

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. B. Schick

Laser induzierte Geweberemodellierung des Trommelfells

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von:

Sophie Anabel Leonora Schacht

geb. am: 24.11.1989 in Mainz

Tag der Promotion: 17.05.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gentiana Wenzel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Henning Madry

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner Hemmert

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung der Dissertation.....	5
1.1 Deutsche Zusammenfassung	5
1.2 Abstract.....	6
2 Einleitung	7
2.1 Das Hörorgan	9
2.1.1 Anatomie des Hörorgans	9
2.1.2 Physiologie des Hörorgans	14
2.2 Ursachen und Klassifizierung von Hörstörungen.....	15
2.2.1 Schalleitungsschwerhörigkeit.....	16
2.3 Akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, acoustically evoked auditory brainstem response (AABR).....	17
2.4 Laserbestrahlung von Membranen	18
2.5 Piko-Siriusrot-Färbung und Polarisationsmikroskopie	19
2.6 Transmissionselektronenmikroskopie	20
2.7 Zielsetzung.....	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Versuchstiere	22
3.1.2 Narkose.....	24
3.1.3 Operation	25
3.1.4 Hirnstammaudiometrie (AABR)	26
3.1.5 Laserbestrahlung.....	27
3.1.6 Histologie	28
3.1.7 Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie	29
3.1.8 Elektronenmikroskopie.....	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Messung akustisch evozierter auditiver Hirnstammpotentiale (AABR)	33
3.2.2 Laserbestrahlung.....	36
3.2.3 Gewinnung und Aufarbeitung des Felsenbeins	37

3.2.4 Färbemethoden	39
3.2.5 Durchlichtmikroskopie	41
3.2.6 Polarisationsmikroskopie.....	43
3.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	44
3.2.8 Statistische Auswertung	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Effekte der Lasertherapie auf das Hörvermögen der Tiere.....	47
4.1.1 Klick-Hirnstammaudiometrie	47
4.1.2 Frequenzspezifische Hirnstammaudiometrie.....	48
4.2 Durchlichtmikroskopie.....	49
4.2.1 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Gewebezunahme des TFs.....	49
4.2.2 Einfluss des Bestrahlungsfokus auf die Gewebezunahme des TFs der unterschiedlichen TF-Schnittebenen	57
4.3 Polarisationsmikroskopie	59
4.3.1 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Birefringenz des TFs.....	59
4.3.2 Einfluss des Bestrahlungsfokus auf die Birefringenz des TFs der unterschiedlichen TF-Schnittebenen	67
4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	69
5 Diskussion.....	71
5.1 Auswirkung der Bestrahlungsintensität auf die Gewebeneubildung bzw. Kollagenremodellierung des TFs.....	71
5.2 Zeitabhängige Entwicklung der Gewebeneubildung bzw. Kollagenremodellierung des TFs.....	72
5.3 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Hörleistung	73
5.4 Bestrahlung eines definierten TF-Areals zur lokalen Kollagenremodellierung.....	73
5.5 Bestrahlung atropher oder atelektatischer TF-Areale zur Stabilisierung des Gewebes	74
5.6 Fazit.....	74
6 Literaturverzeichnis	76
7 Publikationen	83

8 Danksagung..... 84

9 Lebenslauf 85

Abkürzungsverzeichnis

1 Zusammenfassung der Dissertation

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Laser-induzierte Geweberemodellierung des Trommelfells

Erkrankungen des Mittelohres, wie rezidivierende Mittelohrentzündungen, führen im klinischen Alltag häufig zu einer Schwächung der Trommelfellspannung, gefolgt von Schalleitungsschwerhörigkeit und möglicher Bildung eines Adhäsivprozesses. Die Therapie der Wahl ist aktuell ein operativer Eingriff (Tympanoplastik) zur Stabilisierung des geschwächten Trommelfells, der mit einem großen operativen Aufwand und hohen Krankenhauskosten einhergeht. Mit dem Hintergrund eine alternative Therapie zu entwickeln, war das Ziel der hier vorgestellten Studie die experimentelle Durchführung einer nicht-invasiven Stabilisierung des Trommelfells mittels Laserbestrahlung im Tiermodell. Hierbei sollte die Auswirkung verschiedener Laserparameter auf die Geweberemodellierung des Trommelfells am Beispiel eines Mausmodells erfolgen. Dazu wurden an CD1 Mäusen ($n = 79$) das Trommelfell beider Ohren exponiert und auf einen Teil des Trommelfells (posteriorer oberer Quadrant) das Pigment Fuchsin aufgetragen, um eine gezielte lokal begrenzte Wirkung der Bestrahlung zu gewährleisten. Beim linken Ohr wurde jeweils ein ca. $500 \mu\text{m}$ großer Bereich des pigmentierten Trommelfells für 30 s mit 532 nm Laserpulsen von 10 mW ($5 \mu\text{J}$), 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) oder 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bei 2 kHz Pulsfrequenz bestrahlt, wobei das unbestrahlte Gegenohr hierbei als Kontrolle diente. Auditorische Hirnstammpotentialen wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten abgeleitet um die Auswirkungen der Bestrahlung auf das Hörvermögen der Tiere zu überprüfen. Die Felsenbeine wurden daraufhin explantiert um strukturelle Veränderungen des Trommelfells in histologischen Untersuchungen zu evaluieren. Eine Zunahme der Dicke des Trommelfells konnte bereits ab der zweiten Woche nach der Laserbehandlung demonstriert und eine Erhöhung der Polarisation des Trommelfells ab Woche vier festgestellt werden. Direkt nach der Bestrahlung kam es zu keiner Verschlechterung der Hörschwellen. In dieser präklinischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Kollagenremodellierung und –neubildung durch Laserbestrahlung in einem vordefinierten Bereich des Trommelfells induziert werden konnte. Es ist die erste Studie ihrer Art, welche sich mit der histologischen Analyse des Trommelfells nach Laserbestrahlung beschäftigt. Die

Ergebnisse bieten das Potential als Grundlage für zukünftige Studien zur Wiederherstellung der Trommelfellspannung als Alternative zur etablierten, invasiv operativen Therapie der Trommelfellstabilisierung. [70]

1.2 Abstract

Laser-induced tissue remodeling within the tympanic membrane

Middle ear diseases, such as recurrent otitis media, often lead to a weakening of the tympanic membrane tension, followed by conductive hearing loss and the possible formation of an adhesive process. The therapy of choice is currently a surgical procedure (tympanoplasty) to stabilize the weakened eardrum, which is associated with a high level of surgical effort and high hospital costs. With the background of developing an alternative therapy, the aim of the study presented here was the experimental implementation of a non-invasive stabilization of the eardrum using laser radiation in an animal model. The effect of various laser parameters on tissue remodeling of the eardrum should be evaluated on the example of a mouse model. For this purpose, the eardrum of both ears was exposed on test CD1 mice ($n = 79$) and the pigment fuchsin was applied to part of the eardrum (posterior upper quadrant) in order to ensure a targeted, locally limited effect of the radiation. In the left ear, an area of approximately $500 \mu\text{m}$ of the the pigmented eardrum was irradiated for 30 s with 532 nm laser pulses of 10 mW (5 kJ), 25 mW (12.5 kJ) or 50 mW (25 kJ) 2 kHz pulse frequency, the unirradiated counter ear serving as a control. Auditory brainstem potentials were derived at three different times to evaluate the effects of radiation on the hearing of the animals. The petrous bones were then explanted to evaluate structural changes to the eardrum in histological examinations. An increase in the thickness of the tympanic membrane was demonstrated as early as the second week after the laser treatment and an increase in the polarization of the eardrum was observed from week four. The hearing thresholds did not increase immediately after the radiation. In this pre-clinical study, it could be shown that targeted collagen remodeling and regeneration by laser radiation could be induced in a predefined area of the tympanic membrane, which indicates regeneration of the eardrum. It is the first study of its kind to deal with the histological analysis of the eardrum after laser treatment. The results offer the potential to serve as a basis for future studies to restore the tympanic membrane as an alternative to the established, invasive operative therapy of tympanic membrane stabilization. [71]

2 Einleitung

Das Trommelfell (TF) separiert den äußeren Gehörgang vom Mittelohr [73]. Seine Funktion ist es den Schall an die Gehörknöchelchenkette weiter zu leiten und zu verstärken (siehe (s). 2. 1. 2). Diese Funktion wird durch die Struktur des TFs und damit verbundene Spannkraft des TFs gewährleistet. Aufgrund chronischer Ventilationsstörungen des Mittelohres, sowie rezidivierender Perforationen des TFs (iatrogen nach Einlage einer Paukendrainage oder nach spontaner Perforation bei einer Mittelohrentzündung) kommt es gehäuft zur Ausbildung von atrophen Narben. Abhängig von einer Minderbelüftung der Paukenhöhle, zum Beispiel (z.B.) durch eine chronische Tubenventilationsstörung, sowie der Größe der atrophen Areale kann es nun zu einer Schalleitungsstörung, zu einer Atelektase der Paukenhöhle oder zur Ausbildung von Cholesteatomen, sogenannten (sog.) Knocheneiterungen, kommen [45, 65, 69, 86, 90]. Bei letzterem können in ausgeprägten Krankheitsfällen eine sensorineurale Hörminderung, eine Verletzung des Gesichtsnervs, eine Störung des Gleichgewichtsorganes oder sogar eine Verletzung der Hirnhaut mit Otoliquorrhoe auftreten [48]. Um die Entstehung solcher Pathologien zu verhindern, wird aktuell eine operative Sanierung des TFs, gegebenenfalls (ggf.) auch der Gehörknöchelchenkette im Sinne einer Tympanoplastik [48], sowie eine Optimierung der Mittelohrventilation (s. 2.2) durchgeführt.

Da operative Interventionen zahlreiche Komplikationen wie beispielsweise (bspw.) Blutung, Entzündungsreaktionen und Verletzung umliegender Strukturen (Gesichtsnerv, Hörschnecke, Gleichgewichtsorgan, Hirnhaut mit Hirnstrukturen) nach sich ziehen können, wird die Etablierung von alternativen, weniger invasiven Therapiemethoden angestrebt. Zudem werden ein ambulantes Setting, sowie eine Reduktion der Anzahl an Vollnarkosen zunehmend attraktiver.

Die Möglichkeit der Stabilisierung eines Gewebes durch Laser-induzierte Kollagenneubildung konnte bereits an anderen Gewebearten im Bereich der Orthopädie und Dermatologie demonstriert werden (s. 2.4) [21, 28, 81]. Wenzel *et alii* (*et al.*) [90] konnten an der Basilmembran des Innenohres durch Laserirradiation eine Kollagenremodelierung induzieren um eine Versteifung der Basilmembran zu erreichen. Kurokawa und Goode [45] führten eine der ersten Studien durch, in der bei TFen mit atrophen Narben durch Laserbestrahlung eine Kontraktion des Gewebes gezeigt werden konnte. Es handelte sich hierbei um explantierte Felsenbeine männlicher humaner Leichen. Eine Analyse des Gewebes im Rahmen einer histologischen Aufarbeitung erfolgte jedoch nicht. Ostrowski

und Bojrab [60], Brawner *et al.* [13] und Ryan und Kaylie [69] bestrahlten in klinischen Studien menschliche atelektatisch veränderte TFe. Hier konnten klinisch Verkleinerungen der Retraktionstaschen der TFe gezeigt werden. Maßgeblich für das Ergebnis der Behandlung in allen Studien war das Stadium der Atelektase. Eine Behandlung im Anfangstadium der Pathologie zeigte klinisch ein deutlich besseres Ergebnis als bei ausgeprägten Befunden. Eine histologische Aufarbeitung erfolgte auch hier nicht. Eine klinische Etablierung der Technik blieb aufgrund fehlender weiterer Studien mit weiterführenden Analysen aus.

Zur möglichen Etablierung eines klinischen Therapiekonzeptes, war das Ziel dieser Doktorarbeit anhand eines Tiermodells die Bestrahlung eines gezielten Bereiches des Trommelfells mittels Laser durchzuführen um eine Kollagenremodellierung eines vordefinierten Areal des Trommelfells zu induzieren und anschliessend diese histologisch zu charakterisieren. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit histologische und elektrophysiologische Analysen von unterschiedlich applizierten Laserintensitäten ausgeführt, sowie akute und chronische Effekte der Bestrahlung auf das Gewebe betrachtet. Zudem konnte durch das gezielte Auftragen eines Pigmentes auf einen definierten Bereich des Trommelfells die applizierte Laserintensität niedrig gehalten werden um dadurch umliegendes Gewebe zu schonen. Dies ermöglichte die Kollagenremodellierung in einem festgelegten Bereich unter Schonung des umliegenden Trommelfells.

Eine zukünftige Anwendung dieses minimal invasiven Therapiekonzeptes im klinischen Alltag erscheint, nach weiteren elektrophysiologischen Studien, zur Behandlung von frühen Stadien der atrophen Trommelfellnarben erfolgsversprechend. Hierdurch könnte es zu einer deutlichen Reduktion von Komplikationen dieser Pathologie, sowie zu einem Rückgang aufwändiger operativer Eingriffe kommen.

2.1 Das Hörorgan

2.1.1 Anatomie des Hörorgans

Das auditorische System der Säugetiere teilt sich in einen peripheren und einen zentralen Anteil auf. Hierbei spiegelt das eigentliche Hörorgan, bestehend aus dem äußeren Ohr (*Auris externa*), dem Mittelohr (*Auris media*) und dem Innenohr (*Auris interna*), den peripheren Anteil wider (Abbildung (Abb. 1)). Der zentrale Anteil, die sog. Hörbahn, beginnt im Corti-Organ des Innenohrs, geht über den Hörnerv (*Nervus cochlearis*) in Teile des Hirnstammes und von dort schließlich zum primären auditorischen Cortex. [73]
Im Folgenden wird insbesondere auf den peripheren Anteil des auditorischen Systems das Hörorgan eingegangen [73, 74].

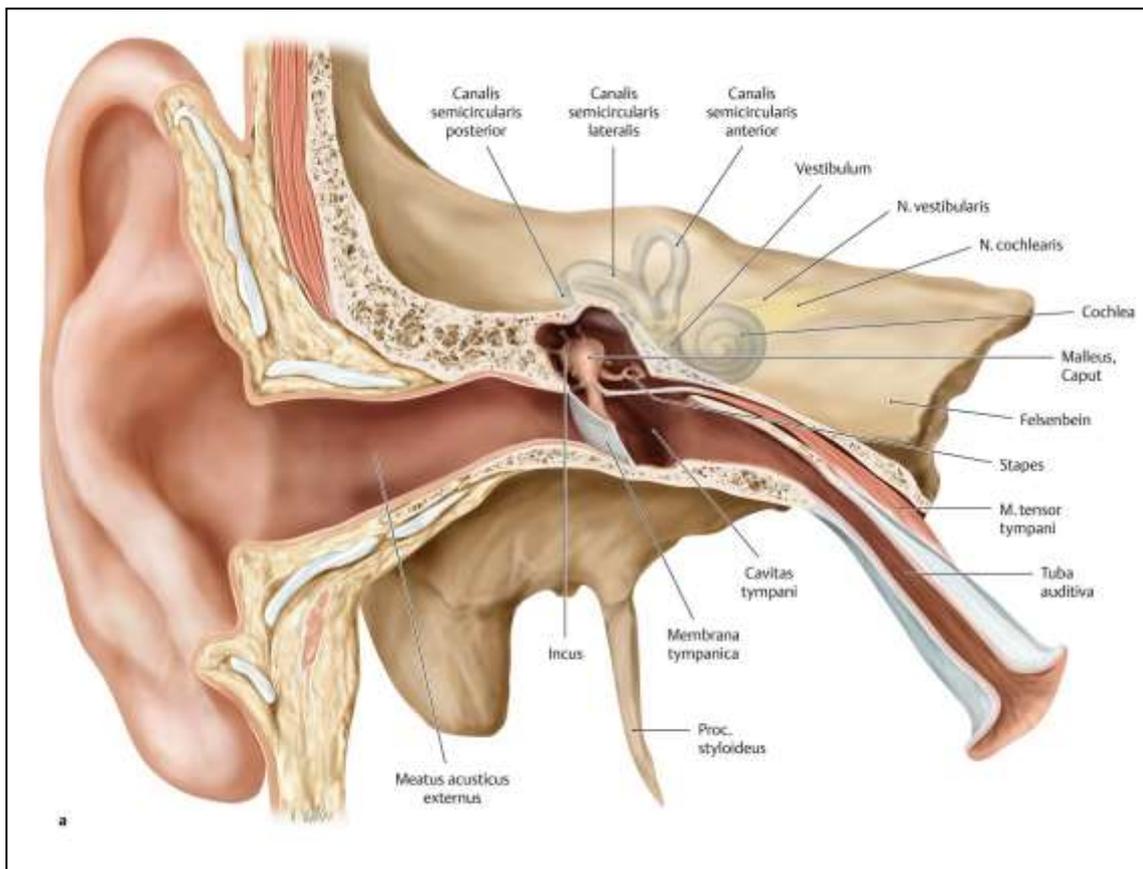


Abb. 1: Anatomischer Aufbau des Ohres mit Darstellung des äußeren Ohres, des Mittelohres und des Innenohres [73].

Quelle: Schünke, M., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme.

Äußeres Ohr (*Auris externa*)

Das äußere Ohr (*Auris externa*) besteht aus der Ohrmuschel (*Auricula*) und dem äußeren Gehörgang (*Meatus acusticus externus*) [73].

Die aus elastischem Knorpel bestehende Ohrmuschel bildet bei Mensch und Tier einen Schallauffangtrichter. Trotz Unterschiede in Form, Aufbau und der damit verbundenen Funktionalität wird für die Anatomie der Haussäugetiere die gleiche Nomenklatur wie beim Menschen verwendet [74].

Wichtiger anatomischer Orientierungspunkt für diese Doktorarbeit war die *Incisura intertragica*, die sich zwischen *Tragus* und *Antitragus* im *rostro-kaudalen* Bereich der *Auricula* befindet (Abb. 2).

Die Blutversorgung wird in diesem Bereich durch die *Arteriae (Aa.) auriculares anteriores*, Abgänge aus der *Arteria (A.) temporalis superficialis* gewährleistet [73]. Diese wurden speziell bei der Präparation der Ohren beachtet.

Die Verbindung zwischen Ohrmuschel und TF stellt der äußere Gehörgang (GG) dar. Im Anfangsbereich besteht die Gehörgangswand aus Knorpel (*Meatus acusticus externus cartilagineus*), welcher im weiteren Verlauf knöchern durch die *Pars tympanica ossis temporalis* ersetzt wird (*Meatus acusticus externus osseus*).

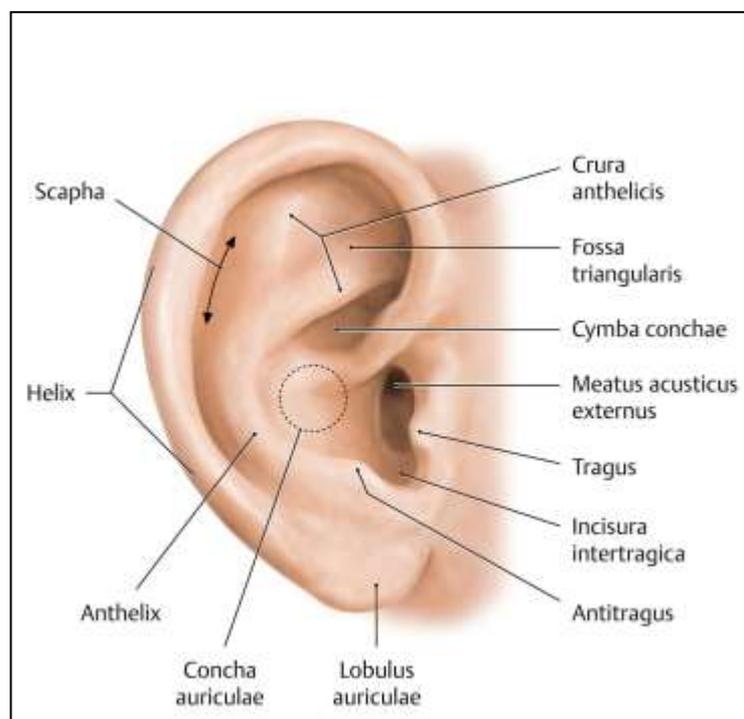


Abb. 2: *Auris externa* mit anatomischen Bezeichnungen. Wichtiger Orientierungspunkt und Zugangsweg für diese Arbeit war die *Incisura intertragica* [73].

Quelle: Schünke, M., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme.

Mittelohr (*Auris media*)

Das Mittelohr und das Innenohr liegen im Felsenbein, auch *Pars petrosa* des *Ostemporale* genannt. Es besteht aus dem TF (*Membrana tympanica*), der Paukenhöhle (*Cavitas tympani (C.t.)*), den pneumatischen Räumen und der Ohrtrumpete (*Tuba auditiva*, Eustachische Röhre) (Abb. 3).

Auf das TF, welches die laterale Begrenzung der Paukenhöhle darstellt, wird separat eingegangen. Die Paukenhöhle beinhaltet die drei mit Schleimhaut überzogenen Gehörknöchelchen. Mit seinem Griff (*Manubrium mallei*) am TF inserierend befindet sich der Hammer (*Malleolus*). Er ist über ein Sattelgelenk (*Articulatio (Art.) incudomalleolaris*) mit dem Amboss (*Incus*) verbunden, welcher wiederum über den *Processus (Proc.) lenticularis* seines langen Schenkels über ein Gelenk (*Art. incudostapedialis*) mit dem Steigbügel (*Stapes*) artikuliert. Der *Stapes* steht mit seiner Fußplatte (*Basis stapedis*) in direktem Kontakt mit dem ovalen Fenster, einem Teil der medialen Begrenzung der Paukenhöhle. Weitere wichtige Bestandteile der *C.t.* sind zwei Binnenohrmuskel, der *Musculus (M.) stapedius* und der *M. tensor tympani*. Des Weiteren durchziehen *Chorda tympani* (Anteil des *Nervus (N.) facialis*) und der *N. tympanicus* (Anteil des *N. glossopharyngeus*) die Paukenhöhle. Sie beinhalten wichtige viszeroafferente und –efferente Fasern zweier Hirnnerven.

Die *Tuba auditiva* besteht aus einem knorpeligen und einem im Felsenbein gelegenen knöchernen Teil. Sie ist die vordere Begrenzung der *C.t.* und verbindet diese mit dem Nasopharynx. Ihre Aufgaben sind die Belüftung der Paukenhöhle, der Druckausgleich zwischen Umgebungsdruck und Luftdruck im Mittelohr und durch ihre mit Flimmerepithel überzogene *Mucosa* ermöglicht sie einen Abtransport von Keimen.

[7, 48, 73]

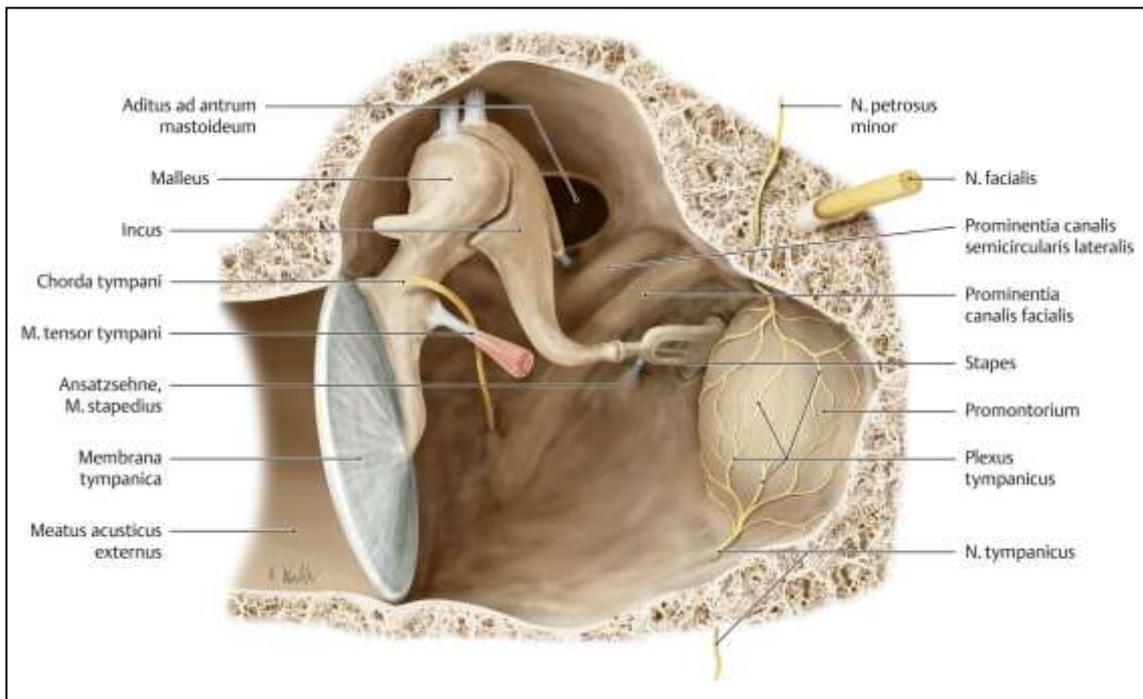


Abb. 3: Aufbau der *Auris media* mit Begrenzungen und Inhalt der Paukenhöhle. Laterale Begrenzung *Membrana tympani*, mediale Begrenzung Promontorium der Cochlea und ovales Fenster, anteriore (ant.) Begrenzung *Tuba auditiva* und dorsale Begrenzung *Antrum mastoideum* [73].

