaltigen Gewebe z.B.: Cornea (Asiyo-Vogel et al. 1997), Haut (Tang et al. 2000), Gelenkkapseln (Hayashi et al. 1997, 2000), Mediales kollaterales Ligament (Fung et al. 2002) führt sowohl zur Verdickung der schon existierenden Collagenfasern als auch zur Neubildung von Collagenfibrillen (Collagen-Remodellierung). Als Folge der Collagen-Remodellierung verändern sich die biophysischen Eigenschaften der betreffenden Gewebe. Ziel unserer Studie war zu zeigen ob auch in der Basilarmembran durch Laserbestrahlung Collagen-Remodellierung induziert werden kann. Diese Methode könnte neue Therapieansätze zur Veränderung der Tonotopie der Cochlea eröffnen.

## Material und Methode

C57-Mäuse wurden narkotisiert, die Bulla eröffnet und die Rundfenstermembran exponiert. Die *Scala Tympani* wurde durch die Rundfenstermembran mit exogenem Chromophor (Trypan-Blau,  $\lambda_{\max}$ : 607 nm) perfundiert. Anschließend wurde die Cochlea mit einem 600 nm Pulsed-dye-Laser (15 J/cm<sup>2</sup> oder mit 180 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Die intraoperative FAEP-Messung diente zur elektrophysiologischen Kontrolle der Laserbestrahlungseffekte. 14-16 Tage postoperativ wurden die FAEP's erneut gemessen, die Tiere danach getötet und die Cochleae nach Fixation und Entkalkung für Polarisationsmikroskopie bzw. für Elektronmikroskopie spezifisch aufgearbeitet. Die Quantifizierung der Collagen-Remodellierung erfolgte indirekt durch die Analyse der Birefringenz in mit Picosiriusrot gefärbten Paraffinschnitten, und wurde in elektromikroskopischen Präparationen bestätigt.

## Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten nach Laserbestrahlung eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ), dosisabhängige Birefringenzänderung der Basilarmembran (Abb.1).

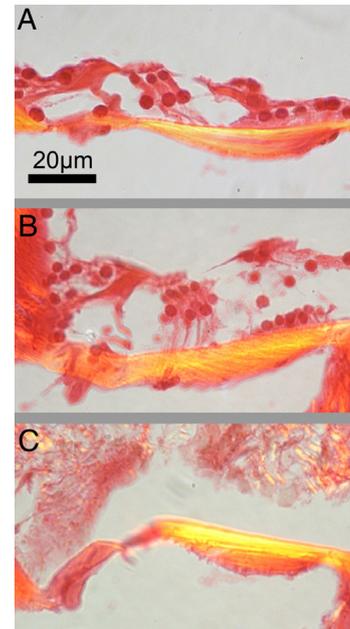


Abb. 1. Beispiele von laserinduzierten Birefringenzänderung in der Basilarmembran anhand von Picosiriusrot gefärbten Paraffin-schnitten: (A) nicht bestrahlte Cochlea; (B) Cochlea 2 Wochen nach Bestrahlung mit 15J/cm<sup>2</sup>; (C) Cochlea 2 Wochen nach Bestrahlung mit 180J/cm<sup>2</sup>.

Die Neubildung von Collagenfasern konnte mit Hilfe der elektron-mikroskopischen Untersuchung der bestrahlten Cochlea bestätigt werden (Abb. 2).

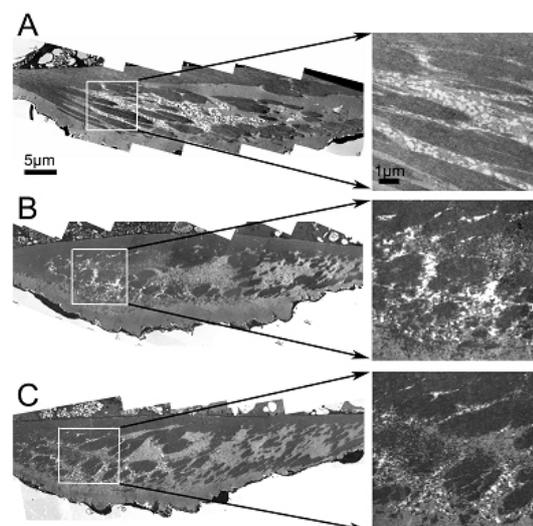


Abb. 2. Elektromikroskopische Aufnahmen von (A) einer nicht bestrahlten Cochlea, (B) einer Cochlea 2 Wochen nach Bestrahlung mit 15J/cm<sup>2</sup> und (C) einer Cochlea 2 Wochen nach Bestrahlung mit 180J/cm<sup>2</sup>.