Quelle: Schünke, M., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme.

Trommelfell (*Membrana tympani*)

Das TF ist mit einem verdickten Rand aus Faserknorpel (*Anulus fibrosus*) im knöchernen *Sulcus tympanicus* des GG verankert. In seiner Mitte (*Umbo membranae tympanicae*) ist es trichterförmig eingezogen und aufgrund seiner Ausrichtung scheinen die posterior (post.) liegenden TF-Anteile dem Betrachter näher als die vorderen. Wichtig für die Beschreibung von Pathologien am TF sind folgende anatomische Schemata (Abb. 4):

1. Einteilung in vier Quadranten: Hierbei wird das TF im Uhrzeigersinn in vier Quadranten eingeteilt. I: vorne oben, II: vorne unten, III: hinten unten und IV: hinten oben. Der bei der otoskopischen Untersuchung physiologische Lichtreflex befindet sich im vorderen unteren Quadranten. Seine veränderte Lage oder sein Fehlen lassen Rückschlüsse auf die Trommelfellspannung und mögliche Mittelohrpathologien zu.

2. Einteilung in die kranial gelegene *Pars flaccida* (Shrapnell-Membran) und die größere, straffer gespannte *Pars tensa*.

[7, 48, 73]

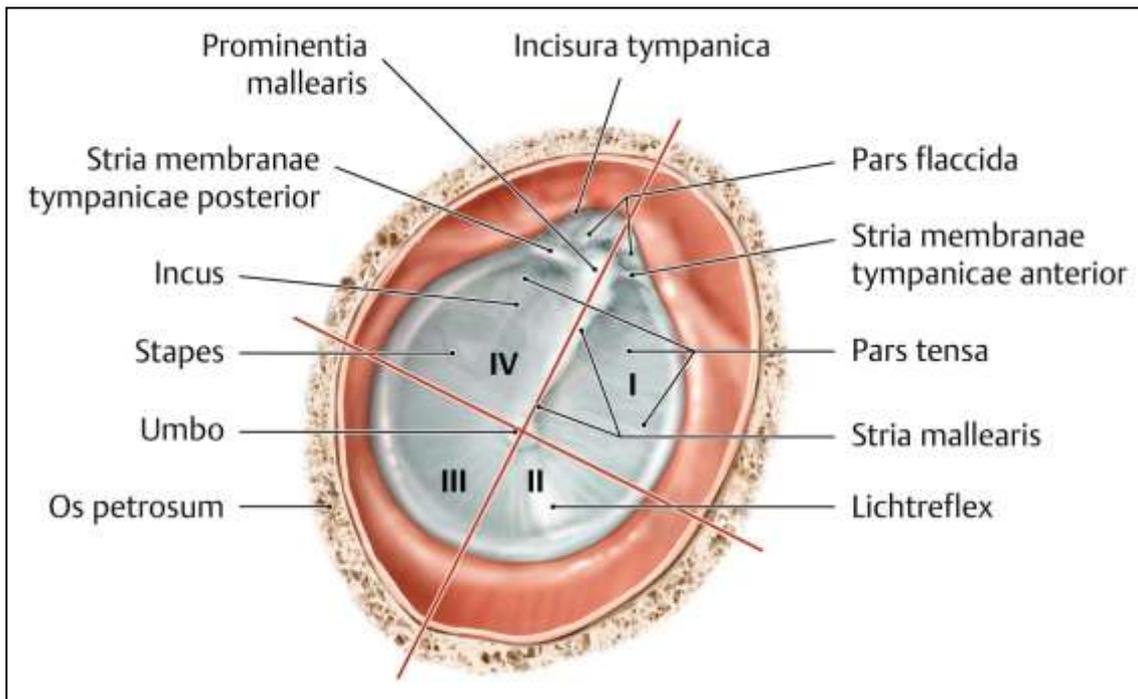


Abb. 4: Anblick auf die *Membrana tympani* des rechten Ohres ausgehend von dem äußeren Gehörgang mit Einteilung in den größeren kaudalen Anteil *Pars tensa* und kleineren kranialen Anteil *Pars flaccida*. Sowie die Einteilung in vier Quadranten I – IV entlang der *Stria mallearis* (Insertion des Hammergriffes) [73].
Quelle: Schünke, M., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme.

Histologisch betrachtet besteht die *Pars flaccida* aus zwei Schichten: Epithel (*Stratum (Str.) cutaneum*) und Schleimhaut (*Stratum mucosum*) [48]. Wohingegen sich in der *Pars tensa* drei Schichten befinden: *Stratum cutaneum*, *Str. fibrosum (Lamina propria)* und *Str. mucosum* (Abb. 5). Das zum GG liegende *Str. cutaneum* besteht aus leicht verhorntem Plattenepithel und wird in vier Schichten eingeteilt. Die *Lamina propria* setzt sich aus vier Schichten von unterschiedlich angeordneten Bindegewebsstrukturen zusammen und ist maßgeblich für die Vibrationseigenschaften in der Schallweiterleitung verantwortlich [30]. Angrenzend an die *Epidermis* liegt eine aus locker angeordneten Kollagenfasern mit Fibroblasten, elastische Fasern, Nerven und Gefäßen bestehende subepidermale Schicht. Ausgehend von dem *Manubrium mallei* schließt sich ihr eine Schicht aus radial angeordneten Kollagenfasern an. Ihr folgt eine zirkulär angeordnete Lage aus Kollagenfasern und eine locker angeordnete submuköse Schicht. Die kollagenen Strukturen setzen sich aus Typ I-III Kollagen zusammen, wobei sich Typ II insbesondere in der *Pars tensa* und Typ I und III überwiegend in der *Pars flaccida* befinden [78]. Das *Str. mucosum* ist zur Paukenhöhle hin gelegen und kleidet diese und die Gehörknöchelchen aus. [6, 22, 32, 38, 51, 52, 89]

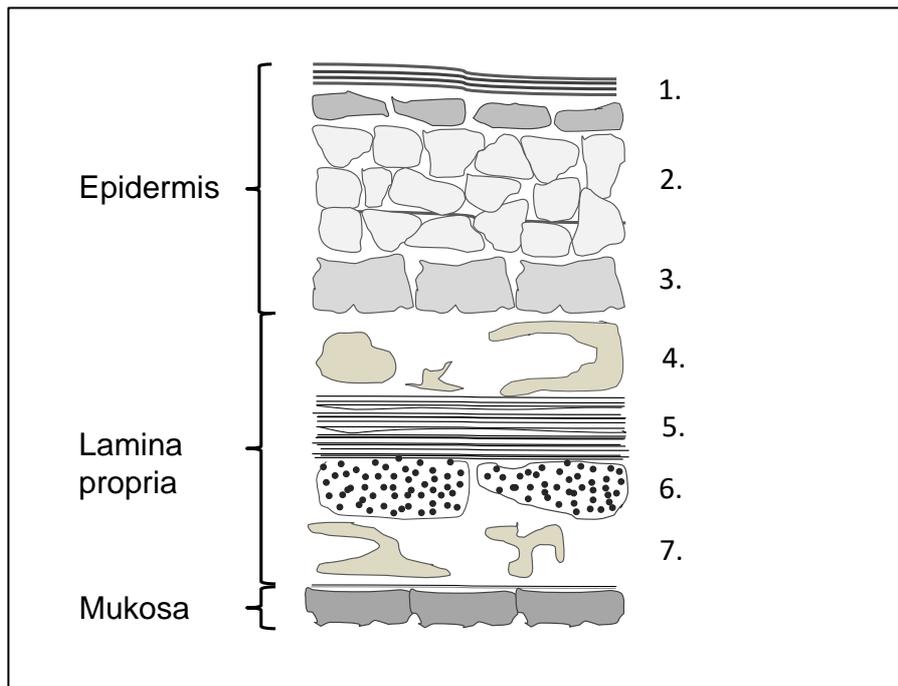


Abb. 5: Schematische Darstellung der Trommelfeldschichtung der *Pars tensa*. 1. *Str. corneum*, 2. *Str. spinosum*, 3. *Str. basale*, 4. Subepidermale Schicht, 5. Äußere radiären Kollagenfaserschicht, 6. Innere zirkuläre Kollagenfaserschicht, 7. Submuköse Schicht

Quelle: Eigene graphische Darstellung in Anlehnung an Lim DJ. 1968 [51]

2.1.2 Physiologie des Hörorgans

Das Hörorgan nimmt Schallwellen auf, die sich in Form von Druckschwankungen in der Luft ausbreiten, wandelt diese mechanische Energie in elektrische Reize um, leitet sie an den auditorischen Kortex weiter und nimmt sie bewusst als Sinnesempfindung wahr [72, 96]. Der durch die Schallwellen erzeugte Schalldruck [Newton (N)/Quadratmeter (m²) = Pascal (Pa)] wird beim Menschen mit dem Maß Schalldruckpegel (Dezibel, sound pressure level) [dB SPL]) angegeben. Die Frequenz des Schalls [Hertz (Hz) = Schwingungen/Sekunde (s)] wird durch die Schwingungsfrequenz des schwingenden Mediums festgelegt. Hierbei stellt ein Ton eine Sinusschwingung mit nur einer Frequenz und ein Geräusch eine nicht periodische Schwingung mit einem breiten Frequenzspektrum dar [42]. Der Hörbereich für einen gesunden jungen Erwachsenen befindet sich zwischen 16-20000 Hz [42, 48]. Wohingegen der wahrnehmbare Frequenzbereich der meisten Mäuse zwischen 2-79 Kiloherz (kHz) liegt [20, 85].

Der Luftschall wird hierbei von der Ohrmuschel aufgefangen und über den äußeren Gehörgang an das Trommelfell weitergeleitet. Der entstandene Schalldruck versetzt nun das

TF in Schwingung. Die Schwingungsenergie des Schalls vom TF wird über die Gehörknöchelchen auf die Perilymphe des Innenohrs übertragen. Das Trommelfell ist so beschaffen, dass es insbesondere im Bereich der mittleren Frequenzen die gesamte Schwingungsenergie aufnimmt und nur wenig Schall reflektiert [7, 42, 48]. Der Schallwellenwiderstand (Impedanz) ist somit gering. Ein weiteres Phänomen der Luftleitung ist die Verstärkung des Drucks (Schalldrucktransformation) durch den sog. hydraulischen Effekt und Hebeleffekt [7, 42, 48]. Der hydraulische Effekt betrifft das Größenverhältnis von Trommelfell zu ovalem Fenster (22:1) und der dadurch entstehende höhere Druck am Eingang zum Innenohr (Schalldruck = Kraft/Fläche) [7, 42, 48]. Der Hebeleffekt wird durch das Verhältnis von Hammerfortsatz und langem Ambossfortsatz (1,3:1) ermöglicht und führt seinerseits zu einer Verstärkung des Schalldrucks. Bei zu lauten Schallreizen dienen die Binnenohrmuskeln als Schutz und führen durch ihre Kontraktion zu einer Verschlechterung der Impedanzanpassung beziehungsweise (bzw.) zu einer Reduktion der Schallübertragung [7, 42, 48]. Der Druck von der Steigbügelfußplatte wird nun über das ovale Fenster auf die Perilymphe der Cochlea übertragen und löst eine Wanderwelle aus. Nach dem Prinzip der Tonotopie kommt es nun abhängig von der Stimulusfrequenz zu einer maximalen Auslenkung an einer bestimmten Stelle der Basilarmembran [1, 5, 10, 96]. Hierdurch entsteht eine Erregung verschiedener Sinneszellen durch unterschiedliche Frequenzen, was als Frequenzdispersion bezeichnet wird [49]. Durch die Auslenkung der Haarzellen kommt es zu einer Depolarisation der inneren Haarzellen, der Ausschüttung von Neurotransmitter und schließlich zu einer Reizweiterleitung an den Hörnerv [50, 96].

2.2 Ursachen und Klassifizierung von Hörstörungen

Schwerhörigkeiten und Taubheit stellen einen häufig vorkommenden und therapiebedürftigen Krankheitskomplex in den Industrienationen dar [72]. Laut einem Artikel von Zahnert T. aus dem Deutschen Ärzteblatt 2011 beläuft sich die Prävalenz der behandlungsbedürftigen Hörstörungen in Deutschland auf etwa 19% [94].

Hierbei gibt es viele Formen der Einteilung bzw. Klassifizierung, von denen die Wichtigsten im Folgenden kurz aufgelistet werden:

1. Hereditäre (ererbte) versus (vs.) erworbene Schwerhörigkeit
2. Schallleitungs- (GG oder Mittelohr), Schallempfindungs- (Innenohr) oder Schallverarbeitungsschwerhörigkeit (Hörnerv, Hörbahn oder Hörzentren)
3. Einteilung nach Schweregrad 0-4 (WHO) [48, 94]

2.2.1 Schallleitungsschwerhörigkeit

Schallleitungsschwerhörigkeiten können das äußere Ohr oder das Mittelohr betreffen. Es kommt zu einer Störung der Luftleitung, während die Knochenleitung intakt bleibt. Dieses Erkenntnis spielt eine wichtige Rolle in der Diagnostik, bei der mit Hilfe des Rinne-Weber-Versuches zwischen einer gestörten Luft- oder Knochenleitung differenziert werden kann [7, 42, 48]. Bei den Hörschäden des Mittelohres werden passagere von nicht passagere Störungen unterschieden. Zu den vorübergehenden Schallleitungsschwerhörigkeiten zählen z.B. akute Entzündungen oder temporäre Tubenventilationsstörungen mit möglichem Paukenerguss. Die häufigsten Ursachen für nicht passagere Schallleitungsschwerhörigkeiten sind chronische Entzündungen des Mittelohres. Hierzu zählen die chronische Schleimhauteiterung (*Otitis media mesotympanalis*) und die chronische Knocheneiterung (Cholesteatom). In beiden Fällen können Hörverluste von bis zu 30-60 dB auftreten. [94]

Atrophe Trommelfellnarben

Atrophe Narben des Trommelfells entstehen häufig als Folge von chronischen Entzündungen des Mittelohres, Trommelfellperforationen oder chronischer Tubenventilationsstörungen. Hierbei handelt es sich um stark ausgedünnte Trommelfellbereiche, die aufgrund einer defizitären *lamina propria*, insuffizienten Fibroblasten und fehlenden proliferierenden Basalzellen an Substanz verlieren. Im Bereich der atrophen Narben scheint insbesondere das *Str. fibrosum* an Dicke abzunehmen. Außerdem ist die klassische Struktur und Anordnung der kollagenen Fasern in diesen Arealen der *lamina propria* aufgehoben [24, 79].

Abhängig von Narbengröße und Belüftung der Paukenhöhle können drei verschiedene Ausprägungen unterschieden werden.

1. Lokalisierte atrophe Narben
2. Retraktionstaschen des TF, welche durch einen persistierenden Unterdruck im Mittelohr im Bereich lokalisierter Trommelfellnarben entstehen
3. Eine komplette Atelektase der Paukenhöhle, das heißt (d.h.) eine Ausdünnung des kompletten TFs als Folge von chronischem Unterdruck im *cavum tympani*

Alle beschriebenen Zustände können zu einer Schallleitungsschwerhörigkeit führen, bei der die Wahrscheinlichkeit und Stärke der Ausprägung von 1-3 ansteigt. Als Folgen von

Retraktionstaschen oder atrophen Trommelfellen können Adhäsivprozesse und Cholesteatome entstehen [65].

Um möglichen Komplikationen und einer zunehmenden Schalleitungsschwerhörigkeit vorzubeugen ist aktuell die Tympanoplastik die Therapie der Wahl. Je nach Ausprägungsgrad erfolgt nur eine Sanierung des Trommelfells (Myringoplastik) oder eine zusätzliche Rekonstruktion der Gehörknöchelchen (n. Wullstein). [7, 48]

Um eine bessere Ventilation der Paukenhöhle zu ermöglichen und möglichen Ventilationsstörungen des Mittelohres vorzubeugen werden häufig Operationen im Bereich der Eustachischen Röhre im Sinne einer Tubendilatation oder die Einlage einer Paukendrainage im Bereich des Trommelfelles durchgeführt. Letzteres stellt sich in einigen Fällen als mögliche Ursache in der Entstehung atropher Narben dar. Das Resultat ist ein *circulus vitiosus*.

2.3 Akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, acoustically evoked auditory brainstem response (AABR)

AABRs zählen zu den frühen akustisch evozierten gemessenen Potentialen (FAEP). Diese objektiven, audiometrischen Messverfahren werden insbesondere als Hörscreening bei Neugeborenen, als Hörschwellenbestimmung, zur Topodiagnostik bei Hörstörungen und in der Diagnostik von Vestibularisschwannomen verwendet [48]. Hierbei werden nach akustischer Stimulation die frühen akustisch evozierten Potentiale aus Hörnerv und Hirnstamm über Elektroden an Vertex und Mastoid abgeleitet [72].

Die AABR der Mäuse bestehen aus 5 vertex-positiven Wellen, welche mit P I-V gekennzeichnet werden [1, 20, 85]. Da es sich bei diesen Potentialen häufig um eine Überlagerung von Summenpotentialen verschiedener Kerngebiete handelt, kann eine genaue topologische Zuordnung nicht getroffen werden. Eine häufig beschriebene Zuordnung ist folgende: P I wird den cochleären Strukturen und der Aktivität des Hörnervs zugeordnet, P II dem Eintritt des VIII. Hirnnervs in den Hirnstamm, P III dem *Nucleus cochlearis*, P IV dem ipsilateralen *Nucleus olivaris superior* oder dem *Leminiscus lateralis* und P V dem kontralateralen *Nucleus olivaris superior*, dem *Leminiscus lateralis* oder *Colliculus inferior* (Abb. 6) [33].

Bei der akustischen Stimulation des auditorischen Systems unterscheidet man klick- von frequenzspezifischen Messungen. Die Stimulation mit einem Klickreiz, der eine kurze Dauer und eine steile Schalldruckflanke bei einem breiten Frequenzspektrum umfasst,

führt zu einer synchronen Erregung zahlreicher Neuronen (Synchronisationspotential). Aufgrund ihrer Synchronizität überlagern sich die Aktionspotentiale der einzelnen Nervenfasern der Hörbahn, was als Summenaktionspotential (SAP) bezeichnet wird. Bei der klick-Messung ist also das SAP der Hörbahn von der *Cochlea* bis hin zum Hirnstamm messbar. [33, 72, 84] Die frequenzspezifische Hörmessung dient zur Hörschwellenbestimmung einzelner Frequenzen bei unterschiedlich dargebotenen Reizpegeln. Für die Bestimmung der Hörschwellen werden überwiegend die Wellen I, III und IV verwendet [84].

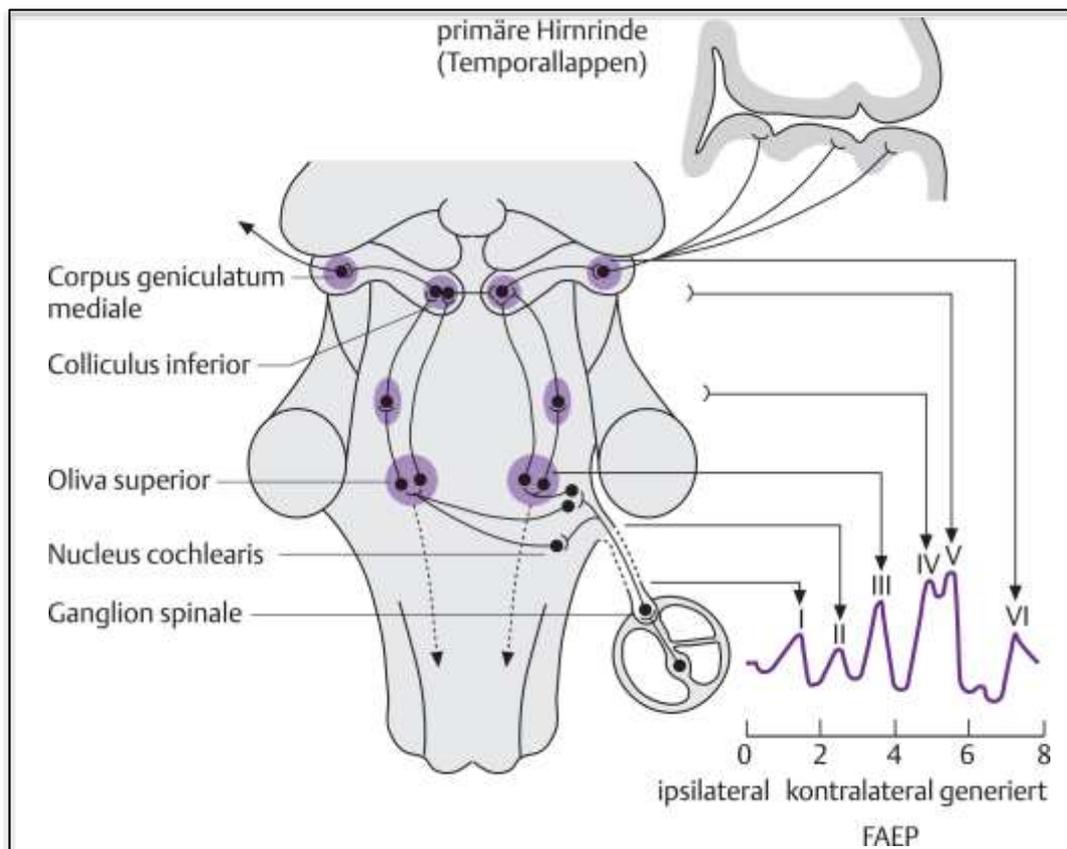


Abb. 6: Darstellung der Hörbahn und der abgeleiteten frühen akustisch evozierten Potentiale (FAEP) [25, 44].

Quelle: Grehl, H. and F.-M. Reinhardt, *Checkliste Neurologie*. 5th ed. 2012, Stuttgart: Thieme

2.4 Laserbestrahlung von Membranen

Die Verwendung von Laserstrahlen in der Medizin hat sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie Einzug gefunden. Beispiele für diagnostische Verfahren sind die Messung von Blutströmen (Flowmetrie) oder die optische Kohärenztomographie (OCT) im Bereich der Augenheilkunde. Für diese Dissertation ist die laserinduzierten Gewebebehandlung, -remodellierung und -stabilisierung, welche insbesondere in den Fachbereichen

Dermatologie [2, 3, 14, 37, 77, 83] und Ophthalmologie [17, 41, 66, 75, 93] Anwendung finden, interessant. In vorausgehenden Studien konnten bereits Laser-induzierte Kollagenremodellierungen in unterschiedlichen Geweben, wie der Basalmembran der Hörschnecke [90], der Kornea [8], der Kniegelenkscapsel [28, 29], dem medialen Seitenband [21] und dem Parodontalligament [40, 81] nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass es initial durch Photokoagulation von Kollagen erst zu einer Abnahme der Gewebestabilität kam [21, 29, 91]. Allerdings kam es im Abstand von Tagen bis Monaten nach Bestrahlung zu einer Verstärkung des Gewebes, was auf eine Neusynthese und Remodellierung von Kollagenfasern zurückgeführt wurde [58, 82, 86]. Bis zu zwei Jahre nach Bestrahlung konnten derartige Veränderungen beobachtet werden [86]. Ein hier häufig eingesetzter Laser ist der Neodym-Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd:YAG) Laser, der vergleichbar mit dem Neodym-dotierten Ytterbium-Orthovanadat (Nd:YVO₄) Laser ist [23].

2.5 Pikro-Siriusrot-Färbung und Polarisationsmikroskopie

Die Färbung von Gewebe mit Pikro-Siriusrot und die anschließende Polarisationsmikroskopie dienen zur Darstellung kollagenhaltiger Strukturen [8, 15, 26, 36, 47, 80]. Die Pikro-Siriusrot-Färbung wurden erstmals 1968 angewandt und erwies sich gegenüber der damals etablierten Pikro-Fuchsin-Färbung als überlegen [15].