Als unerwünschter Nebeneffekt war in den mit 180 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Cochleae, eine fibrotische Reaktion festzustellen. Die dosisabhängige FAEP-Schwellerhöhung betrug 20-25dB bei 15 J/cm<sup>2</sup> und 40-50 dB bei 180 J/cm<sup>2</sup> (Abb. 3).

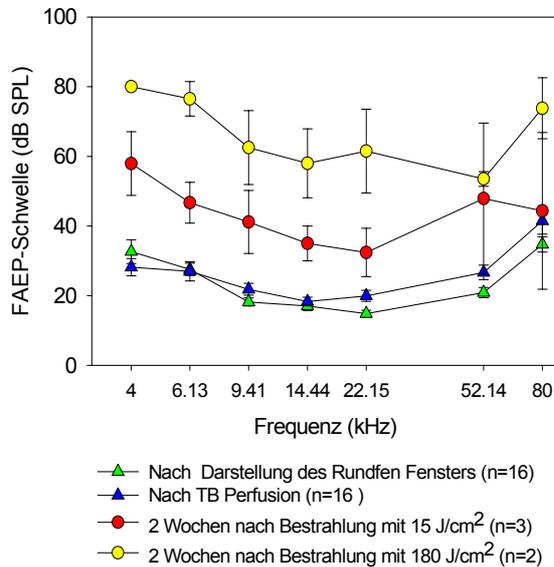


Abb. 3 Einfluss der Laserbestrahlung auf die FAEP-Schwelle

## Diskussion

Die Collagen-Remodellierung in der Basilarmembran kann durch Laserbestrahlung induziert werden. Durch laserinduzierte Collagen-Remodellierung wird die Steifigkeit der Ligamente erhöht (Fung et al.2002). Gezielte, laserinduzierte Veränderungen der Steifigkeit könnten somit die mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran und damit auch die tonotopische Mappe der Cochlea verändern. In Vorstudien (Wenzel et al. 2004) konnte anhand von Computer-Modellbildungen gezeigt werden, dass eine Verdoppelung der Steifigkeit der Basilarmembran zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz um einen Faktor von 1,5 bewirken würde. Eine potentielle Anwendung dieser Methode wäre zur Therapie der Hoch-

tonschwerhörigkeit. Die Verlorenen hohen Frequenzen könnten durch Laserbestrahlung aus dem noch funktions-tüchtigen Tieffrequenten Bereich zurückgewonnen werden. Zur Etablierung dieser Methode bedarf es jedoch einer Optimierung der Laser-Chromofor Kombination und einer Minimierung der Nebenwirkungen.

## Literatur

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. Publishing G, editor. New York. 1994.
- Asiyo-Vogel M. N., Brinkmann R., Notbohm H., Eggers R., Lubatschowski H., Laqua H. Vogel A. (1997) Histologic analysis of thermal effects of laser thermokeratoplasty and corneal ablation using Sirius-red polarization microscopy. J Cataract Refract Surg 23(4), 515-526
- D. T. Fung, G. Y. Ng, M. C. Leung and D. K. Tay, (2002) Therapeutic low energy laser improves the mechanical strength of repairing medial collateral ligament. Lasers Surg. Med. 31(2), 91-96
- Hayashi K., Nieckarz J. A., Thabit G. 3rd, Bogdanske J. J., Cooley A. J., Markel M. D., (1997) Effect of nonablative laser energy on the joint capsule: an in vivo rabbit study using a holmium:YAG laser. Lasers Surg. Med. 20(2), 164-171
- Hayashi K., Hecht P., Thabit G. 3rd, Peters D. M., Vanderby R., Cooley Jr., A. J, G. S. Fanton, J. F. Orwin and M. D. Markel, (2000) The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model. Clin Orthop Relat Res 373, 265-276
- Tang J., Zeng F., Savage H., Ho P. P and Alfano R. R, (2000) Fluorescence spectroscopic imaging to detect changes in collagen and elastin following laser tissue welding. J. Clin. Laser Med. Surg. 18(1), 3-8
- Wenzel G. I., Pikkula B., Choi C. H., Anvari B., Oghalai J. S., (2004) Laser irradiation of the guinea pig basilar membrane. Lasers Surg. Med. 35(3), 174-180