Die Färbelösung besteht aus Siriusrot und Pikrinsäure, wobei das Siriusrot, ein großes, elongiertes, anisotropes Farbstoffmolekül ist, das sich parallel an Kollagenmoleküle anlagert. Diese Anlagerung führt zu einer Zunahme der natürlichen Doppelbrechung (Birefringenz, optische Anisotropie) und eignet sich daher zum Hervorheben kollagener Fasern [8, 35, 36, 62, 87]. Die Pikrinsäure verstärkt ihrerseits die Birefringenz der Siriusrotfärbung [56, 57].

Bei der Polarisationsmikroskopie wird ein Lichtmikroskop verwendet, das polarisiertes Licht zur Abbildung von Präparaten benötigt. Hierbei können doppelbrechende (anisotrope) Medien, z.B. Kristalle, sichtbar gemacht werden. Im Falle von optisch anisotropen Strukturen breiten sich Lichtwellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in verschiedene Richtungen aus. Im Gegensatz zu isotropen (einfachbrechenden) Substanzen ändert sich der Brechungsindex abhängig vom einfallenden Strahlengang [31, 54]. Trifft nun ein Lichtstrahl auf ein einfachbrechendes Medium, wird er in nur eine, bei doppelbrechenden

Medien in zwei (Doppelbrechung), Richtungen gebrochen [31]. Die Polarisationsmikroskopie macht sich das Prinzip der Doppelbrechung zu Nutze, indem nur anisotrope Strukturen aufleuchten und der Rest schwarz erscheint. Hierbei werden 2 Polfilter eingesetzt. Der 1. Polfilter (Polarisator) lässt nur Licht einer Schwingungsebene durchtreten (polarisiertes Licht). Der 2. Polfilter (Analysator) ist gegenüber dem Polarisator um 90° gedreht und befindet sich oberhalb des Objektisches, auch er lässt nur polarisiertes Licht passieren. Befindet sich zwischen den beiden Polarisatoren kein Objekt oder ein isotropes Medium wird das Licht, unabhängig von der Ausrichtung der Polfilter, vollständig vom Analysator blockiert und das Bild erscheint schwarz (Prinzip der Auslöschung). Bei Betrachtung eines anisotropen Gewebes werden die Polfilter so orientiert, dass sich das eintreffende polarisierte Licht in zwei Strahlen mit zueinander senkrechten Polarisations Ebenen aufspaltet (Doppelbrechung). Hierbei lässt der Analysator einen gewissen Anteil der zwei gebrochenen Strahlen hindurch und das Bild leuchtet hell auf [11, 92]. Bei mit Pikrosiriusrot gefärbten Präparaten erscheinen nun aufgrund der Interferenz der Strahlen bestimmte Strukturen in unterschiedlichen Farben. Hierbei weisen die dicken kollagenen Fasern vom Typ I eine gelb-orange und die dünnen vom Typ III eine grüne Farbe auf [46].

2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein bewährtes Verfahren in der Darstellung kollagener Strukturen und deren Anordnung [30, 34]. Zur Analysierung des histologischen Aufbaus und der Organisation kollagener Fasern von Trommelfellen kam sie bereits in mehreren Studien zum Einsatz [32, 38, 51, 52, 53].

Die Besonderheit der TEM gegenüber der Durchlichtmikroskopie ist die hohe Auflösung von bis zu 0,5 nm. Hierzu werden in einem Vakuum beschleunigte Elektronen verwendet, die durch ihre geringe Wellenlänge Objekte $\leq 0,5$ Mikrometer (μm) darstellen können. Ein elektrisches Feld von 10-125 Kilovolt (kV) beschleunigt nun die Elektronen auf eine einheitliche Geschwindigkeit. Damit die Elektronen das Präparat durchdringen können, ist das TEM auf sehr dünne Schnitte, sog. Ultradünn-Schnitte von circa (ca.) 70-100 nm Dicke angewiesen. Beim Durchdringen ändern die Elektronen ihre Bewegungsrichtung in Form einer Rutherford-Streuung, je höher also die Ordnungszahl der Atome des Präparates, desto stärker die Streuung. Hierbei erscheinen Gewebe mit großer Atomdichte dunkler, da sie durch weniger Elektronen abgebildet werden. [9, 39, 55]

2.7 Zielsetzung

Entsprechend der vorausgegangenen Sachkenntnisse ergeben sich für diese Dissertation folgende Zielsetzungen:

- Entwicklung eines geeigneten Versuchsprotokolls mit Etablierung der minimalen und maximalen Laserbestrahlungsintensität
- Histologische Untersuchung möglicher synergistischer Effekte von Bestrahlungsintensität und Zeit nach Bestrahlung auf unspezifische Gewebereaktion am Beispiel des Trommelfells
- Histologische Untersuchung möglicher synergistischer Effekte von Bestrahlungsintensität und Zeit nach Bestrahlung auf eine Kollagenremodellierung und Kollagenneusynthese am Beispiel des Trommelfells
- Elektrophysiologische Untersuchung möglicher synergistischer Effekte von Bestrahlungsintensität und Zeit nach Bestrahlung auf das Hörvermögen der Mäuse

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Mäuse wurden als Versuchstiere für diese Experimente, aufgrund ihrer anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit ihres Hörsystems zum Hörsystem des Menschen, gewählt. Außerdem haben sich die anatomischen Strukturen als geeignet für mikrochirurgische Eingriffe erwiesen und die Ableitung auditorischer Hirnstammpotentiale (auditory brainstem response, ABR) wurde bereits in zahlreichen Studien etabliert [19, 59, 64, 90]. 6-8 Wochen alte, weibliche Mäuse des CD1 Stammes mit einem Anfangsgewicht von ca. 22-33 Gramm (g) (Zucht der Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld) wurden in der Studie verwendet. Dieser Wildtyp-Stamm hat sich in der Vergangenheit in Experimenten als sehr widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen gezeigt und wurde deswegen für die Durchführung von chronischen Experimenten verwendet [4, 16, 67].

Der Umstand, dass bei diesem Stamm eine hereditäre Hörminderung bekannt ist, welche sich in Form einer zunehmenden Presbyakusis im Alter äußert [76], wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe ausgenutzt, da somit die Divergenz bezüglich des Hörvermögens der Mäuse mit der einer Population von hörgeschädigten Menschen vergleichbar war.

Der Gebrauch der Mäuse für wissenschaftliche Zwecke wurde vom Saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz (Abt. C „Lebensmittel und Veterinärwesen“) genehmigt (Genehmigungsnummer 48/2012). Dies geschah in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und der Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft zum Schutz der für experimentelle Zwecke verwendeten Tiere.

Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte im Tierlabor des Institutes für Klinisch Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes und entsprach der EG-Richtlinie 2010/63 zur Haltung von Versuchstieren der Länder der Europäischen Union.

Die Lebensbedingungen waren für alle Tiere gleich. Gehalten wurden die Tiere in offenen Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20-24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10 \%$, einer Lichtintensität von 60-400 Lux und einem Geräuschpegel von 50-85 dB. Die Mäuse unterlagen einem geregeltem täglichen hell/dunkel-Zyklus von jeweils 12 h (*hora*, Stunde). Als Einstreu wurde Holzgranulat verwendet. Trockenpelletfutter und Trinkwasser erhielten die Mäuse ad libitum.

Versuchsgruppen

Insgesamt standen 147 Mäuse für die hier dargelegte experimentelle Arbeit zur Verfügung. Die Anzahl der Versuchstiere für die Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie belief sich auf eine Zahl von insgesamt 72 Mäusen (s. Tab. 1). Hierunter befanden sich 3 Mäuse zur Negativkontrolle der histologischen Analysen. Bei jeder Maus wurde vor und nach der Bestrahlung, sowie am Tag der Opferung eine klick- und frequenzspezifische Hörmessung durchgeführt.

Intensität und Dauer der Bestrahlung	Zeitpunkt der Opferung nach Bestrahlung			
	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
10 mW 30 s		n = 6	n = 6	n = 6
25 mW 30 s	n = 3	n = 7	n = 8	n = 8
50 mW 30 s	n = 1	n = 8	n = 8	n = 8
Negativkontrollen	n = 3			

Tab. 1: Zusammenfassung der analysierten Mäuse der Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie. Einteilung in die verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit von Bestrahlungsintensität (Milliwatt (mW)) und –dauer (Sekunden (s), sowie Tag der Opferung nach Laserbehandlung. Stichprobenumfang = n.

Die 3 Tiere, die zur Negativkontrolle dienten, wurden an Tag 0 narkotisiert und am selbigen Tag ohne Hörmessung und ohne Laserbestrahlung geopfert.

In der Gruppe der Tiere, welche für die elektronenmikroskopische Untersuchung geplant waren, befanden sich insgesamt 11 Mäuse mit einer Negativkontrolle (s. Tab. 2).

Auch diese Tiere erhielten vor und nach jeder Bestrahlung sowie am Tag der Opferung eine klick- und frequenzspezifische Hörmessung.

	Zeitpunkt der Opferung nach Bestrahlung	
Intensität und Dauer der Bestrahlung	Tag 0	Tag 28
10 mW 30 s		n = 3
25 mW 30 s		n = 3
50 mW 30 s		n = 4
Negativkontrolle	n = 1	

Tab. 2: Zusammenfassung der analysierten Mäuse der TEM. Einteilung in die verschiedenen Gruppen mit Anhängigkeit von Bestrahlungsintensität und -dauer, sowie Tag der Opferung nach Laserbehandlung.

Zur Etablierung der Methoden und Erstellung des eigentlichen Versuchsprotokolls wurden 59 Versuchstiere verwendet. Hier wurde eine Bestrahlung mit und ohne Pigment durchgeführt, sowie der Zeitpunkt des Auftragens von selbigem verändert. Zudem wurden die Parameter Laserintensität, kontinuierliche Welle (continuous wave (CW)) vs. gepulsten Laser, Dauer der Bestrahlung und Zeitpunkt der Opferung eines Tieres variiert, getestet und ausgewertet. Die restlichen 5 Mäuse dienten zur Organentnahme.

3.1.2 Narkose

Pharmaka

Dexpanthenol (5 g), <i>Bepanthen® Augen- und Nasensalbe</i>	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Isotone Natriumchloridlösung, 0,9% (100 Milliliter (ml))	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketaminhydrochlorid (100 Milligramm (mg)/ml), <i>Ketaver®</i>	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Xylazin-Hydrochlorid (23,32 mg/ml) und p-Hydroxybenzoesäuremethylester (1 mg/ml) in Natriumchloridlösung, <i>Rompun® 2%</i>	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen, BD Microlance™ 3, steril	Becton Dickinson S.A. Fraga, Spanien
Einmalspritze (5 ml/ Luer Solo), Injekt®, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalinsulinspritze mit eingeschweißter Kanüle (3ml), BD Micro-Fi +Demi U100, steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Verschlussknoten, Combi-Stopper, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.3 Operation

Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

Infrarotlampe, Condell® Typ 5020 mit Philips-Infrarot –Lampe 100 Watt (W) 230 Volt (V)	Koninklijke Philips N.V.
Kamera, Cyber-Shot™ DSC-RX100 SONY® mit Zeiss Vario-Sonnar®T* F1, 8-Objektiv	SONY Europe limited
Mikroskop, Stereomikroskop, 75 W, 100 VA	Carl Zeiss, Deutschland
Mullkompressen (10×10 cm), steril Mullkompressen (7,5×7,5 cm), unsteril	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Nadelhalter (12,5 cm), Webster #14109 Nadelhalter (14 cm), Halsey #14110	World Precision Instruments Inc., WPI Deutschland, Berlin
Nahtmaterial, 0 SH ETHICON ETHIBOND* EXCEL Polyester Nahtmaterial, 4-0 FS-2 ETHICON PRO- LENE* Polypropylen	Johnson & Johnson Medical GmbH, Deutschland
Pinsel, Schlepper Serie 1203	Künstlerpinselfabrik DEFET GmbH, Nürnberg
Pinzette (12 cm), Dumont #1 500064 Pinzette (10 cm), Iris Forceps #15915	World Precision Instruments Inc., WPI Deutschland, Berlin

Schere (10 cm), SuperCut Iris Scissors #14218	World Precision Instruments Inc., WPI Deutschland, Berlin
Schere (8 cm), McPherson-Vannas Scissors #14124	
Waage, Soehnle Modell Siena	Leifheit AG, Nassau
Wärmematte, BC1 Blanket Control (37 °C)	Eigenbau Forschungslabor HNO Uniklinikum, Homburg

Chemikalien

Pigment, Fuchsin 0,5% Lsg mit Alkohol	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
Sterilium, Softasept [®] N	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.4 Hirnstammaudiometrie (AABR)

Technische Geräte

Abschwächer, <i>programmable Attenuator & Headphonebuffer g[®].PAH</i>	g.tec medical engineering GmbH, Österreich
EDV-System, <i>HP Compaq Elite 8300 Microtower-PC</i>	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
+Elektroden, <i>subdermale Nadelelektroden aus Platin für EMG/EP</i>	Merz Medizintechnik GmbH, Reutlingen
Freifeldlautsprecher umgebaut aus einem Kopfhörer <i>DT-911</i>	Beyerdynamic GmbH & Co. KG
Funktionsgenerator, <i>Agilent 33500 B Series Trueform Waveform Generator</i>	Keysight Technologies GmbH, Deutschland
Mikrofon, <i>4191</i>	Brüel & Kjær Sound & Vibration Measurement A/S, Naerum Denmark
Verstärker, <i>USB Biosignal Amplifier g[®]. USBamp</i>	g.tec medical engineering GmbH, Österreich

Software

Individuell implementiertes Mess-und Analysesystem, Matlab & Simulink	Stahn P. und Hecker D., Universität und Uniklinikum des Saarlandes The Mathworks, Inc.
MATLAB_R2015b.app	© 1984-2015 The MathWorks, Inc.

3.1.5 Laserbestrahlung

Technische Geräte

Detektor (Leistung), Gentec XLP-35-H2D0	Gentec Electro Optics Inc, Kanada
EDV-System, Dell Latitude E5530	Dell GmbH, Frankfurt am Main
Laser-Faser, FG365LEC-CUSTOM MUC 0,22 NA Durchmesser 365 µm	Thorlabs, Inc., Europe
Laser-System, Nd: YVO ₄ -Laser INCA, TEM ₀₀ profile, air cooled, Q-switched solid-state laser, Wavelength 532 nm	Xiton-Photonics GmbH, Kaiserslautern
Leistungsmessgerät, Gentec UNO Laser Power Meter	Gentec Electro Optics Inc, Kanada
Mikromanipulator	Narishige-Group International, USA

Software

Individuell programmiertes System, Matlab	Hinsberger M. und Hötzer B., Universität des Saarlandes The Mathworks, Inc.
---	--

3.1.6 Histologie

Technische Geräte

Einbettstation, Histocentre2 SHANDON	Thermo Electron Corporation, USA
Einbettkassetten, Q Path [®] MacroStar VII	VWR International GmbH, Darmstadt
Hypercenter, Tissue-Tek [®] VIP TM 5Jr.	Sakura Finetek USA, Inc.
Inkubator, Incucell, 65 °C	MMM Medcenter GmbH, München
Küvette (Küv.) aus Glas, für 20 Objektträger	Inventar HNO Labor Universität des Saarlandes (UdS), Homburg
Mikroskop, NT 6V/10 W stab	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Mikrotom, LEICA Sm200R	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Microtom-Einmalklingen, M9PP207500011	FEATHER [®] Safety Razor Co. Ltd., Japan
Objektträger, geschliffen 90 ° Mattrand	R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik, Emmendingen
Paraffinstreckbad, MEDAX WB24	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Schüttelwasserbad, Shake Temp SW22, 37°C	Julabo GmbH, Seelbach
Schüttler, KH 2/500 noctua	Rascom Computerdistribution GmbH, Österreich
Stereomikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

Chemikalien

Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) ≥ 99%, Titrierkomplex III, pH 7,2	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland
Entellan (1Liter (l)), Microscopy Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin 1%, 1 g Eosin + 100 ml Aqua dest., Merck 1345	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99% (10 l)	SAV LP GmbH, Flintsbach
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	aus der Leitung des UdS, Homburg Saar

Formaldehydlösung 4% (1 l)	Otto Fischar GmbH & CO.KG, Saarbrücken
Hämalaun nach Mayer, Merck 1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt
HCL-Alkohol, 1000 ml 70% Ethanol + 10 ml 25% HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Paraffin, 56-58 °C	Zentrale Chemikalienlager, UdS, Homburg Saar
Picro-Sirius Red, Direct Red 80 (0,5 g) + Picric Acid 1,3% in water (500 ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Weigert's Haematoxylin, Stammlösung A (Haematoxylin, Ethanol) + Stammlösung B (H ₂ O, Eisen, Salzsäure)	MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt
Xylol, Isomergemisch (Ethylbenzol, m-Xylol, o-Xylol, p-Xylol)	Otto Fischar GmbH & CO.KG, Saarbrücken

3.1.7 Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie

Technische Geräte

EDV-System, Fujitsu Seriennummer YLGV008051	Fujitsu Technology Solution GmbH, Deutschland
Kamera, Olympus SC30	Olympus America Inc., USA
Mikroskop, OLYMPUS BX61 Motorized Sytem Microscope	Olympus America Inc., USA
Monitor, Fujitsu Seriennummer S26361-K1150-V150	Fujitsu Technology Solution GmbH, Deutschland
Tastatur, Fujitsu Seriennummer S26381-K520-L120	Fujitsu Technology Solution GmbH, Deutschland

Software

cellSens Software, Version 1.6	OLYMPUS COOPERATION, USA
ImageJ for Mac OS X	ImageJ, U. S. National Institutes of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij/

3.1.8 Elektronenmikroskopie

Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

Diamantmesser, Diatome 1. Semidünn 2. Ultradünn	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
Grid, 1x2 Kupfergrids	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
Gridboxen	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
Kamera TEM	OLYMPUS SOFT IMAGING SOLUTIONS GmbH, Germany
Mikrotom, LEICA EM UC7	© 2015 Leica Biosystems, Nussloch
Mikrosystems, LEICA	© 2015 Leica Biosystems, Nussloch
Monitor	© 2012 Acer Inc., Taiwan
Pinzette	Institut für Anatomie, UdS, Homburg Saar
Rasierklinge	Institut für Anatomie, UdS, Homburg Saar
Spatel aus Holz und Glas	Institut für Anatomie, UdS, Homburg Saar
Spritze für Aqua dest.	Institut für Anatomie, UdS, Homburg Saar
Transmissionselektronenmikroskop (TEM), TECNAI 12	FEI, Niederlande

Chemikalien

Aqua dest.	Institut für Anatomie, UdS, Homburg Saar
Bleicitrat nach Reynolds, 1,33 g Bleicitrat + 1,76 g Zitronensäure + 30 ml abgekochtes Aqua dest. + 1 N NaOH Suprapurum, pH 11,95	© Merck KGaA, Darmstadt
Cacodylatpuffer, 1% Glutaraldehyd + 1% Formaldehyd (in 0,1 M Cacodylatpuffer)	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
Fixans, Cacodylatpuffer + Paraformaldehyd + Glutaraldehyd	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
EDTA ≥ 99%, Titrierkomplex III,	Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland

Osmiumtetroxid 4%	© 2016 Electron Microscopy Sciences, Science Services GmbH, München
EM bed-812 (Epon), Stammlösung A (116 ml Dodenyl Succinic Anhydride (DDSA) + 72,33 ml Epon) + Stammlösung B (100 ml Epon + 89 ml Nadic Methyl Anhydride (MNA)) + 0,2 ml Benzyl dimethylamine (BDMA) auf 10 ml Fertiglösung	Science Services GmbH, München
Richardson Färbelösung, Lösung A (0,5 g Azur II + 50 ml Aqua dest.) + Stammlösung B (0,5 g Methylenblau + 0,5 g Borax + 50 ml Aqua dest.)	© Merck KGaA, Darmstadt
Uranylacetat, 2% Uranylacetat (2 g/100 ml) in Aqua dest.	© Merck KGaA, Darmstadt

Software

iTEM	ITEM Datenbank OLYMPUS SOFT IMAGING SOLUTIONS GmbH, Germany
------	---

3.2 Methoden

Alle Eingriffe (Abb. 7) am Tier fanden unter Anästhesie mit 2,125 ml 0,9 % isotoner Natriumchloridlösung, 0,25 ml Ketamin und 0,125 ml Rompun statt. Initial wurde dem Tier 1 ml dieses Gemisches pro Gramm Körpergewicht (KGW) intraperitoneal injiziert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde in einem Abstand von 10-15 Minuten unter Berücksichtigung der Atmung und des Schmerzreizes, des sog. Zwischenzehenreflexes, die Hälfte der Ausgangsdosis appliziert. Um das Tier vor Auskühlung zu schützen, befand es sich während des Experimentes auf einer Wärmeplatte bei ca. 38 °C und wurde im Zeitraum der Aufwachphase unter einer Infrarotlampe platziert.

Sobald die Maus nicht mehr auf den auslösenden Schmerzreiz reagierte, wurde ihr Dexpanthenol-Augensalbe aufgetragen um mögliche Hornhautschäden oder Bindegewebsreizungen zu verhindern.

Zur Optimierung des operativen Zugangs wurde dem Tier mittels Schere das Fell großzügig rostral und kaudal des äußeren Ohres entfernt. Nach dem Fotografieren des noch nicht operierten Ohres, wurde entlang des äußeren Gehörgangs beider Ohren, ausgehend von der *Incisura intertragica* in Richtung des TFs, ein 2-3 mm langer Schnitt durchgeführt. Dies geschah unter mikroskopischer Sicht, ohne Gefäße oder das Trommelfell zu verletzen.

Am Tag 0 fand daraufhin die erste Messung akustisch evozierter Potentiale (AABR s. 3.2.1) statt.

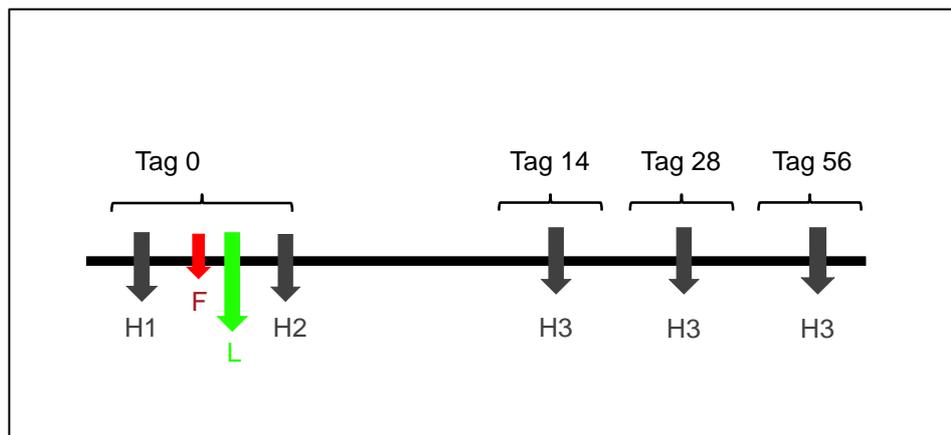


Abb. 7: Zeitverlauf der AABR Messungen (dunkelgraue Pfeile), Auftragung des Pigmentes (F, roter Pfeil) und Laserbestrahlung (L, grüner Pfeil). Die drei durchgeführten Hörmessungen sind hierbei mit H1, H2, sowie H3 gekennzeichnet. Die Mäuse wurden je nach Gruppeneinteilung nach der ersten Hörmessung H1 an Tag 0 mit einer Leistung von 10 mW (5 μ J), 25 mW (12,5 μ J) oder 50 mW (25 μ J) bestrahlt.

Nach abgeschlossener Hörmessung wurde dem Tier der Farbstoff Fuchsin auf einer im Durchmesser ca. 500 μ m großen Fläche des post. oberen Quadranten des Trommelfells (des rechten und linken Ohres) mit einem feinen Pinsel aufgetragen (Abb. 8 Fuchsin + Laser). Hierbei zeichnete es sich unter mikroskopischer Sicht deutlich ab, dass sich der Farbstoff v.a. im Bereich des *Umbo* anlagerte und zwischen den einzelnen Mäusen eine Abweichung von maximal 0,5 mm zu beobachten war. Diese individuellen Variationen der Pigmentierung wurden im Versuchsprotokoll vermerkt und eingezeichnet.

Nach Auftragen des Pigmentes wurde das mit Fuchsin bepinselte post. TF des linken Ohres der Maus unter mikroskopischer Sicht mit einem Nd: YVO₄-Laser bestrahlt (Abb. 8). Die Positionierung von Pigment und Lichtkegel des Lasers wurden bei jeder Maus im Versuchsprotokoll aufgezeichnet und für die weitere Auswertung verwendet.

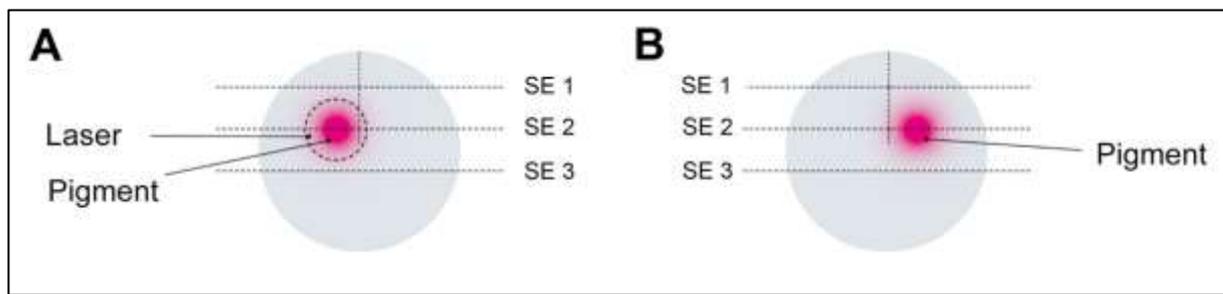


Abb. 8: A: Linkes TF mit aufgetragenem Pigment (Fuchsin) im Bereich des post. TF (oberer hinterer Quadrant) und anschließende Laserbestrahlung. B: Rechtes TF (Kontrollohr) mit aufgetragenem Pigment (Fuchsin) im Bereich des post. TF ohne Laserbestrahlung. Sowie Darstellung der drei Schnittebenen (SE 1-3).

Im Anschluss an die Bestrahlung fand die zweite Hörmessung statt. Nach Beendigung dieser wurden die Schnitte am Gehörgangseingang mit jeweils einer Einzelknopfnah (4-0-Prolene) verschlossen um die Anatomie und Funktion des äußeren Gehörganges und der Ohrmuschel wiederherzustellen. Im Anschluss wurden die Mäuse wieder in ihren ursprünglichen Käfig im Tierstall des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie transportiert.

Der jeweiligen Gruppeneinteilung entsprechend fand am Tag 14 (Woche 2), 28 (Woche 4) oder 56 (Woche 8) die dritte finale Hörmessung statt (Abb. 7). Hierfür wurde die Maus erneut narkotisiert und die Inzisionen an beiden äußeren Gehörgängen mit einer kleinen Schere eröffnet. Die Tiefe der Narkose wurde wie zuvor durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Im Anschluss an die finale Hörmessung wurde die Maus mittels manueller Dekapitation geopfert. Innerhalb einer Stunde nach Opferung wurden das linke und rechte Felsenbein mit Innen- und Mittelohr, bis hin zu dem knorpeligen Anteil des äußeren Gehörganges entnommen und für die Histologie aufgearbeitet. Im weiteren Verlauf wurden die histologischen Ergebnisse des linken und rechten TFs, sowie die AABRs eines jeden Tieres, wie auch die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

3.2.1 Messung akustisch evozierter auditiver Hirnstammpotentiale (AABR)

Die AABR Messungen wurden in einer schallisolierten Kammer durchgeführt und fanden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten statt (Abb 7). Zuerst wurden der Maus klick-Reize und im direkten Anschluss frequenzspezifische Stimuli präsentiert. Das Programm für die auditorischen Messungen wurde mit Matlab von Dipl. Ing. Patricia Stahn und Dr. Dipl. Ing. Dietmar Hecker entwickelt und zur Verfügung gestellt. Der genaue Versuchsaufbau für die Messung der akustisch evozierten Potentiale ist in (Abb. 9) dargestellt.

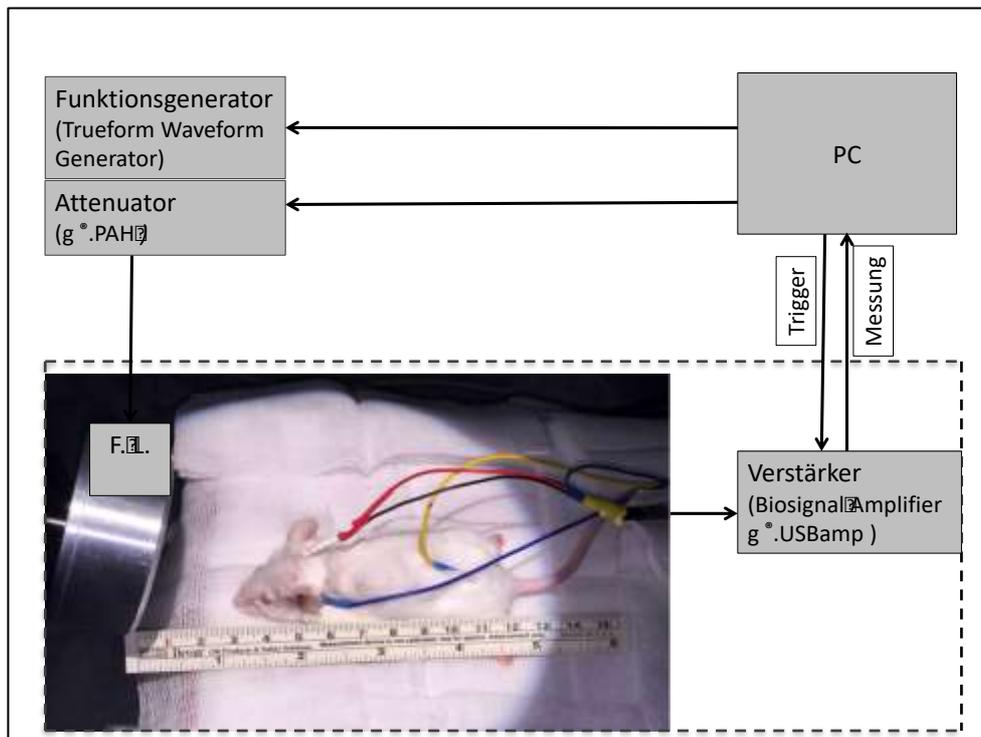


Abb. 9: Versuchsaufbau zur Freifeldmessung der akustisch evozierten auditorischen Hirnstammpotentiale (AABR). Generierung akustischer Signale über einen Personal-Computer (PC) mit integriertem Funktionsgenerator mit Darbietung der klick- und frequenzspezifischen Stimuli über einen 5 cm entfernten Freifeldlautsprecher (F.L.). Ableitung der akustisch evozierten Potentiale über 4 Nadelektroden und Weiterleitung der Signale über den Verstärker an die EDV-Einheit.

Die Generierung und Steuerung der klick- bzw. frequenzspezifischen Stimuli erfolgte über ein EDV-System und wurden dem Tier frontal über einen Freifeldlautsprecher in einer Entfernung von 5 cm zu jedem Ohr präsentiert. Die hierbei akustisch evozierten Potentiale wurden nun über 4 Nadelektroden aus Platin abgeleitet. Die Elektroden befanden sich subdermal an Vertex (schwarz), rechtem Mastoid (rot), linkem Mastoid (blau) und an der Wurzel des Schwanzes (gelb). Die abgeleiteten Signale wurden dann bei 32 kHz digitalisiert und gefiltert um nur Frequenzen im Bereich von 300-3000 Hz zu erhalten.

Für die klick-AABR-Messung wurden Klicks über einen 100 μ s andauernden Rechteckimpuls erzeugt. Für eine Messung wurden 256 Einzelmessungen gemittelt und die Abtastrate betrug 20 kHz. Das Vorspielen der klick-Reize stieg in 10 dB Schritten und deckte einen Bereich von 0-80 dB ab (Abb. 10).

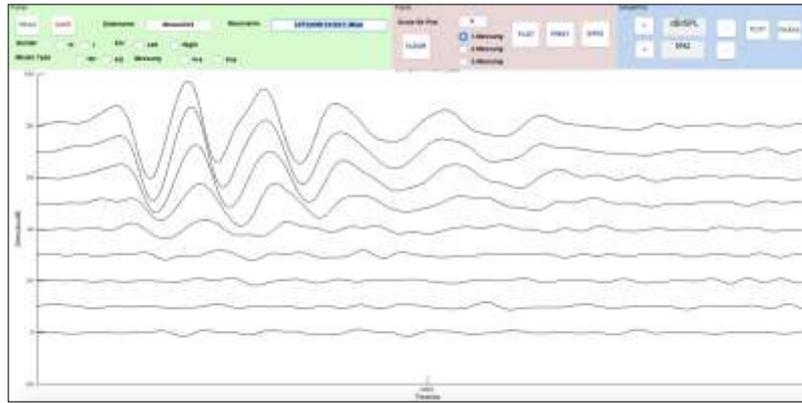


Abb. 10: Beispiel einer klick-AABR-Messung eines rechten Kontrollohres mit einer Hörschwelle von ca. 30 dB: x-Achse mit dargebotenen klick-Reizen (dB SPL) und y-Achse als Zeitachse der abgeleiteten akustisch evozierten Hirnstammpotentiale in ms hier in der Matlab-Darstellung

Für die frequenzspezifische AABR-Messung wurden Reintöne in Form einer Kosinuswelle von 5 ms Dauer präsentiert. Die Abtastrate betrug 50 kHz und es wurden für eine Messung insgesamt 128 Einzelmessungen erzeugt. Es wurden folgende Frequenzen dargeboten 2 kHz, 4 kHz, 8 kHz, 12 kHz, 16 kHz, 20 kHz, 32 kHz, 48 kHz und 80 kHz. Der Reizpegel umfasste 0-80 dB und stieg wie bei den klick-Messungen in 10 dB Schritten an.

Die Auswertung der Daten erfolgte über ein von Dipl. Ing. Patricia Stahn etabliertes Programm mit Matlab. Zuerst wurden die Hörschwellen von rechtem und linkem Ohr jeder Maus von klick- und frequenzspezifischen Messungen ermittelt. Hierfür wurde der niedrigste Schalldruckpegel ermittelt, bei dem ein, für die Maus typischer, Ausschlag des Kurvenverlaufs zu sehen war. Außerdem wurden bei der Messung die klick-AABRs Latenz und die Amplitude der Wellen P I-V ausgewertet (Abb. 11). Eine kumulative Auswertung von Latenz und Amplitude fand nur an Welle I statt, da diese bei den Versuchstieren am konstantesten reproduzierbar war und bereits in vorausgehenden Studien primär analysiert wurde [18, 84, 95, 97].

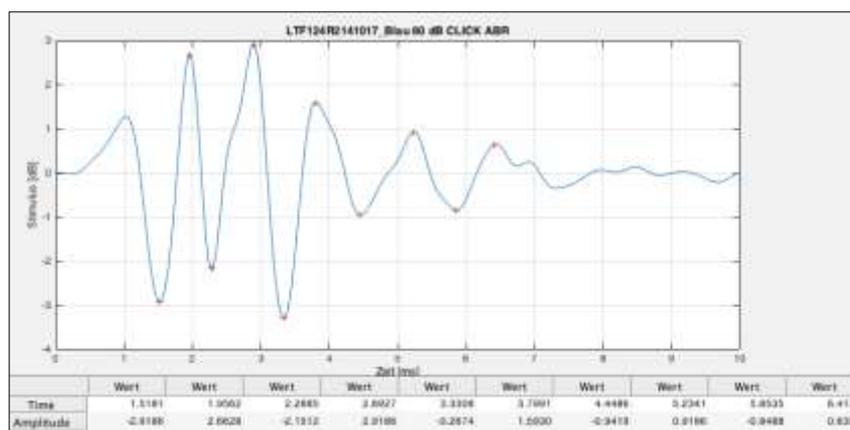


Abb. 11: Messung von Latenz und Amplituden der Wellen I – V. Matlab.

3.2.2 Laserbestrahlung

Für die Laserbestrahlung des Trommelfells wurde ein Neodymium-doped yttrium orthovanadate (Nd: YVO₄) -Laser verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Dioden gepumpten Laser mit möglichen Emissionswellenlängen von 1064 nm, 532 nm und 355 nm [61]. In dieser Dissertation fand eine Bestrahlung des Trommelfells mit 532 nm statt, da die Verwendung dieser Wellenlänge bereits für die Kollagenremodellierung und -neusynthese in vorherigen Studien etabliert wurde [12, 63].

Die Mäuse wurden ihrer Gruppe entsprechend an Tag 0 mit einer Pulsenergie von 10 mW (5 µJ), 25 mW (12,5 µJ) oder 50 mW (25 µJ) bei einer Pulsfrequenz von 2 kHz bestrahlt.

Dabei gilt: Leistung [W] = Pulsenergie [Joule, J] / Pulsfrequenz [Hz] [43].

Um eine korrekte Laserintensität bei jeder Maus zu gewährleisten, wurde der Laser vor und nach jeder Bestrahlung mit Hilfe eines Powermeters (Leistungsmesssystems) kalibriert. Hierbei wurde die Leistung in mW angegeben. Die maximale Abweichung nach der Bestrahlung war ± 3 mW.

Wie bereits erwähnt, wurde um eine maximale Absorption der Laserstrahlen in einem ausgewählten TF-Areal zu erreichen, ein eingegrenzter Bereich im hinteren oberen Quadranten des TF mit dem Pigment Fuchsin bepinselt. Fuchsin hat aufgrund seines Absorptionsspektrums die Eigenschaft Wellenlängen im Bereich von 549-552 nm zu absorbieren [88]. Bevor die eigentliche Bestrahlung stattfand, wurde die Laserfaser mit eingeschaltetem Pilotlaser mit 0,1 mW CW für 30 s so positioniert, dass der Lichtkegel des Lasers mit einem Durchmesser von ca. 400 µm genau auf das pigmentierte Areal traf, hierbei wurde das TF nicht berührt. Im Anschluss wurde der gleiche Bereich mit 10 mW (5 µJ), 25 mW (12,5 µJ) oder 50 mW (25 µJ) bestrahlt (Abb. 12).



Abb. 12: Versuchsaufbau der Laserbestrahlung: Einstellung der Laserfaser mittels Mikromanipulator, sodass weder Gehörgang noch Trommelfell der Maus berührt werden und der Laserkegel des Pilotlasers mit einem Durchmesser von ca. 400 μm genau auf den mit Pigment markierten Bereich des post. sup. Quadranten des linken TFs fällt.

3.2.3 Gewinnung und Aufarbeitung des Felsenbeins

Innerhalb einer Stunde nach manueller Dekapitation der Versuchstiere, wurde der Schädel eines jeden Tieres mittels Schere von seinem Körper getrennt und die Haut von der Kalotte gelöst. Hierbei wurde ein Großteil des knorpeligen Gehörganges vom Ohr getrennt, damit eine volle Einsicht auf das Trommelfell gewährleistet war. Mit Hilfe eines Stereomikroskops und mikrochirurgischem Besteck war es nun möglich durch zwei Einschnitte im Bereich der Schädeldecke die Felsenbeine von der Schädelbasis, wie im Folgenden beschrieben, zu trennen (Abb. 13).

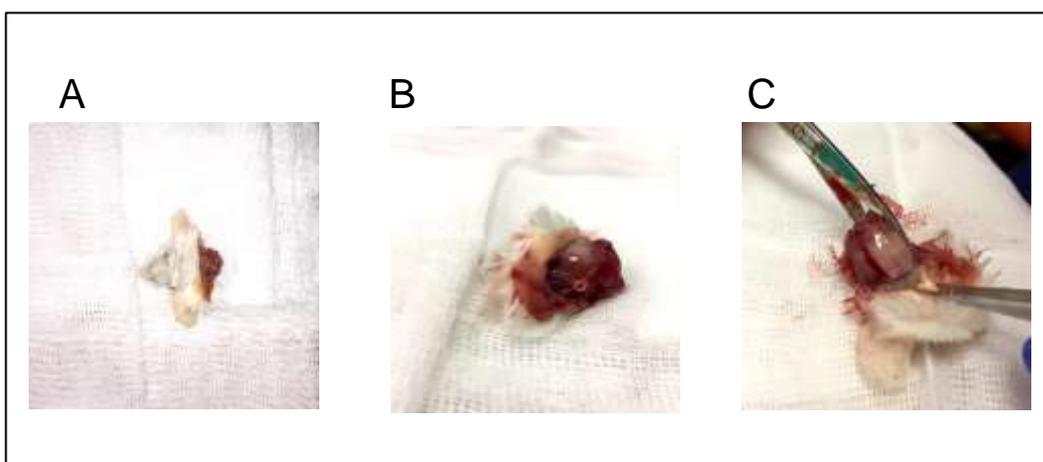


Abb. 13: Darstellung der Schritte A. Dekapitation, B. Skalpierung und C. Eröffnung der Schädelkalotte zur Entnahme der Felsenbeine.

Nach optimaler Darstellung der Strukturen der Schädelbasis, sowie Säuberung und Sicherung aller wichtigen anatomischen Strukturen, wurde nun vorsichtig das Felsenbein (*pars petrosa des os temporale*) mit Gehör- und Gleichgewichtsorgan [73] herauspräpariert. Hierbei galt es auf die Unversehrtheit der Organe zu achten und eine mögliche Verschmutzung, z.B. durch Einblutung über den äußeren Gehörgang, zu verhindern.

Nachdem überschüssiges Gewebe wie bspw. Muskeln und Blut von den knöchernen Strukturen des Präparates entfernt waren, wurde die Paukenhöhle mittels mikrochirurgischer Schere im Bereich ihrer dorsalen Wand großzügig eröffnet, um einer späteren Bildung von Lufteingüssen bei der histologischen Aufarbeitung vorzubeugen (Abb. 14).

Da eine schnelle Fixierung der *membrana tympani* außerordentlich wichtig war, wurde der Bereich lateral und medial des Trommelfells mit Fixans gespült. Dies geschah mit Hilfe einer kleinen Insulinspritze (Abb. 14 E.). Nach erfolgter Spülung wurde das Präparat in Fixans eingetaucht.

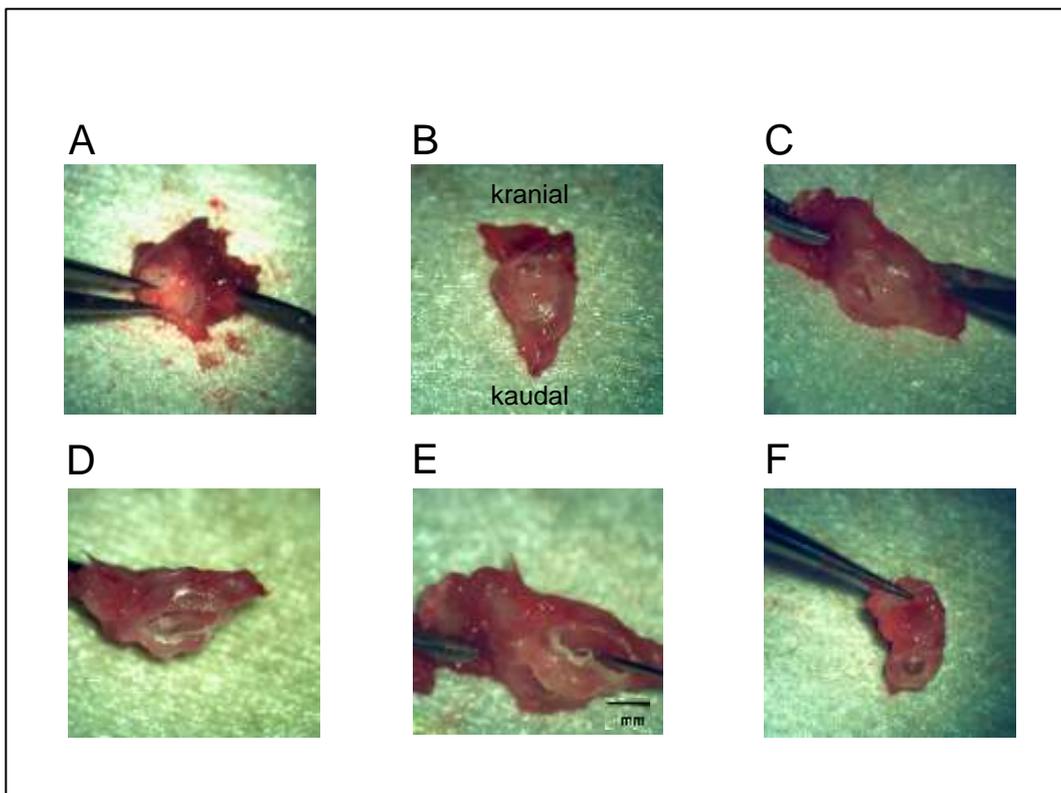


Abb. 14: Darstellung der Präparationsschritte: A. - B. Auslösen des Felsenbeines mit anschließender Säuberung, C. - F. Eröffnung der Paukenhöhle, E. Spülung der Paukenhöhle mittels Fixans und Fixierung über mindestens 48 h F. Anschließende Ausrichtung des Felsenbeines für nachfolgende Einbettung

3.2.4 Färbemethoden

Für die Hämatoxylin-Eosin- (HE) und Pikro-Siriusrot-Färbung wurden die entnommenen Felsenbeine mit einer 4%igen Formaldehydlösung gespült und für 2 Tage fixiert. Hierbei wurden die Felsenbeine auf einen Wippschüttler gestellt um durch die kontinuierliche Bewegung einer möglichen Luftblasenbildung im Gewebe, insbesondere am Trommelfell vorzubeugen. Im Anschluss wurden die Präparate für 4 Tage in EDTA in einem Wärmebad bei 37 °C entkalkifiziert. Nach erfolgreicher Entkalkifizierung wurden die Felsenbeine für 2 Tage im sog. Hypercenter (Sakura Finetek USA, Inc.) durch eine automatisierte aufsteigende Ethanolreihe (70% bis 100%) entwässert und mit Xylol (100%) gespült, um eine spätere Einbettung in Paraffin zu ermöglichen. Am darauf folgenden Tag wurde das Xylol verworfen und über Nacht erfolgte die Einbettung in flüssiges Paraffin. Dies geschah nach dem Versuchsprotokoll des Labors der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Mit Hilfe der sog. Einbettstation wurden die Felsenbeine mit dem kaudalen Pol der *bulla tympanica* zuerst in die mit flüssigem Paraffin gefüllten Einbettförmchen eingebettet. Diesem Vorgang war besondere Bedeutung beizumessen, da die richtige Positionierung des Präparates bei der Einbettung für die weitere histologische Verarbeitung entscheidend war. Anschließend wurden die eingebetteten Felsenbeine auf eine Kühlplatte gestellt, sodass die Paraffinblöcke abkühlten und ausgeblockt werden konnten.

Überschüssiges Paraffin wurde nun durch ein Skalpell von den Felsenbeinen entfernt. Danach wurden die Präparate in der vorgesehenen Schneidestation (Mikrotom LEICA EM UC7, © 2015 Leica Biosystems, Nussloch Deutschland) positioniert und fest eingespannt (Abb. 15). Mit einer Schneideklinge wurde so viel Paraffin vom kaudalen Anteil eines jeden Paraffinblockes entfernt bis der kaudale Pol der *bulla tympanica* mit dem Beginn des Trommelfells eindeutig zu erkennen war. Dies konnte bereits makroskopisch festgestellt werden und wurde zusätzlich durch einen Probeschnitt mikroskopisch verifiziert. Das Schneiden der Mittelohrpräparate beginnend vom kaudalen Pol nach kranial erfolgte in Serienschnitten mit einer Stärke von 8 µm. Hierbei wurden jeweils 3 Schnitte auf einem Objektträger platziert um die Wahrscheinlichkeit für ein qualitativ hochwertiges Bild in der späteren Mikroskopie zu erhöhen. Pro Felsenbein wurden etwa 50 Objektträger angefertigt.



Abb. 15: Schneidvorgang der in Paraffin eingebetteten Felsenbeine mittels Mikrotom.

Am Tag vor der jeweiligen Färbung wurden die Objektträger in einen Wärmeschrank bei 65 °C bis zur Weiterverarbeitung inkubiert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Orientierung betreffend die Anatomie des Hörorgans und der Qualität des Trommelfells wurde jeder neunte Objektträger mit HE gefärbt.

Nach ca. 24 h im Wärmeschrank wurden die Präparate nach folgendem Färbeschema aus dem Labor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes weiterbehandelt:

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. 3 x 100% Xylol | 3 x 3 s |
| 2. 3 x 100% Ethanol | 3 x 3 s |
| 3. 3 x 70% Ethanol | 3 x 3 s |
| 4. <i>Aqua destillata</i> (Aqua dest.) | 2 min |
| 5. Hämatoxylin nach Mayer | 10 min |
| 6. Leitungswasser | bis das Wasser farblos war |
| 7. HCL-Alkohol | 3 s |
| 8. Leitungswasser | 10 min |
| 9. Eosin | 30 s |
| 10. Leitungswasser | bis das Wasser farblos war |
| 11. 3 x 70% Ethanol | 3 x 3 s |
| 12. 3 x 100% Ethanol | 3 x 3 s |
| 13. 3 x 100% Xylol | 3 x 3 s |

Die gefärbten Schnitte wurden nun mit Entellan eingedeckt und zum Trocknen für mindestens 24 h unter einer Abzugshaube gestellt.

Pikro-Siriusrot-Färbung

Zur Messung der Dicke des TFs (s. 3.2.5) und der Brechkraft seiner kollagenen Fasern (s. 3.2.6) wurde bei jedem 10ten Objektträger die Pikro-Siriusrot-Färbung durchgeführt (John A. Kieran, Department of Anatomy & Cell Biology, The University of Western Ontario, LONDON, Canada N6A 5C1).

Es wurde folgendes Färbeprotokoll angewandt:

- | | |
|--------------------------|---------|
| 1. 3 x 100% Xylol | 3 x 3 s |
| 2. 3 x 100% Ethanol | 3 x 3 s |
| 3. 3 x 70% Ethanol | 3 x 3 s |
| 4. Aqua dest. | 2 min |
| 5. Weigerts Haematoxylin | 8 min |
| 6. Leitungswasser | 10 min |
| 7. Picro-Siriusrot | 60 min |
| 8. Leitungswasser | 3 s |
| 9. 3 x 70% Ethanol | 3 x 3 s |
| 10. 3 x 100% Ethanol | 3 x 3 s |
| 11. 3 x 100% Xylol | 3 x 3 s |

Wie zuvor erläutert, wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt und getrocknet.

3.2.5 Durchlichtmikroskopie

Pro Ohr wurden 3-4 Pikro-Siriusrot gefärbte Objektträger zur weiteren lichtmikroskopischen Auswertung verwendet. Hierfür wurden unterschiedliche Schnittebenen (SE 1-3) vom Trommelfell ausgesucht (Abb. 16). Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen betrug etwa 210 µm. Bei 12 von insgesamt 166 Ohren, bedingt durch technische Probleme z.B. Luftblasen im Präparat, konnten nur 1-2 Schnittebenen ausgewertet werden. Insgesamt wurden pro Gruppe mindestens 6 Mäuse mit 3 Schnittebenen je Ohr eingeschlossen.

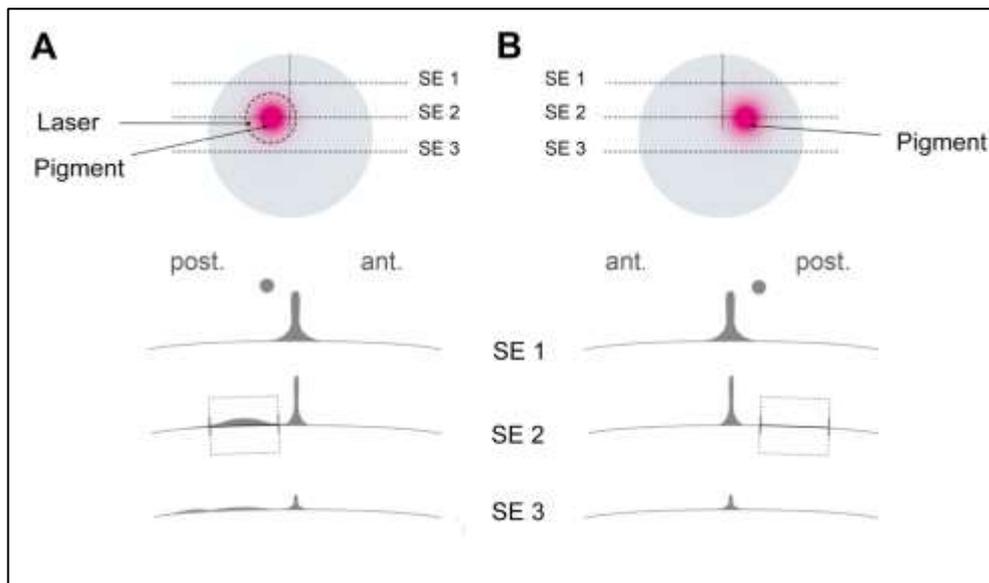


Abb. 16: A. Linkes bestrahltes TF mit Darstellung der verschiedenen Schnitt Ebenen (SE 1-3), B. Rechtes nicht bestrahltes TF mit Darstellung der verschiedenen Schnitt Ebenen (SE 1-3).

Die histologische Darstellung und Auswertung der zu analysierende TFs erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (OLYMPUS BX61 Motorized Sytem Microscope, Olympus America Inc., USA) und einer Kamera (Olympus SC30, Olympus America Inc., USA) mit angeschlossenen rechnergestützten Bildbearbeitungssystem (cellSens Software, *Version 1.6*, OLYMPUS COOPERATION, USA). Um einen bestmöglichen Überblick über das Mittelohr zu erhalten, wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme in zweifacher Vergrößerung aufgenommen. Im Anschluss fanden Aufnahmen in zehnfacher Vergrößerung statt. Hierbei wurden die histologischen Präparate mit den im Versuchsprotokoll erstellten Skizzen abgeglichen. Dies diente dazu den genauen Bereich des TFs zu betrachten, der mit Fuchsin bepinselt und mit Licht bestrahlt wurde (Schnitt Ebene 2 genannt). Zur Ausmessung der TF-Dicke des bestrahlten Areals wurden vier Punkte auf der SE 2 ausgewählt. An jedem einzelnen Punkt wurde nun die Dicke des TFs mit einem tangentialen Lot ausgemessen (Abb. 17). Aus den 4 ausgemessenen Abständen wurde anschließend ein Mittelwert pro Schnitt Ebene gebildet.

Die 4 an Tag 0 geopferten Mäuse aus der Gruppe 25 mW und 50 mW waren nicht Teil der mikroskopischen Auswertung und wurden nur auf mögliche Schädigung des TF untersucht.

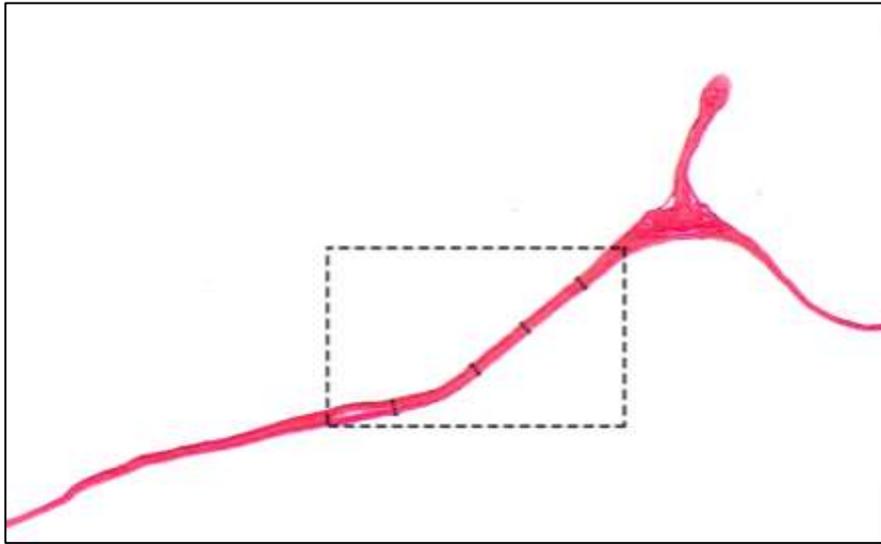


Abb. 17: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der TF-Dicke des bestrahlten TFs. Gemittelt aus 4 tangential ausgemessenen Abständen im zuvor festgelegten Areal.

3.2.6 Polarisationsmikroskopie

Für die Polarisationsmikroskopie wurden die Schnitte aus der Durchlichtmikroskopie (s. 3.2.5) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop (OLYMPUS BX61 Motorized System Microscope, Olympus America Inc., USA), zwei integrierbaren Polfiltern und einer Kamera (Olympus SC30, Olympus America Inc., USA) mit angeschlossenem Bildbearbeitungssystem (cellSens Software, *Version 1.6*, OLYMPUS COOPERATION, USA). Der Polarisator wurde unter dem Kondensator auf der Lichtaustrittsöffnung angebracht und war durch das dafür versehene Zahnrad drehbar. Der Analysator befand sich zwischen Objektiv und Okular.

Nachdem das Präparat im Hellfeld eingestellt wurde erfolgte eine Positionierung der beiden Polfilter. Hierbei wurde der Analysator zum Polarisator so gedreht, dass das Bild bis auf doppelbrechendes Gewebe schwarz erschien. Sobald der Kontrast zwischen schwarzer Umgebung und optisch anisotropen Strukturen am stärksten war, wurde ein Bild aufgenommen. Das Durchlicht wurde konstant bei 8 V und die Belichtungsdauer auf 1000 ms festgelegt. Die Bildgebung wurde in 10-facher und 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur weiteren Auswertung mit Image J wurden die Bilder in 10facher Vergrößerung herangezogen.

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image J wurde anschließend ein Polygon von Minimum (min.) 3000 bis Maximum (max.) 4000 Pixel im zu betrachtenden Trommelfellquadranten ausgewählt (Abb. 18).



Abb. 18: Exemplarische Darstellung der Messung der Birefringenz des Trommelfells (LTF 121 links) durch Einzeichnung eines Polygons mit 3000 – 4000 Pixeln.

3.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

11 Mäuse wurden für die Elektronenmikroskopie verwendet. Eine Maus wurde als Negativkontrolle verwendet und nicht behandelt, 3 Mäuse wurden mit 10 mW, 3 Mäuse mit 25 mW und 4 Mäuse mit 50 mW bestrahlt. Die Opferung fand 4 Wochen nach der Bestrahlung statt. Wie unter 3.2.3 beschrieben wurden die Felsenbeine entnommen und mit einer Lösung aus 1% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd, in 0,1 M Cacodylatpuffer fixiert. Nach einem Tag wurden die Präparate mit Cacodylatpuffer gespült und im Anschluss mit 20% EDTA in einem Wärmebad bei 37 °C für 7 Tage entkalkifiziert. Während den 7 Tagen wurden die Felsenbeine regelmäßig mit Cacodylatpuffer gewaschen, EDTA ausgewechselt und überschüssiges gelöstes Gewebe aus der Lösung entfernt. Daraufhin fand eine kurze Spülung in Cacodylatpuffer statt. Hiernach wurden die Präparate nach folgendem Protokoll aus dem Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Universität des Saarlandes weiterbehandelt:

- | | |
|------------------------|-------------------------------|
| 1. 4 x Cacodylatpuffer | über Nacht danach 3 x Wechsel |
| 2. 2%-ige Osmiumlösung | 2 h |
| 3. 4 x Aqua dest. | 4 x 5 min |
| 4. 3 x 70% Ethanol | 3 x 5 min |
| 5. 80% Ethanol | 30 min |
| 6. 90% Ethanol | 30 min |
| 7. 96% Ethanol | 30 min |
| 8. 100% Ethanol | 2 x 45 min |

- | | |
|--|------------------------------------|
| 9. 3 x 100% Aceton | 3 x 45 min |
| 10. Aceton: Epon (3:1) | 1,5 h |
| 11. Aceton: Epon (1:1) | 1,5 h |
| 12. Aceton: Epon (1:3) | über Nacht bei Raumtemperatur (RT) |
| 13. Reines Epon | 1h bei 40 °C |
| 14. Reines Epon | 1h bei RT |
| 15. Präparate in mit Epon gefüllte Einbettförmchen von einer Größe von 6 x 12 x 5 Millimeter (mm) orientieren und beschriften. | |
| 16. Wärmeschrank 60 °C | 2 Tage |

Die fertig eingebetteten Felsenbeine wurden dann mit einer Schleifmaschine, beginnend vom kaudalen Pol bis kurz vor der Insertion des Malleolus, abgeschliffen und poliert. Um eine optimale Einspannung in das Ultramikrotom zu ermöglichen, wurde das in Epon befindliche Mittelohr anschließend in einen 2 x 2 mm großen Block zurechtgeschnitten. Danach wurden die Blöcke des Mittelohrs zur Herstellung von Semidünnschnitten zu einer ca. 1 x 2 mm großen Pyramide zurechtgeschnitten. Daraufhin wurden mit einem Diamantmesser Semidünnschnitte in drei Trommelfellebenen angefertigt mit einem Abstand von jeweils 210 µm voneinander. Jede Ebene beinhaltete einen 0,5 µm Semidünnschnitt und 4 - 5 ca. 70 nm Ultradünnschnitte. Die Semidünnschnitte dienten zum einen der Orientierung und zum anderen der Qualitätsbeurteilung des Präparates. Sie wurden auf einem Objektträger aufgebracht bei 80 °C getrocknet, mit Richardson-Färbelösung für ca. 20 s auf die 80 °C heiße Wärmeplatte eingefärbt und anschließend mit Aqua dest. abgespült. Unmittelbar nach dem Trocknen wurden sie mikroskopisch betrachtet. Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Ultradiamantmesser. Die ca. 70 nm dünnen Schnitte wurden auf Kupfergrids gezogen und getrocknet. Danach wurden sie für 10 Min mit einer 2%igen Uranylacetatlösung kontrastiert und anschließend für 7 min mit einer Bleicitratlösung nachkontrastiert.

Die mikroskopische Auswertung der Ultradünnschnitte fand mit einem Transmissionselektronenmikroskop (*TECNAI 12*, FEI Niederlande) statt. Fotografiert wurden diese mit einer Olympus Kamera. Die Bilder wurden nun mit Hilfe des iTEM Programms weiterverarbeitet, abgespeichert und ausgewertet.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS von IBM (Statistics 25, SPSS IBM, USA). Alle Tests wurden mit einem Signifikanzniveau von 5% (alpha-Wert von 0,05) durchgeführt.

Die Hörschwellen der klick- und frequenzspezifischen Messungen wurden mit einem nicht-parametrischen Friedman-Test analysiert. Zusätzlich wurde eine Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) mit Messwiederholung, eine sog. repeated measure ANOVA (rmANOVA) für den Faktor „Laser-Intensität“ und den Faktor „Zeitpunkt der Opferung in Wochen“ durchgeführt, hierbei wurde die Huynh-Feldt-Korrektur zur Anpassung der Freiheitsgrade verwendet.

Zur Analyse der Latenz und Amplitude der Welle I in den klick-Messungen, sowie der Analyse der TF-Dicke und der Polarisierung des TFs wurden eine einfaktorielle ANOVA angewendet. Zum besseren Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurde zusätzlich ein Bonferroni korrigierter post-hoc-Test durchgeführt. Zur Überprüfung der Gleichheit der Varianzen der unterschiedlichen Gruppen wurde zusätzlich ein Levene Test angewendet. Wenn sich dieser Test als signifikant erwies (keine Varianzhomogenität der Daten), wurde eine robustere Welch-ANOVA zur Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte angeschlossen, gefolgt von einem Games-Howell post-hoc-Test. In den Fällen, in denen die Daten nicht normalverteilt waren, wurde zudem ein nichtparametrischer Friedman-Test angewendet, gefolgt von einem Bonferroni korrigierten post-hoc-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte der Lasertherapie auf das Hörvermögen der Tiere

Akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentialie (AABR)

Klick- und frequenzspezifische AABR-Messungen wurden bei allen Mäusen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt (s. 3. 2. 1). An Tag 0 wurde die Ausgangshörschwelle (erste Hörmessung, H1) aller Tiere vor Laserbestrahlung bestimmt und mit nachfolgender zweiter Hörmessung (H2) (unmittelbar nach der Bestrahlung) und dritter Hörmessung (H3) (am Tag der Opferung) verglichen.

Aus der Auswertung der Daten wurden die an Tag 0 geopferten Tiere, sowie die der Elektronenmikroskopie (TEM) zugeordneten Mäuse, ausgeschlossen. Die Exklusion der TEM-Mäuse hatte den Grund eine mögliche Verzerrung der Daten zu vermeiden, da 6 von 10 Mäusen von Beginn an taub waren. Die Ursache für die überdurchschnittlich hohe Taubheitsrate war vermutlich eine zu diesem Zeitpunkt im Tierstall ausgebrochene Wurmerkrankung.

4.1.1 Klick-Hirnstammaudiometrie

Hörschwellen

Die Ausgangshörschwelle (H1) der Tiere ($n = 65$) an Tag 0 betrug im Durchschnitt 47 dB SPL. Bei 9 Tieren konnte von Beginn an keine Hörschwelle bis 80 dB SPL gemessen werden. Dieser Hörstatus wurde als Taubheit gewertet.

Die direkt im Anschluss an die TF-Bestrahlung gemessenen Hörschwellen (H2) der Mäuse zeigte im Vergleich zur ersten Messung (H1) keine signifikante Verschiebung.

Die Hörschwellen der finalen AABR-Messungen (H3) an Tag 14, 28 oder 56 betrug im Durchschnitt 60 dB SPL \pm 30dB SPL. Die Anzahl der tauben Tiere erhöhte sich um 3.

Bei 56 Mäusen zeigte sich bei der finalen Hörmessung (H3) eine Hörschwellenverschiebung sowohl auf dem bestrahlten (linkem Ohr) als auch auf dem nicht bestrahlten Ohr (rechtem Ohr) von 10 bis 40 dB. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede der Messungen zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem festgestellt werden ($p = 0,687$).

Amplituden und Latenzen der Welle I bei 10 dB über Hörschwelle

Die Amplitude (Ampl.) und Latenz (Lat.) der Welle I wurden wie in 3. 2. 1 aufgezeigt ausgemessen und notiert. Eine finale Auswertung wurde von Daten bei 10 dB SPL über Hörschwelle

durchgeführt um eine eindeutige Darstellung der Welle I zu sichern. Um zusätzlich einen möglichen Unterschied zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Ohr aufweisen zu können, wurden die Werte von Amplitude und Latenz in ein Verhältnis von linkem (bestrahlt) Ohr zu rechtem (nicht bestrahltem) Ohr gesetzt. Das stellte sich rechnerisch wie folgt dar: $Ampl_{H1\ li} - Ampl_{H1\ re}$, $Lat_{H1\ li} - Lat_{H1\ re}$; $Ampl_{H2\ li} - Ampl_{H2\ re}$, $Lat_{H2\ li} - Lat_{H2\ re}$; $Ampl_{H3\ li} - Ampl_{H3\ re}$, $Lat_{H3\ li} - Lat_{H3\ re}$.

$$Ampl_{H1\ li} - Ampl_{H1\ re} ; Lat_{H1\ li} - Lat_{H1\ re}$$

$$Ampl_{H2\ li} - Ampl_{H2\ re} ; Lat_{H2\ li} - Lat_{H2\ re}$$

$$Ampl_{H3\ li} - Ampl_{H3\ re} ; Lat_{H3\ li} - Lat_{H3\ re}$$

Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung zeigte bei der Auswertung von Amplitude und Latenz eine Normalverteilung und stellte sich statistisch als nicht signifikant dar ($p = 0,686$), sodass auf einen anschließenden post-hoc-Test verzichtet werden konnte.

4.1.2 Frequenzspezifische Hirnstammaudiometrie

Die Tiere hörten im Durchschnitt in einem Frequenzbereich von 4-32 kHz. Wie bei den klick-Messungen wurden Hörschwellen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (H1-3) ermittelt und miteinander verglichen. Auch hier wurde die Hörschwellendifferenz zwischen linkem und rechtem Ohr analysiert.

Die frequenzspezifischen AABR-Messungen zeigten, ähnlich zu den klick-AABR-Messungen, keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Hörschwelle zwischen dem bestrahlten und dem nicht bestrahlten Ohr ($p =$ s. Tab. 3).

Click [kHz]	2	4	8	12	16	20	32	48	80
p =	1,000	0,559	0,859	0,288	0,826	0,779	0,846	1,000	1,000

Tab. 3: Signifikanz-Analyse der frequenzspezifischen-AABR-Messungen.

4.2 Durchlichtmikroskopie

Mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie erfolgte die Visualisierung der TF-Schnitte um die Auswirkung der Laserbehandlung auf das TF zu erfassen. Die Ausmessung der TF-Dicke der einzelnen Schnittebenen (SE) bzw. der einzelnen TF-Abschnitte erfolgte wie in 3. 2. 5 beschrieben. Der Mittelwert jeder SE des bestrahlten Ohres (links) wurde mit dem Mittelwert der korrespondierenden SE des rechten Ohres verglichen. Um eine Zu- oder Abnahme der Trommelfelldicke nach Bestrahlung quantitativ zu erfassen, wurde die Differenz zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Ohr für jede SE und jede Trommelfelhälfte gebildet. Statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt wurden nur die Ergebnisse der post. TF-SE für die nach 2, 4 und 8 Wochen geopfertten Mäuse.

Erfolgreich ausgewertet wurden: In der mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten Gruppe insgesamt 18 Mäuse, in der mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlten Gruppe insgesamt 21 Mäuse und in der mit 50 mW (25 μ J) bestrahlten Gruppe 21 Mäuse. Grund für das fehlende Auswerten von 2 Mäusen in der mit 25 mW bestrahlten Gruppe und 3 Mäusen in der mit 50 mW bestrahlten Gruppe waren Schäden am Trommelfell aufgrund von Lufteinschlüssen oder Verschmutzung des Präparates bei der histologischen Aufarbeitung.

4.2.1 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Gewebezunahme des TFs

Die bestrahlte SE war in 57 Fällen (n=60) die mittlere SE 2 und in 3 Fällen war der bestrahlte Bereich entweder in der kaudalen oder kranial gelegenen SE. Im Folgenden werden die bestrahlte Schnittebene und ihre Kontrollsnittebene des kontralateralen Ohres verglichen (Abb. 19-21).

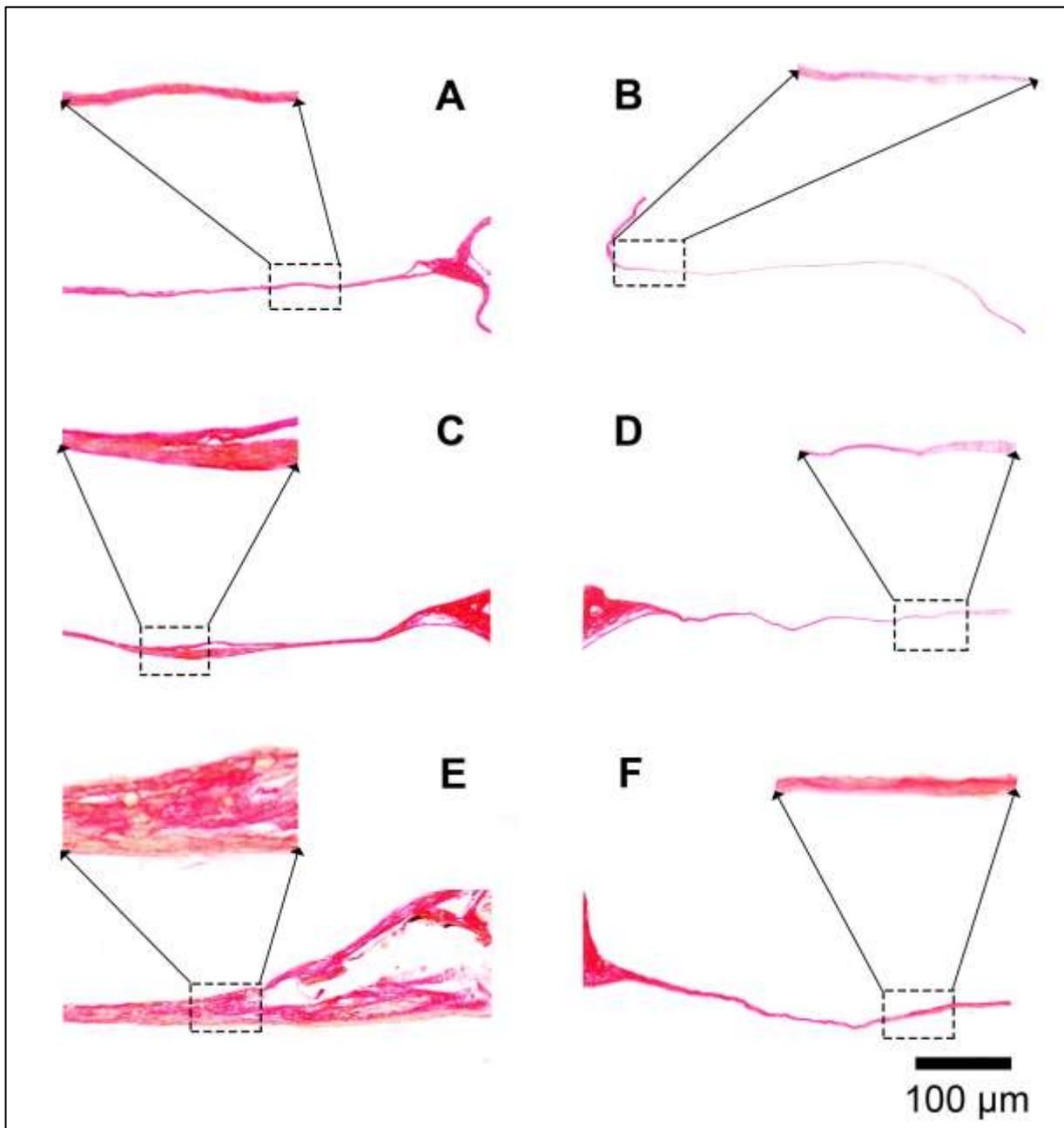


Abb. 19: Durchlichtmikroskopie zur Darstellung der TF-Dicke des bestrahltem TF und des dazugehörigem Kontroll-TF, alle Tiere wurden nach 2 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW (5 µJ) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW (25 µJ) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

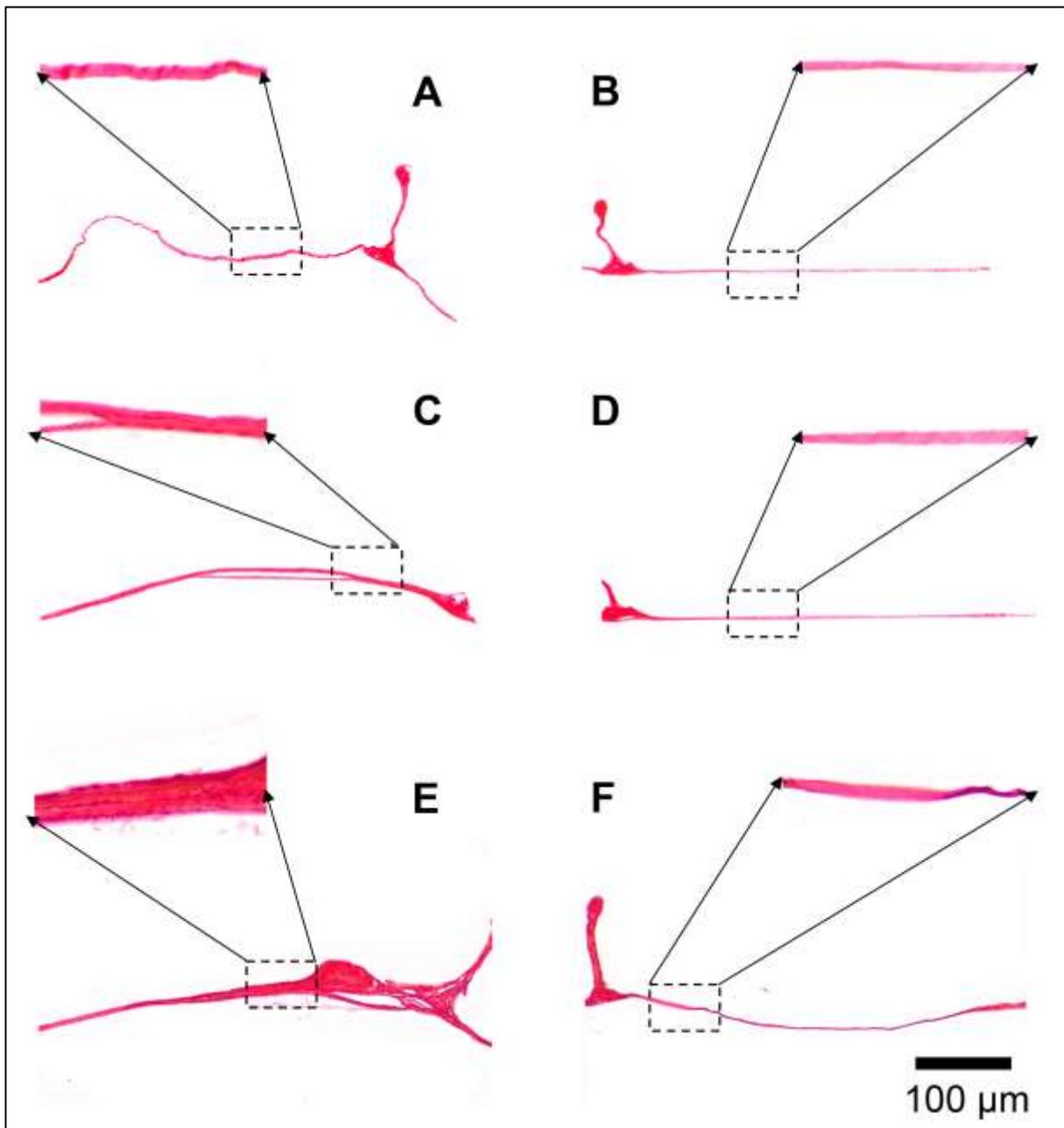


Abb. 20: Durchlichtmikroskopie zur Darstellung der TF-Dicke des bestrahltem TF und des dazugehörigem Kontroll-TF, alle Tiere wurden nach 4 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW (5 µJ) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW (25 µJ) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

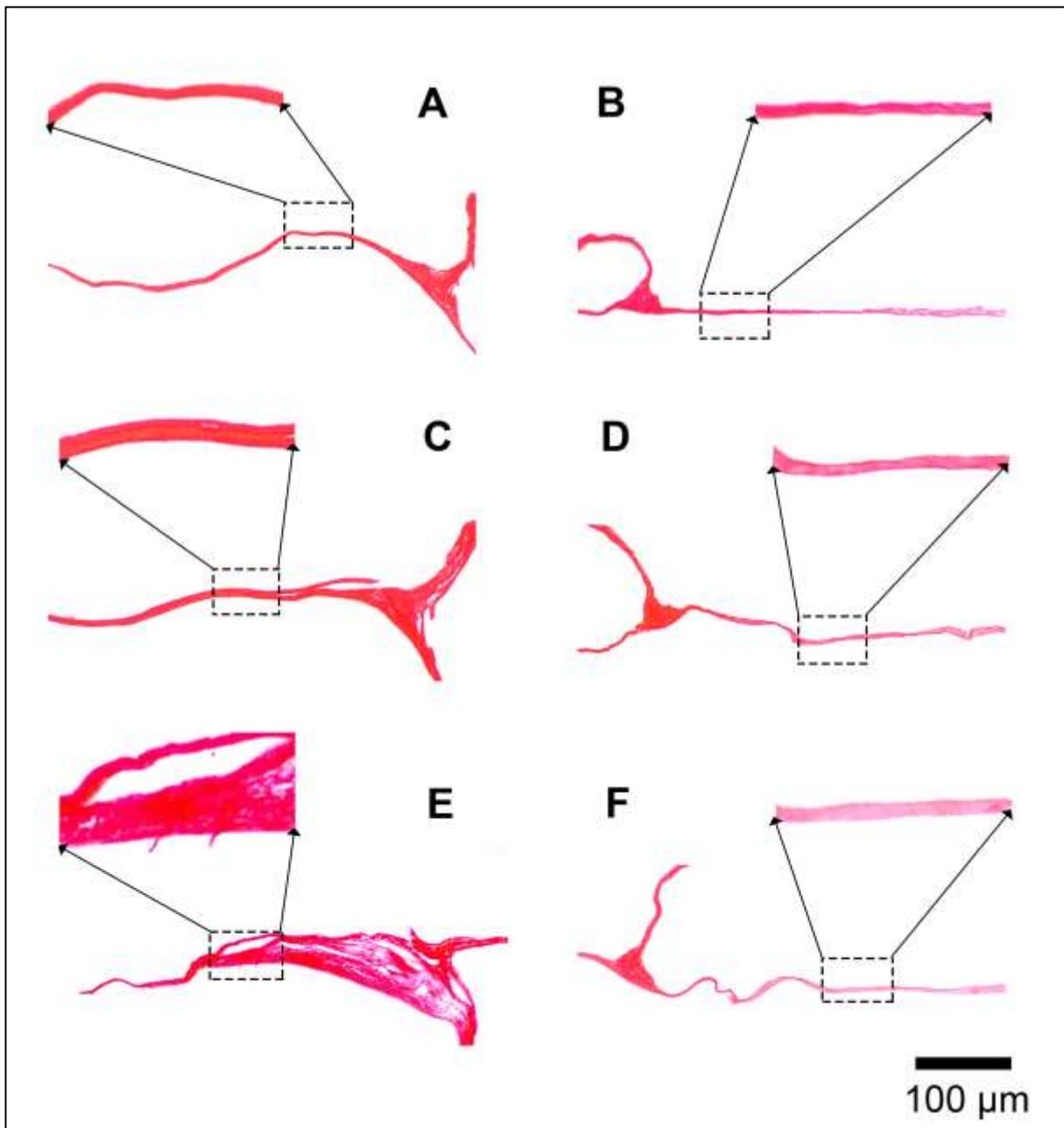


Abb. 21: Durchlichtmikroskopie zur Darstellung der TF-Dicke des bestrahltem TF und des dazugehörigem Kontroll-TF, alle Tiere wurden nach 8 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW (5 µJ) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW (25 µJ) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

Hierbei ergaben sich nachstehende Daten zur quantitativen Gewebezunahme bzw. -abnahme (maßgebend hierfür war die Bestimmung der Dicke des TF) des bestrahlten TF-Areals (Tab. 4).

Versuchsgruppen	TF-Dicke [μm]		
	Min.	Durchschnitt	Max.
10 mW (5 μJ), 30 s Opferung Woche 2	-1	0,5	1,5
10 mW (5 μJ), 30 s Opferung Woche 4	-1	-0,3	0,75
10 mW (5 μJ), 30 s Opferung Woche 8	-1,25	-0,13	0,75
25 mW (12,5 μJ), 30 s Opferung Woche 2	9,75	18	36,5
25 mW (12,5 μJ), 30 s Opferung Woche 4	6,75	12,5	20
25 mW (12,5 μJ), 30 s Opferung Woche 8	7,75	12,7	16,5
50 mW (25 μJ), 30 s Opferung Woche 2	15,25	28,9	48,75
50 mW (25 μJ), 30 s Opferung Woche 4	9	18,1	36,5
50 mW (25 μJ), 30 s Opferung Woche 8	8	19,6	33,5

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen eingeteilt nach Intensität der Laserbestrahlung, sowie Zeitpunkt der Opferung mit errechneter Zu- bzw. Abnahme der TF-Dicke nach Bestrahlung.

Die erhobenen Daten der bestrahlten SE und der des Kontrollohres wurden nun als Boxplots graphisch dargestellt (Abb. 22-23). Für eine bessere Vergleichbarkeit und Anschaulichkeit wurde zusätzlich eine Darstellung der 3 Negativkontrollen (NK) abgebildet, bei denen die Erhebung der Daten mit denen der bestrahlten Tiere übereinstimmte.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass die Dicke des TF mit Erhöhung der Bestrahlungsintensität zunahm (Abb. 22). Diese Gewebezunahme zeigte sich statistisch signifikant bei Tieren, die mit 25 mW (12,5 μJ) und 50 mW (25 μJ) bestrahlt wurden. Bei den Mäusen, die mit 10mW (5 μJ) bestrahlt wurden, konnte keine Zunahme der Trommelfelldicke festgestellt wer-

den (Abb. 22 B). Eine maximale Gewebezunahme konnte in der Gruppe der mit 50 mW bestrahlten Versuchstiere nach 2 Wochen objektiviert werden (Abb. 22 D). Obwohl bei Betrachtung der Abb. 22 ein Trend zur Gewebezunahme abhängig von der Bestrahlungsintensität beobachtet werden konnte, war dieser nur zwischen den Gruppen 10 mW (5 μ J) zu 25 mW (12,5 μ J) und 10 mW (5 μ J) zu 50 mW (25 μ J) signifikant (Abb. 23). Dieser Effekt wurde bei allen Zeitpunkten der Opferrung (1, 4 oder 8 Wochen) beobachtet.

Bei den Mäusen, welche nach 2 Wochen geopfert wurden, konnte eine signifikante Gewebezunahme des TFs zwischen den Gruppen mit einer Bestrahlungsintensität von 10 mW im Vergleich zu denen mit einer Bestrahlungsintensität von 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,007$) und 50 mW (25 μ J) ($p < 0,000$) objektiviert werden (Abb. 23 B). Jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen denen mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Tieren ($p = 0,090$).

Mäuse die nach 4 Wochen geopfert wurden zeigten eine signifikante Gewebezunahme des TFs zwischen den Gruppen mit einer Bestrahlungsintensität von 10 mW im Vergleich zu denen mit einer Bestrahlungsintensität von 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,001$) und 50 mW (25 μ J) ($p = 0,002$) (Abb. 23 C). Jedoch wurde erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren welche mit 25 mW und 50 mW (25 μ J) bestrahlten wurden beobachtet ($p = 0,165$).

Wie bereits bei den nach 2 und 4 Wochen geopfert Versuchstieren, zeigten auch die Mäuse, welche nach 8 Wochen geopfert wurden, eine signifikante Gewebezunahme der TF-Dicke zwischen den Gruppen mit einer Bestrahlungsintensität von 10 mW im Vergleich zu den Tieren, welche mit einer Bestrahlungsintensität von 25 mW (12,5 μ J) ($p < 0,000$) und 50 mW (25 μ J) ($p = 0,002$) behandelt wurden (Abb. 23 D). Auch bei diesen Versuchen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen, welche jeweils mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) Bestrahlung behandelt wurden ($p = 0,305$).

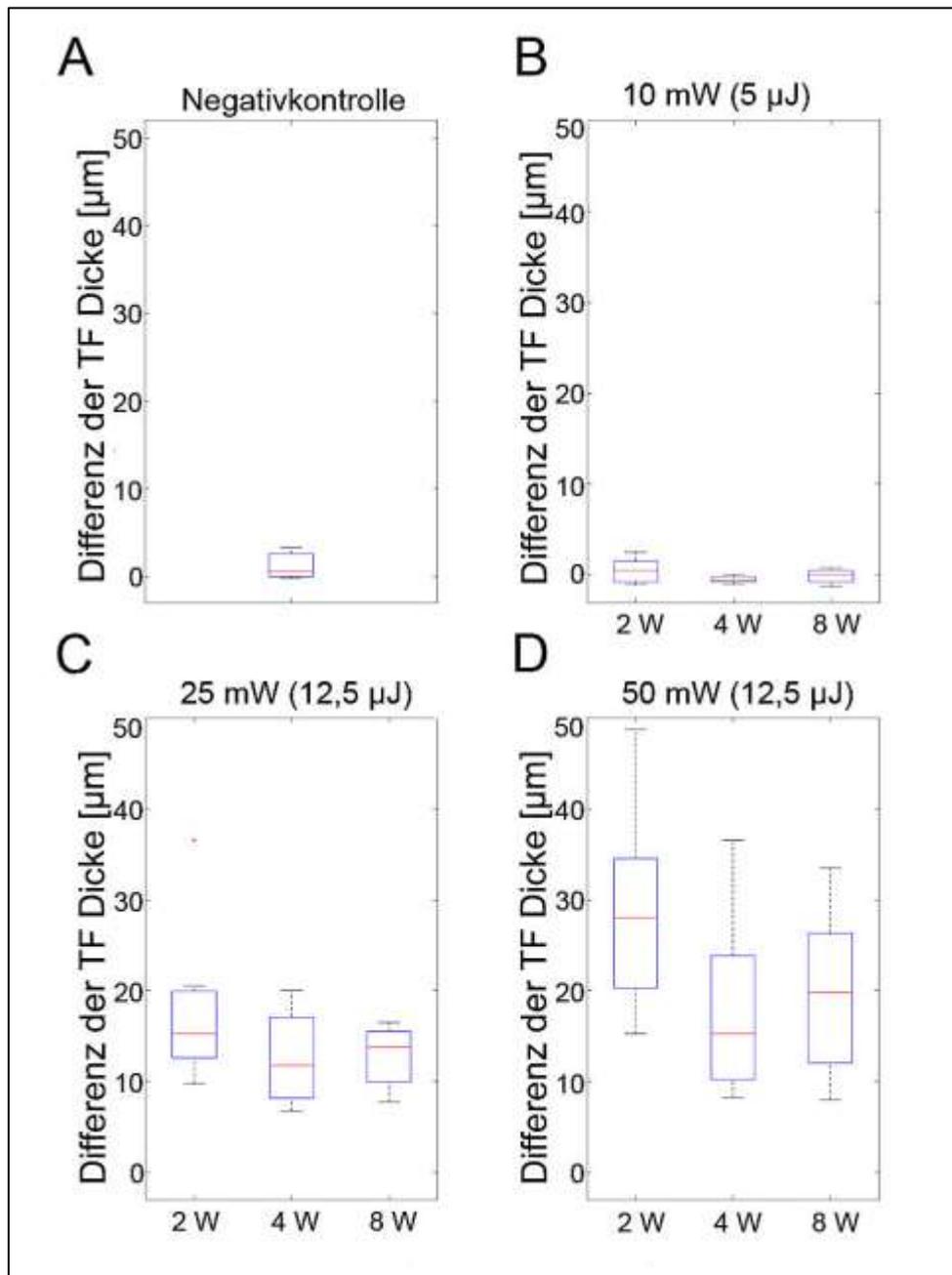


Abb. 22: Darstellung der TF-Dicke in μm (y-Achse) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Operation in Wochen (x-Achse) bezogen auf die Bestrahlungsintensität der einzelnen Gruppen. A. Negativkontrolle Operation an Tag 0 ohne Bestrahlung, B. Gruppe der mit 10 mW (5 μJ) bestrahlten Tiere, C. Gruppe der mit 25 mW (12,5 μJ) bestrahlten Tiere, D. Gruppe der mit 50 mW (25 μJ) bestrahlten Tiere. Insgesamt kein signifikanter Effekt auf die Zunahme der TF-Dicke in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Operation.

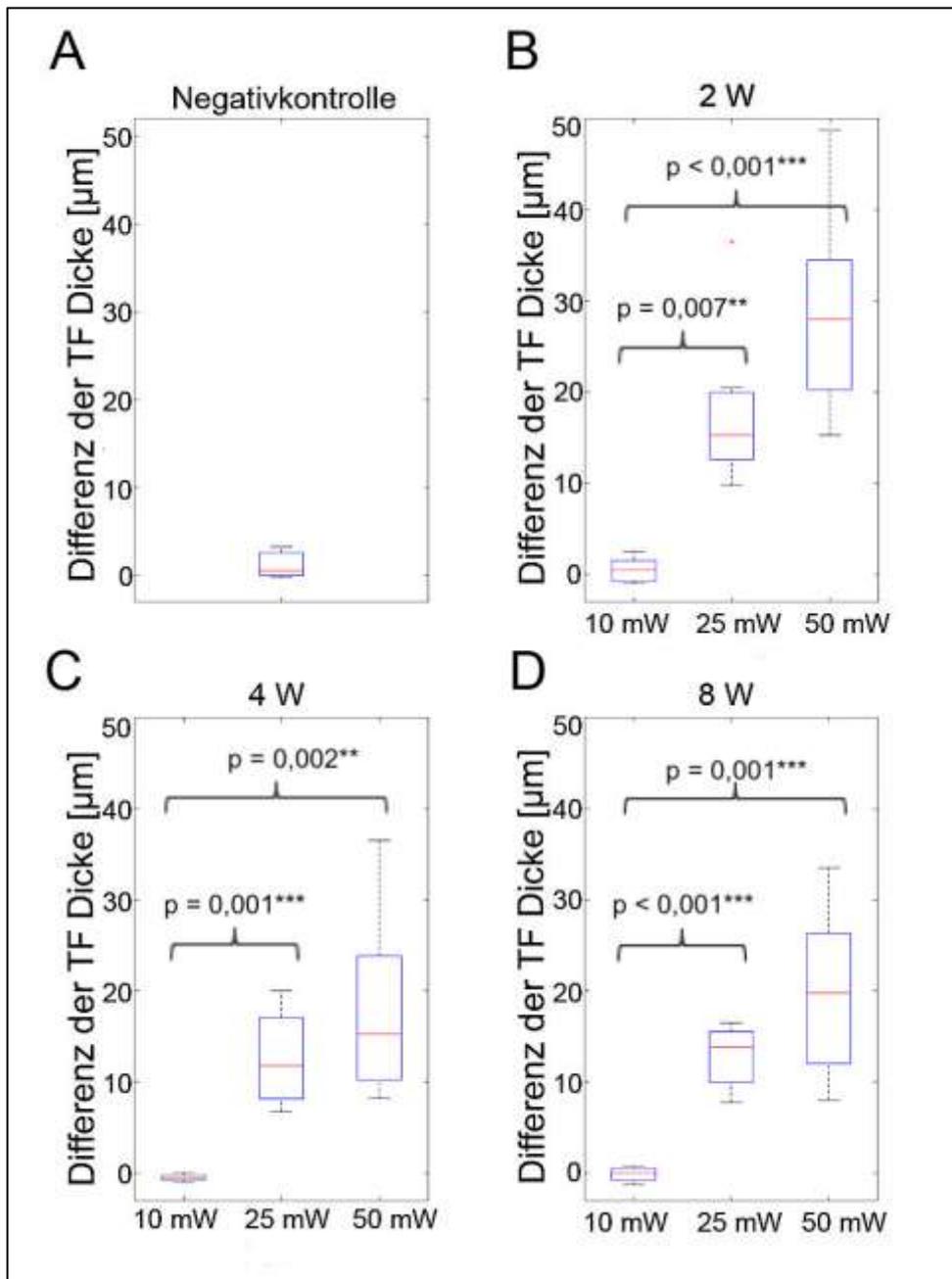


Abb. 23: Darstellung der TF-Dicke in μm (y-Achse) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität in mW (x-Achse). A. Negativkontrolle Operation an Tag 0 ohne Bestrahlung, B. Tiere welche nach 2 Wochen geopfert wurden mit signifikanter TF-Dicke-Zunahme zwischen den mit 10 mW ($5 \mu\text{J}$) zu den mit 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) bestrahlten ($p = 0,007$) und den mit 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bestrahlten Tieren ($p < 0,001$), C. Tiere welche nach 4 Wochen geopfert wurden mit signifikanter TF-Dicke-Zunahme zwischen den mit 10 mW ($5 \mu\text{J}$) zu den mit 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) bestrahlten ($p = 0,001$) und den mit 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bestrahlten Tieren ($p = 0,001$), D. Tiere welche nach 8 Wochen geopfert wurden mit signifikanter TF-Dicke-Zunahme zwischen den mit 10 mW ($5 \mu\text{J}$) zu den mit 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) bestrahlten ($p < 0,001$) und den mit 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bestrahlten Tieren ($p = 0,001$).

4.2.2 Einfluss des Bestrahlungsfokus auf die Gewebezunahme des TFs der unterschiedlichen TF-Schnittebenen

Um eine auf das pigmentierte und bestrahlte TF-Areal begrenzte Gewebeeränderung zu beurteilen wurde die bestrahlte SE sowie ihre korrespondierende kontralaterale SE mit den kranial und kaudal gelegenen SE verglichen (Abb. 16). Hierbei wurde der Mittelwert der TF-Dicke und die zugehörigen Standardfehler jeder SE (SE1-3) in einer Graphik dargestellt (Abb. 24).

Im Vergleich zu den Negativkontrollen fiel eine Gewebezunahme des TF bei den mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Mäusen auf (Abb. 24 C+D).

Für die statistische Auswertung wurde bei fehlender Normalverteilung ein Friedman-Test, gemittelt über alle Wochen und Intensitäten, durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Gewebezunahme der bestrahlten SE2 im Vergleich zu der kaudal (SE1) und kranial (SE3) gelegenen Schnittebene ($p < 0,005$). SE1 und SE3 zeigten im Vergleich zu den Kontrollsnittebenen des nicht bestrahlten Ohres keine signifikante Zunahme der Trommelfelldicke ($p = 1,000$).

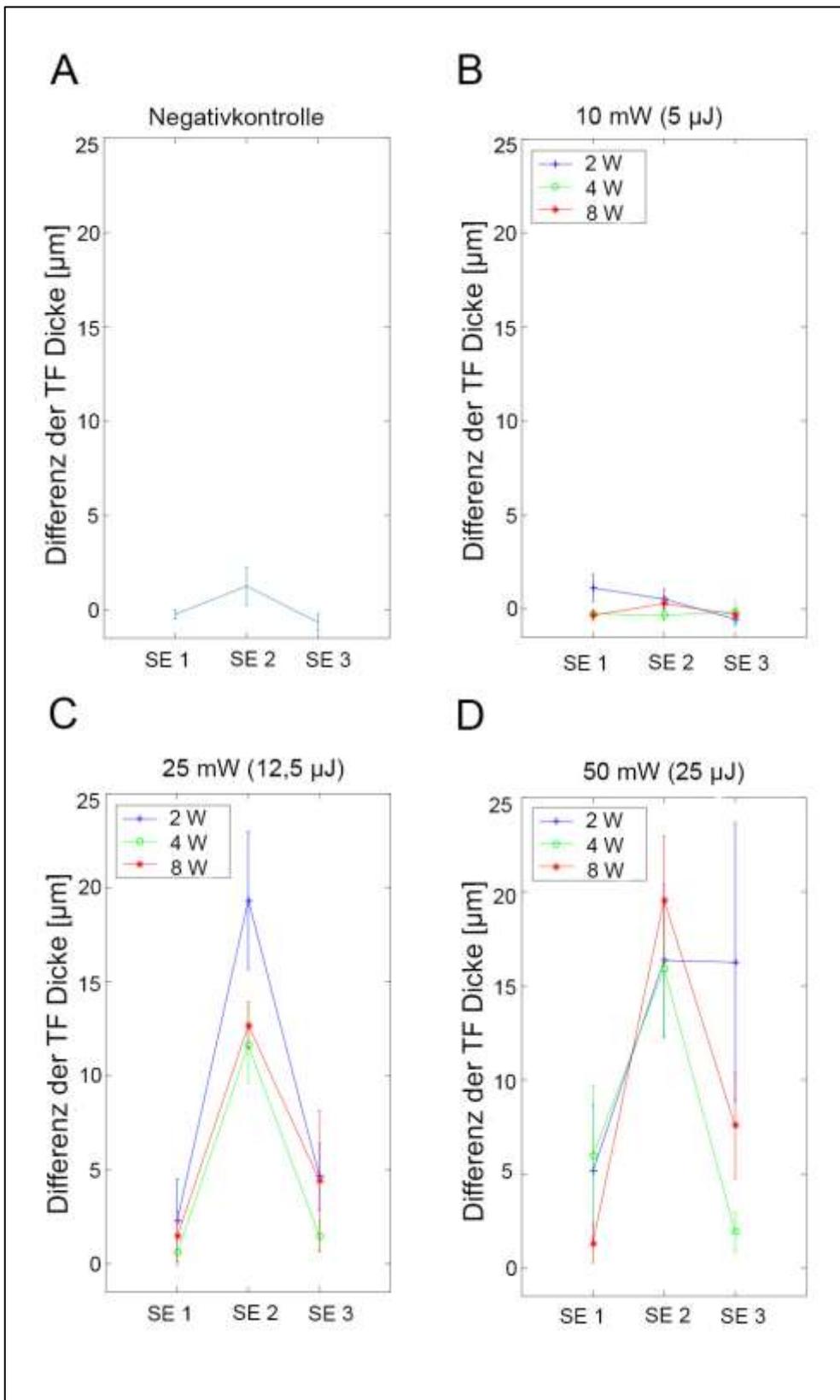


Abb. 24: Darstellung der TF-Dicke in μm (y-Achse) bezogen auf die drei Schnittebenen des bestrahlten TFs (SE1-3) (x-Achse), wobei SE2 die bestrahlten Schnittebene darstellt. Einteilung der Gruppen nach Bestrahlungsintensität sowie nach Zeitpunkt der Opferung (2 Wochen = blau, 4 Wochen = grün, 8 Wochen = rot), A. Negativkontrolle ohne Laserbestrahlung, B. Versuchsgruppe der mit 10 mW ($5 \mu\text{J}$) bestrahlten TFs, C. Versuchsgruppe der mit 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) bestrahlten TFs, D. Versuchsgruppe der mit 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bestrahlten TFs.

4.3 Polarisationsmikroskopie

Die Kollagenremodellierung, die durch Laserbestrahlung induziert wurde, kann durch Änderungen der Birefringenz in der bestrahlten Struktur quantifiziert werden [8]. Hierfür wurden die TF-Schnitte durch Polarisationsmikroskopie untersucht (s. 3. 2. 6) und ein 3000-4000 Pixel großer Bereich des TFs mit einem Polygon eingegrenzt und die Birefringenz gemessen. Die mittlere, die maximale und die minimale Leuchtkraft jedes Polygons der einzelnen Schnittebenen beider Ohren wurde somit ermittelt.

Um eine Zu- oder Abnahme der Birefringenz des bestrahlten TFs festzustellen, wurde es mit seinem kontralateralen Kontroll-TF verglichen. Für die quantitative Erfassung wurden nun, wie bei der Durchlichtmikroskopie, die Differenzen zwischen den Mittelwerten der SE des linken Ohres und den passenden Kontroll-SE ausgerechnet. Eine statistische Auswertung betraf nur die post. TF-Hälften für die nach 2, 4 und 8 Wochen geopferten Mäuse.

Erfolgreich ausgewertet wurden: In der mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten Gruppe insgesamt 18 Mäuse, in der mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlten Gruppe insgesamt 20 Mäuse und in der mit 50 mW bestrahlten Gruppe 20 Mäuse. Grund für das zusätzlich fehlende Auswerten von 2 Mäusen im Vergleich zur Durchlichtmikroskopie (s. 4.2), war eine Verschmutzung der Präparate während der histologischen Bearbeitung, welche die Beurteilung der Birefringenz der TFe der Kontrollohren nicht möglich machte.

4.3.1 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Birefringenz des TFs

Es handelte es sich in 55 Fällen ($n = 58$) bei der bestrahlten Schnittebene um die mittlere Schnittebene (SE2). Die 3 Ausnahmen wurden mit den Aufzeichnungen im Protokollbuch abgeglichen. Der bestrahlte Bereich befand sich hier entweder in der kaudalen oder kranial gelegenen Schnittebene. Im Folgenden werden die bestrahlte SE und ihre Kontroll-SE des kontralateralen Ohres verglichen (Abb. 25-27).

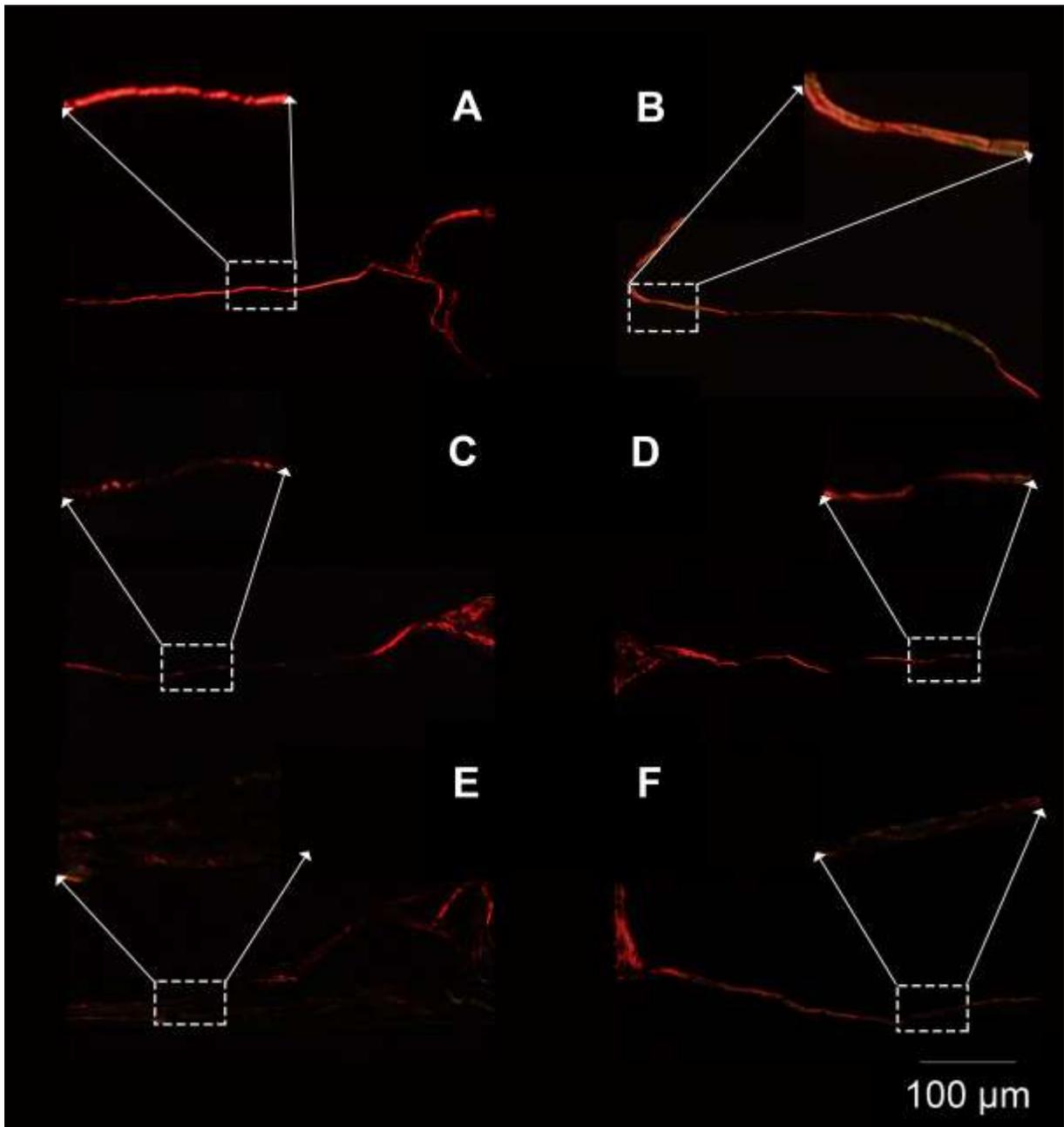


Abb. 25: Polarisationsmikroskopie zur Darstellung der TF-Birefringenz des bestrahltem TFs und des dazugehörigen Kontroll-TFs, alle Tiere wurden nach 2 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW ($5 \mu\text{J}$) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW ($12,5 \mu\text{J}$) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW ($25 \mu\text{J}$) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

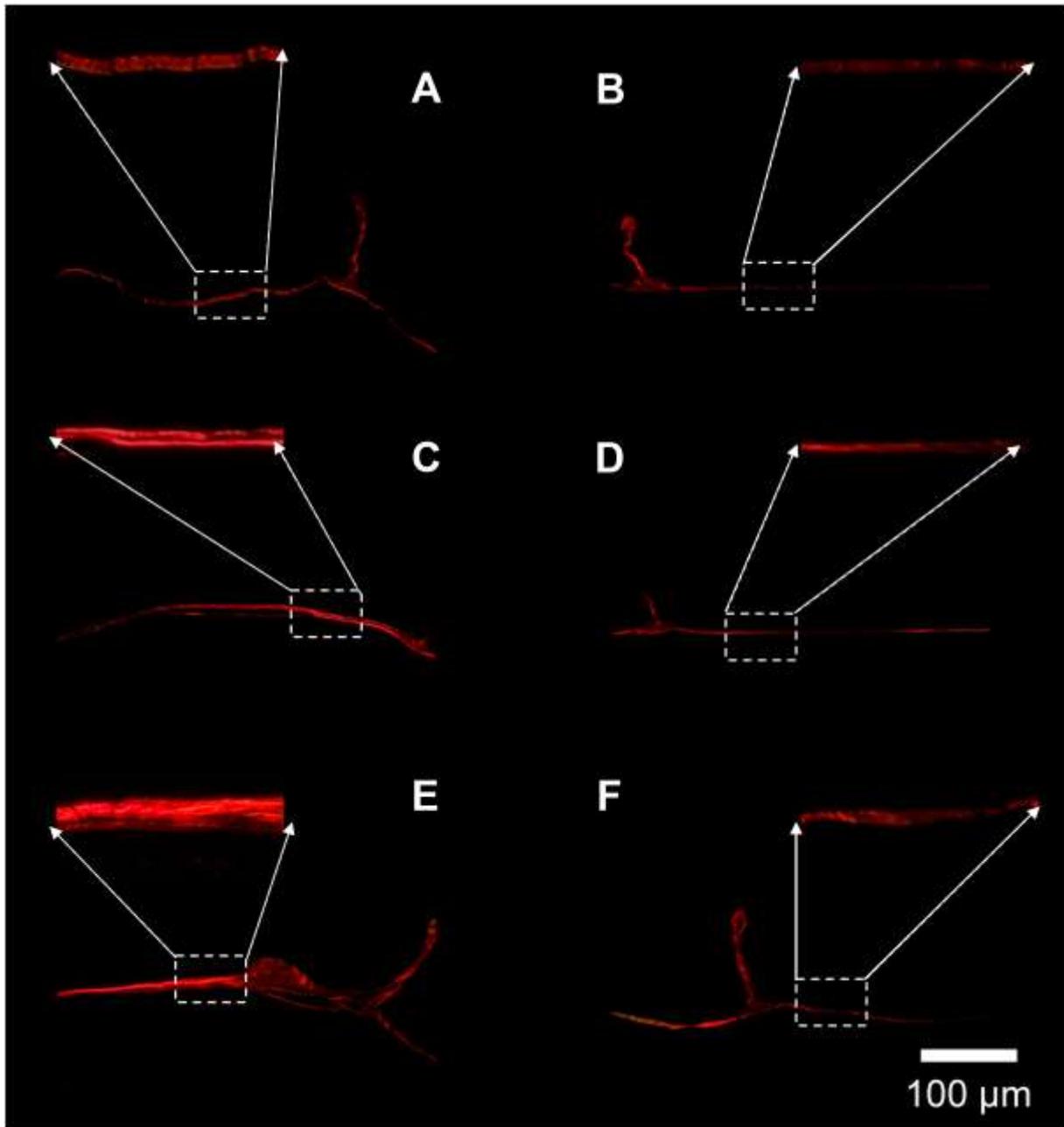


Abb. 26: Polarisationsmikroskopie zur Darstellung der TF-Birefringenz des bestrahltem TFs und des dazugehörigen Kontroll-TFs, alle Tiere wurden nach 4 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW (5 µJ) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW (25 µJ) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

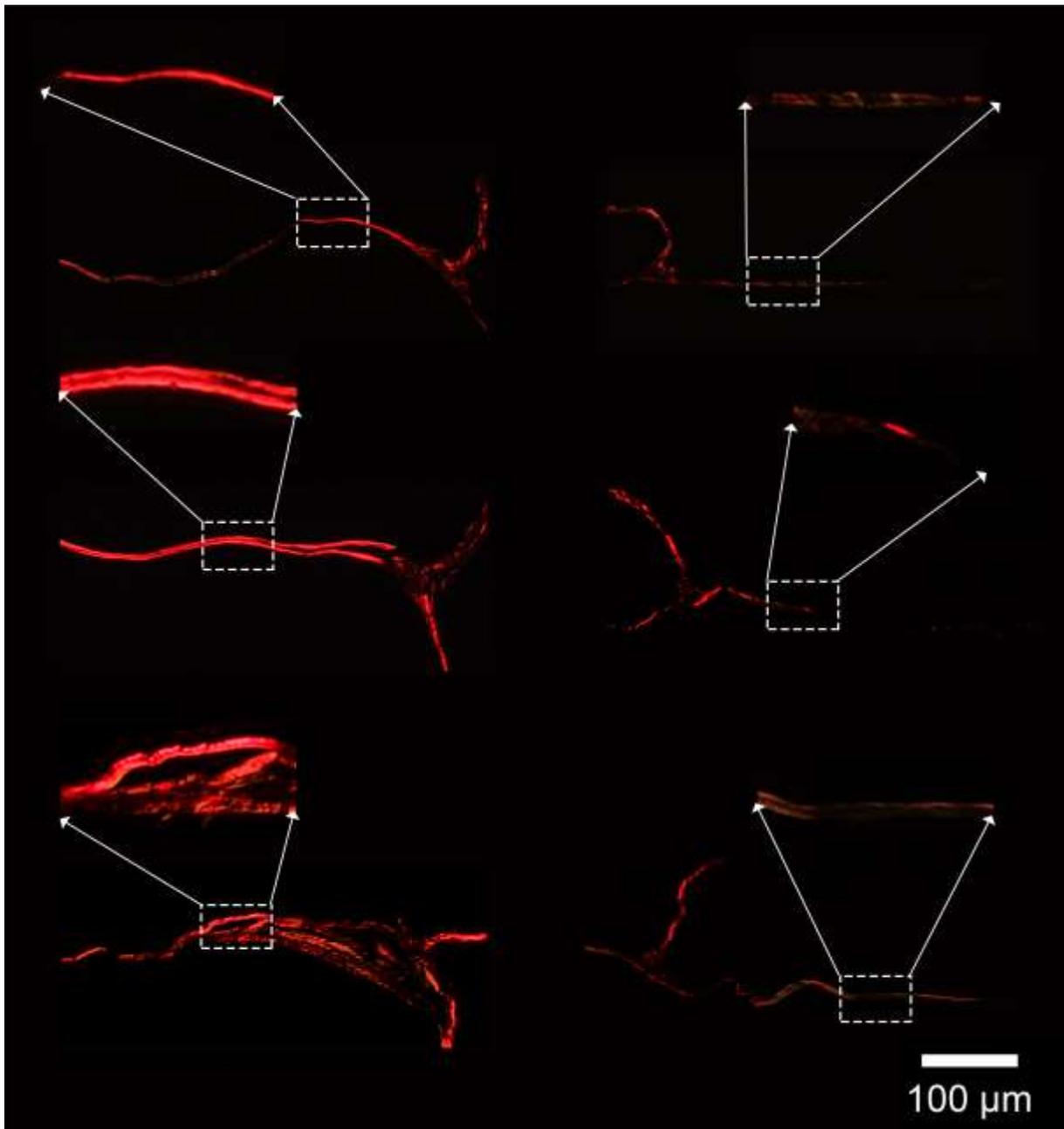


Abb. 27: Polarisationsmikroskopie zur Darstellung der TF-Birefringenz des bestrahltem TF und des dazugehörigem Kontroll-TF, alle Tiere wurden nach 8 Wochen geopfert. A. Mit 10 mW (5 μ J) bestrahltes TF, B. Kontroll-TF von A, C. Mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahltes TF, D. Kontroll-TF von C, E. Mit 50 mW (25 μ J) bestrahltes TF, F. Kontroll-TF von E.

Bei dem Vergleich der bestrahlten SE mit ihrer Kontrolle ergaben sich folgende Daten zur Zu- bzw. Abnahme der Intensität der Birefringenz (Tab. 5).

Untersuchungsgruppen	TF-Birefringenz		
	Min.	Durchschnitt	Max.
10 mW (5 μ J), 30 s Opferung Woche 2	-17,188	0,721	14,701
10 mW (5 μ J), 30 s Opferung Woche 4	0,858	13,291	28,186
10 mW (5 μ J), 30 s Opferung Woche 8	-2,882	16,912	31,899
25 mW (12,5 μ J), 30 s Opferung Woche 2	-19,318	-4,106	9,276
25 mW (12,5 μ J), 30 s Opferung Woche 4	19,318	34,792	52,792
25 mW (12,5 μ J), 30 s Opferung Woche 8	23,044	46,145	81,743
50 mW (25 μ J), 30 s Opferung Woche 2	-21,375	-5,935	15,775
50 mW (25 μ J), 30 s Opferung Woche 4	18,073	38,064	53,098
50 mW (25 μ J), 30 s Opferung Woche 8	15,971	38,648	63,811

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen eingeteilt nach Intensität der Laserbestrahlung, sowie Zeitpunkt der Opferung mit errechneter Zu- bzw. Abnahme der TF-Birefringenz nach Bestrahlung.

Die graphische Darstellung der ermittelten Birefringenz-Werte in Abhängigkeit von der Bestrahlung erfolgte über Boxplots (Abb. 28-29). Um eine bessere Übersicht über eine Verstärkung oder Abschwächung der Birefringenz zu erhalten, wurden ebenfalls 3 Negativkontrollen zum Vergleich abgebildet.

Hierbei wurde eine Zunahme der Intensität der Birefringenz des TF-Areals der bestrahlten Mäuse ab der vierten Woche festgehalten (Abb. 28). Dennoch konnten gruppenspezifische Unterschieden in der Stärke der Ausprägung beobachtet werden. Zudem fiel eine Abnahme der Intensität der Doppelbrechung in Woche 2 bei den mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Versuchstieren auf (Abb. 29 B).

Die Tiere, die mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlt wurden, zeigten nach einer Zeit von 4 und 8 Wochen eine deutliche Zunahme der Doppelbrechung des bestrahlten Trommelfellabschnitts (Abb. 28 C+D).

Alle Versuchstiere, welche nach 2 Wochen geopfert wurden, zeigten keine signifikante Zunahme der Birefringenz ($p = 0,568$) im bestrahlten TF-Abschnitt (Abb. 29 B).

Nach 4 Wochen Inkubationszeit konnte jedoch eine statistisch signifikante Zunahme der Birefringenz in den Gruppen der Tiere, die mit 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,045$) und 50 mW (25 μ J) ($p = 0,019$) bestrahlt wurden, nachgewiesen werden. Im Vergleich der beiden Gruppen miteinander konnte allerdings kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden ($p = 1,000$) (Abb. 29 C).

In den Gruppen der nach 8 Wochen geopfert Mäuse konnte eine signifikante Zunahme der Doppelbrechung zwischen den Versuchsgruppen 10 mW (5 μ J) und 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,024$) festgestellt werden. Obwohl eine Tendenz der Zunahme der Birefringenz zwischen der Gruppe 25 mW (12,5 μ J) zu 50 mW (25 μ J) beobachtet werden konnte, war diese statistisch nicht signifikant ($p = 1,000$). Zudem konnte festgehalten werden, dass trotz klarem Trend der Birefringenz-Zunahme mit steigender applizierter Laserenergie, kein signifikanter Unterschied zwischen den mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten und den mit 50 mW (25 μ J) ($p = 0,135$) bestrahlten Tieren bestand (Abb. 29 D).

Die mit 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,001$) und 50 mW (25 μ J) ($p < 0,000$) bestrahlten Versuchsgruppen zeigten nach 4 Wochen eine signifikante Zunahme der Doppelbrechung der bestrahlten Schnittebene (Abb. 28 C+D). Die nachfolgenden 4 Wochen zeigten eine Stagnation der Birefringenz für die mit 25 mW (12,5 μ J) ($p = 0,612$) und 50 mW (25 μ J) ($p = 1,000$) bestrahlten Mäuse.

Die mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten Tiere zeigten keine signifikante Zunahme der Doppelbrechung in Abhängigkeit vom Opferungszeitpunkt ($p = 0,773$) (Abb. 28 B).

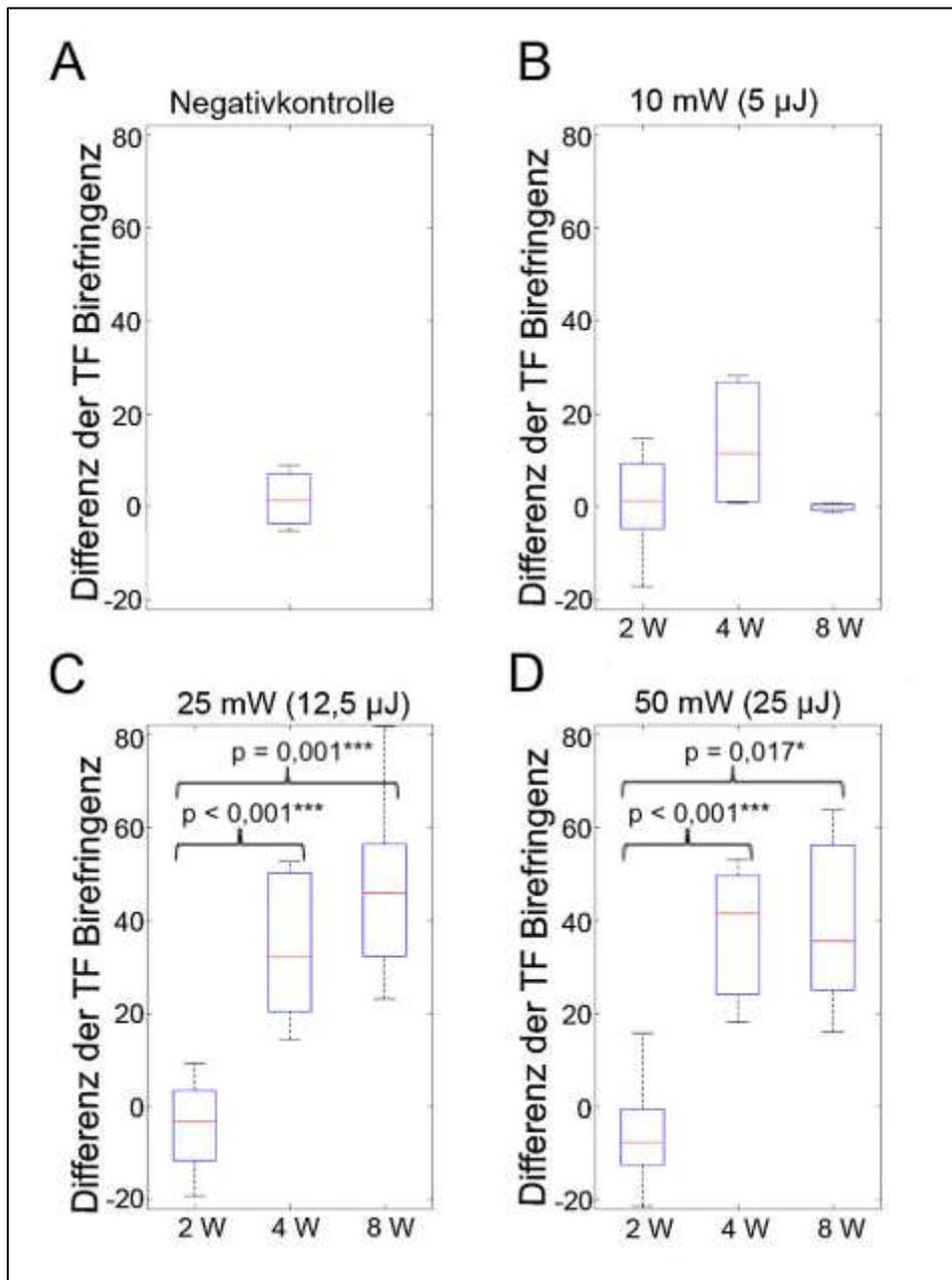


Abb. 28: Darstellung der TF-Birefringenz (y-Achse) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Operation in Wochen (x-Achse) bezogen auf die Bestrahlungsintensität der einzelnen Gruppen. A. Negativkontrolle Operation an Tag 0 ohne Bestrahlung, B. Gruppe der mit 10 mW (5 µJ) bestrahlten Tiere ohne signifikanten Effekt der TF-Birefringenz in Abhängigkeit zum Operationszeitpunkt, C. Gruppe der mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahlten Tiere mit signifikanter Zunahme der TF-Birefringenz zwischen den nach 2 Wochen geopferten Tieren und denen nach 4 ($p < 0,001$) und 8 Wochen ($p = 0,001$) geopferten Tieren, D. Gruppe der mit 50 mW (25 µJ) bestrahlten Tiere mit signifikanter Zunahme der TF-Birefringenz zwischen den nach 2 Wochen geopferten Tieren und denen nach 4 ($p < 0,001$) und 8 Wochen ($p = 0,017$) geopferten Tieren.

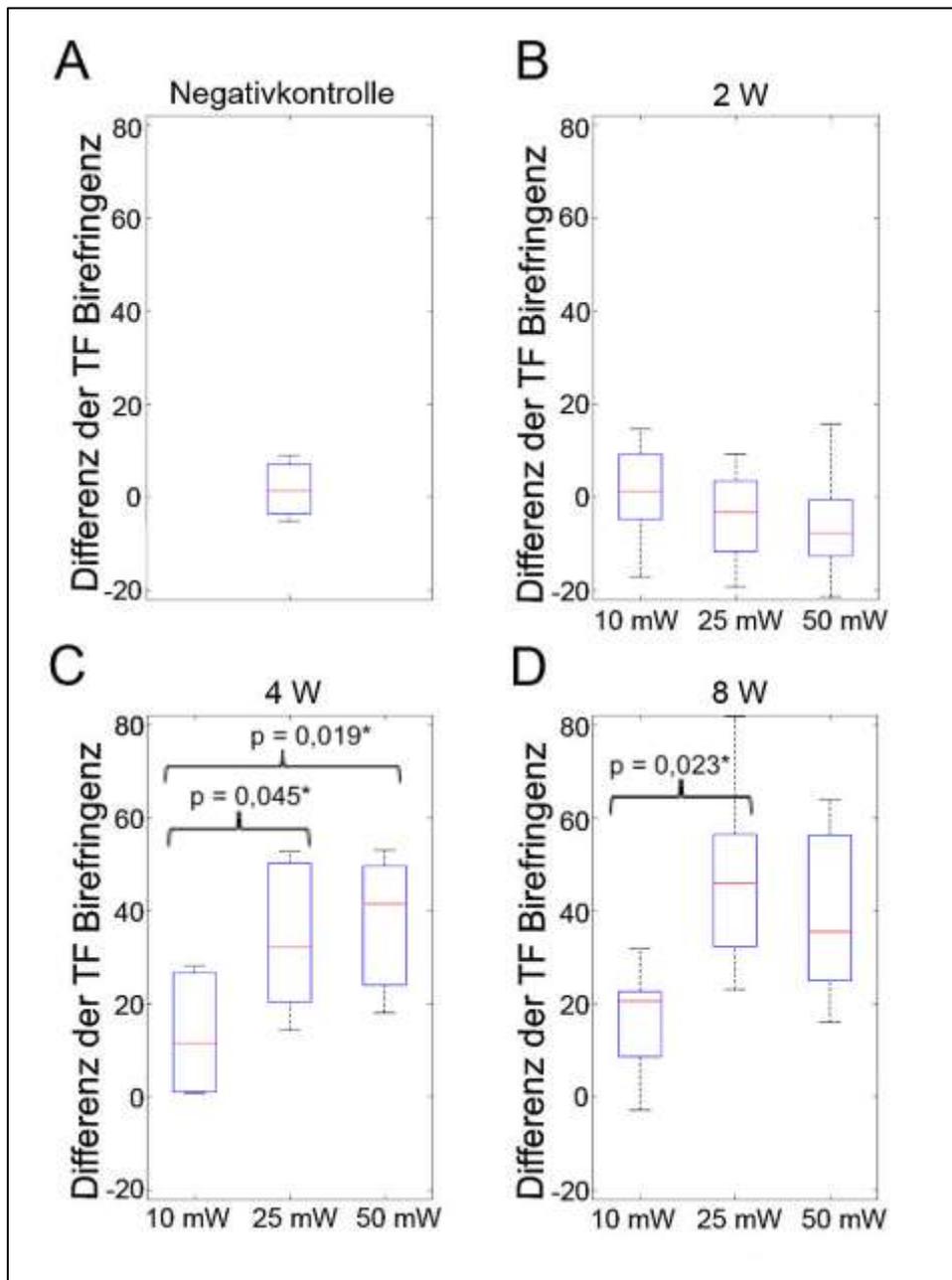


Abb. 29: Darstellung der TF-Birefringenz (y-Achse) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität in mW (x-Achse). A. Negativkontrolle Operation an Tag 0 ohne Bestrahlung, B. Tiere welche nach 2 Wochen geopfert wurden ohne signifikante Zunahme der TF-Birefringenz in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität, C. Tiere welche nach 4 Wochen geopfert wurden mit signifikanter Zunahme der TF-Birefringenz zwischen den mit 10 mW (5 μ J) zu den mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlten ($p = 0,045$) und den mit 50 mW (25 μ J) bestrahlten Tieren ($p = 0,019$), D. Tiere welche nach 8 Wochen geopfert wurden mit signifikanter TF-Dicke-Zunahme zwischen den mit 10 mW (5 μ J) zu den mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlten ($p = 0,023$) und keinem signifikanten Effekt zu den mit 50 mW (25 μ J) bestrahlten Tieren.

4.3.2 Einfluss des Bestrahlungsfokus auf die Birefringenz des TFs der unterschiedlichen TF-Schnittebenen

Um einen Unterschied bezüglich der Zunahme der Birefringenz zwischen der bestrahlten SE2 zu den kranial und kaudal gelegenen SE1 und SE3 zu verdeutlichen, wurde der Mittelwert der Birefringenz und der Standardfehler der einzelnen SE (Abb. 30) analysiert.

Hierbei fiel bei den mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten Mäusen eine Zunahme der Birefringenz der SE2 in Woche 4 und 8 auf. Die in Woche 2 gemessenen Birefringenzen waren ähnlich zu den Birefringenzen der Kontroll-TFe (unbestrahlt). Bei den 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Tieren zeigte sich eine Erhöhung der Doppelbrechung in Woche 4 und 8 in allen SE, wobei die maximale Zunahme der Birefringenz in SE2 zu finden war. In Woche 2 zeigte sich primär ein gleichblende bis abnehmende Intensität der Birefringenz.

Für die statistische Auswertung wurde bei fehlender Normalverteilung ebenfalls ein Friedman-Test, gemittelt über alle Wochen und Intensitäten, angewendet. Im Vergleich der bestrahlten Schnittebene (SE2) mit der kaudal (SE1) und kranial (SE3) gelegenen SE des TFs fiel eine signifikante Zunahme der Doppelbrechung in SE2 auf ($p < 0,005$). Die Signifikanz lag bei $p = 0,003$ im Vergleich der SE2 im bestrahlten zur SE2 des nicht bestrahlten Ohres. Ein signifikanter Unterschied lag ebenfalls zwischen SE2 des bestrahlten Ohres und SE1 des selbigen Ohres mit $p = 0,029$ und zwischen SE2 und SE3 des bestrahlten Ohres mit $p = 0,002$ vor.

SE1 und SE3 zeigten im Vergleich zu den Kontrollsnittebenen des nicht bestrahlten Ohres keine signifikante Zunahme der Birefringenz ($p = 0,831$).

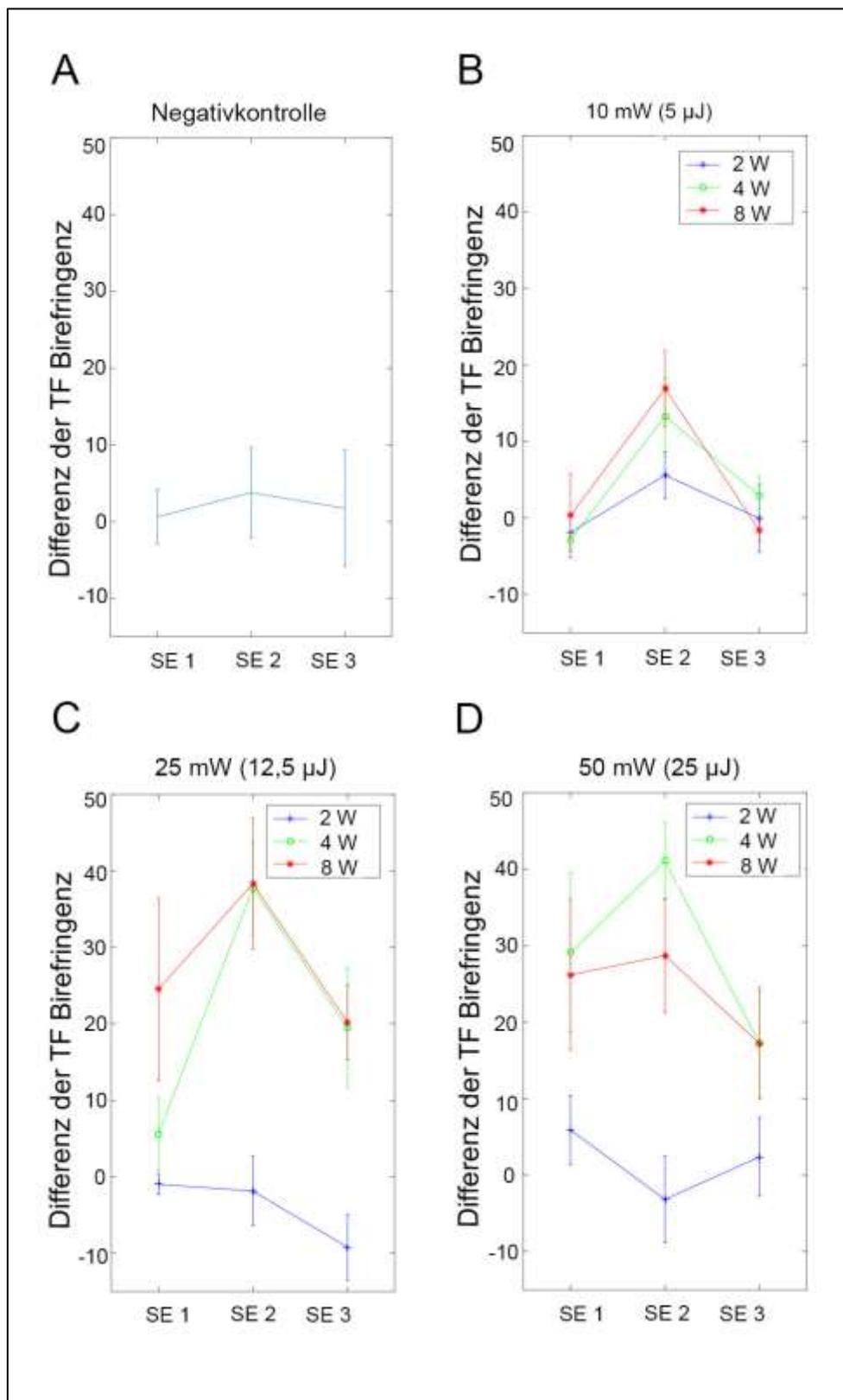


Abb. 30: Darstellung der TF-Birefringenz (y-Achse) bezogen auf die drei Schnittebenen des bestrahlten TFs (SE1-3) (x-Achse), wobei SE2 die bestrahlten Schnittebene darstellt. Einteilung der Gruppen nach Bestrahlungsintensität sowie nach Zeitpunkt der Opferung (2 Wochen = blau, 4 Wochen = grün, 8 Wochen = rot), A. Negativkontrolle ohne Laserbestrahlung, B. Versuchsgruppe der mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten TFs, C. Versuchsgruppe der mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlten TFs, D. Versuchsgruppe der mit 50 mW (25 μ J) bestrahlten TFs.

4.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Bestätigung des hypothetisierten Prozesses der Kollagenremodellierung unter Laserbestrahlung erfolgte eine qualitative Auswertung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der TF-Schnitte (SE-EM). Hierfür wurden für die Gruppe der mit 10mW bestrahlten Tiere 3 Mäuse, für die Gruppe der mit 25 mW (12,5µJ) bestrahlten Tiere 3 Mäuse und für die Gruppe der mit 50 mW (25µJ) bestrahlten Tiere 4 Mäuse verwendet. Es wurden jeweils 3 SE-EM betrachtet, wobei SE-EM2 immer die bestrahlte Schnittebene darstellte. Um die histologische Dreischichtung mit den zugehörigen Strukturen korrekt zu identifizieren, wurden die erhobenen Bilder mit Bildern anderer Studien [52, 53] verglichen. Im Anschluss fand eine Gegenüberstellung der bestrahlten TF-Abschnitte mit ihren Kontroll-Abschnitten statt (Abb. 31). Primärer Fokus des Vergleiches war die *Lamina propria* mit den zwei unterschiedlich organisierten Kollagenschichten (äußerer radiärer und innerer zirkulärer Kollagenschicht). Die Auswertung erfolgte bei allen Versuchstieren 4 Wochen nach Bestrahlung. Hierbei fielen folgende gruppenspezifische Unterschiede auf:

Die Gruppe der mit 10 mW (5 µJ) bestrahlten Tiere: Die klassische Dreischichtung war in allen 3 Schnittebenen sichtbar. Die *Lamina propria* war im Vergleich zum Kontroll-TF nicht verbreitert und eine klassische Abgrenzung zwischen äußerer radiärer und innerer zirkulärer Kollagenschicht war möglich. Im bestrahlten TF-Bereich zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle dichtere querangeschnittene Kollagenfaserbündel.

Die Gruppe der mit 25 mW (12,5 µJ) bestrahlten Tiere: Eine Dreischichtung war in allen Schnittebenen zu erkennen, dennoch war das *Str. fibrosum* deutlich vergrößert. Die Veränderung betraf 2 von 3 Schnittebenen, wobei die SE-EM2 am stärksten von der Geweberemodellierung betroffen war. Zudem fiel eine Zunahme der radiär und zirkulär angeordneten Kollagenfasern auf. Eine Einteilung in äußere und innere Kollagenschicht war weiterhin möglich, wenn auch nicht so eindeutig wie bei den Kontrollohren.

Die Gruppe der mit 50 mW (25 µJ) bestrahlten Tiere: Hier fiel eine deutliche Veränderung der histologischen Strukturierung des TFs in mind. 2 von 3 Schnittebenen des bestrahlten Ohres auf. Es kam zu einer ausgeprägten Gewebeneubildung mit einer starken Verbreiterung der TF-Dicke. Hierbei zeigte sich eine verbreiterte *Lamina propria* mit einer Zunahme an aufgelockerten Kollagenfasern. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen radiärer und zirkulärer Kollagenfaserschicht war hier nicht möglich. Außerdem fand sich in 3 von 4 Fällen eine der Epidermis aufgelagerte ausgeprägte Keratose und in 2 von 4 Fällen hatte es den Anschein von Vakuolenbildung unterhalb der Epidermis in Höhe des subepidermalen Gewebes.

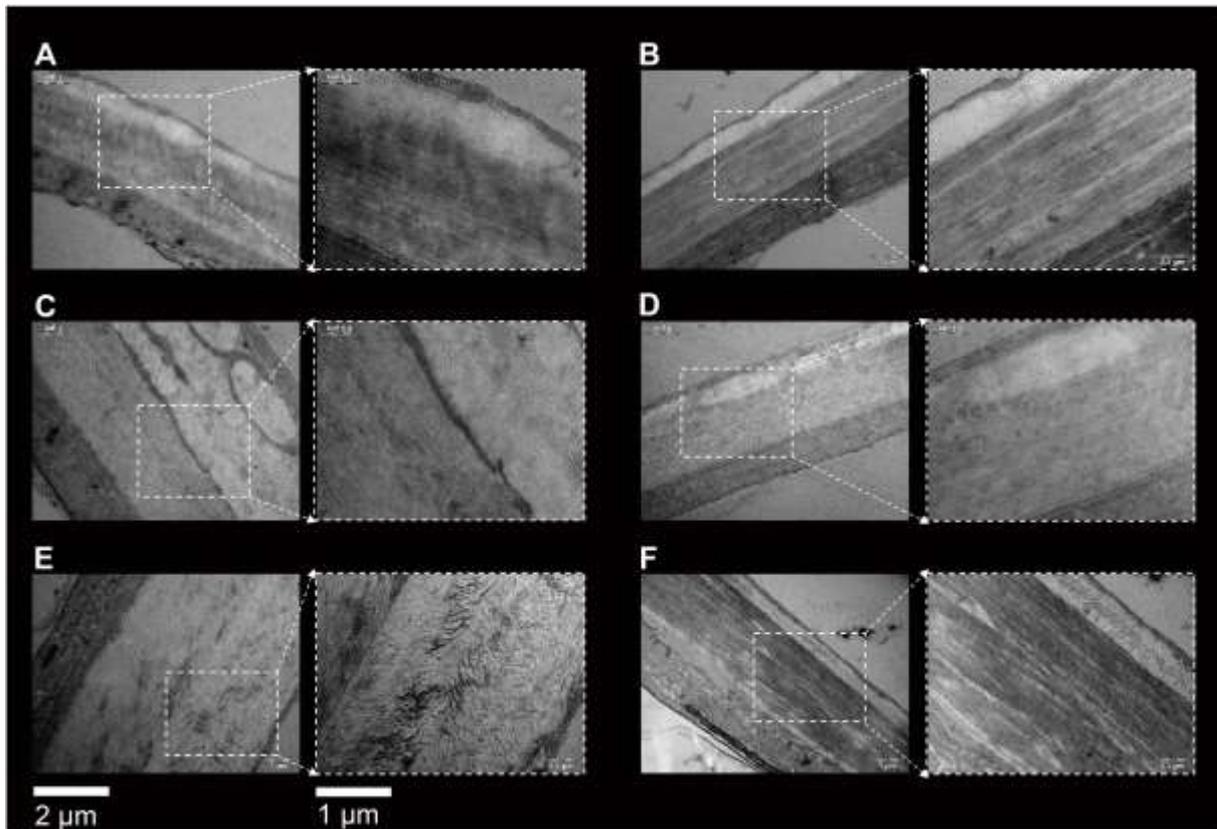


Abb. 31: Darstellung der Dreischichtung des TFs in der TEM, alle aufgeführten Tiere wurden nach 4 Wochen geopfert. A. TF welches mit 10 mW (5 μ J) bestrahlt wurde, klassische Dreischichtung zur erkennen, Gewebe allerdings etwas aufgelockert. B. Kontroll-TF von A. C. TF welches mit 25 mW (12,5 μ J) bestrahlt wurde, Dreischichtung vorhanden, allerdings deutliche Verbreiterung der Kollagenfaserschicht. D. Kontroll-TF von C. E. TF welches mit 50 MW (25 μ J) bestrahlt wurde, Dreischichtung zu vermuten, deutliche Zunahme der Kollagenfaser-schicht, zwischen einzelnen Kollagenfaserbündeln nicht mehr zu differenzieren. F. Kontroll-TF von E.

5 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war die Etablierung einer minimalinvasiven Methode der TF-Stabilisierung anhand eines Tiermodells. Um operative Eingriffe im Sinne einer Tympanoplastik und hiermit verbundene operative Komplikationen, sowie lange Krankenhausaufenthalte mit hohen Kosten im klinischen Alltag reduzieren zu können, sollte basierend auf diesen Ergebnissen, die vorklinische Phase für die Optimierung der Laserbehandlung atropher TFe erfolgen. Hierbei wurde ein vordefiniertes TF-Areal pigmentiert und mit einem Laser bestrahlt, um nur in diesem Bereich eine Kollagenneubildung bzw. -remodellierung mit dem Resultat einer lokalen TF-Stabilisierung zu induzieren.

Die Effekte der Laserbestrahlung auf die TF-Remodellierung wurden nun in Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Laserenergie sowie der vergangenen Zeit nach Bestrahlung untersucht und ausgewertet. Zudem wurde der Einfluss der Laserbestrahlung auf die Hörleistung, im Sinne einer möglichen Schädigung des Innenohres oder des Hörnervs, analysiert.

5.1 Auswirkung der Bestrahlungsintensität auf die Gewebeneubildung bzw. Kollagenremodellierung des TFs

In Abhängigkeit von der applizierten Laserenergie (10 mW (5 μ J), 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) für 30 s) sowie dem Zeitpunkt der Opferung nach Bestrahlung (2, 4 und 8 Wochen), konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Induktion einer Gewebezunahme in einem definierten TF-Bereich möglich ist. Zur genaueren Analyse dieser unspezifischen Gewebezunahme wurden die Polarisationsmikroskopie und die Elektronenmikroskopie als Untersuchungsmethoden angewendet. Diese Verfahren konnten, abhängig von der applizierten Laserenergie und dem Zeitpunkt der Opferung, eine Kollagenremodellierung bzw. -neusynthese im zuvor bestrahlten TF-Abschnitt zeigen und entsprach den Erfahrungen vorangegangener Studien an der Kornea [8], der Kniegelenkshöhle [28, 29], dem medialen Seitenband [21], dem Parodontalligament [40, 81], der Haut [81] und der Basilarmembran der Cochlea [90].

Obwohl insgesamt eine Zunahme der Kollagenremodellierung mit steigender Laserintensität bemerkt wurde, konnte interessanterweise in den Gruppen der nach 2 Wochen geopfert, mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Mäuse, vorerst eine Abnahme der Doppelbrechung des bestrahlten TF-Abschnittes festgestellt werden. Dies entsprach den Erfahrungen einiger Studien, in denen es initial durch Photokoagulation von Kollagen erst zu einer Abnahme der Gewebe-Stabilität kam [21, 29, 91]. Zudem konnte zwischen den Gruppen der mit 25 mW (12,5 μ J) und 50 mW (25 μ J) bestrahlten Tiere keine signifikante Zunahme der Birefringenz

des TFs gezeigt werden ($p = 1,000$). Daher ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der applizierten Laserenergie für die lokale Gewebestabilisierung des TF nicht sinnvoll ist.

Es ließ sich in Zusammenschau der Daten somit festhalten, dass eine Optimierung der applizierten Energie wichtig ist, in diesem Fall 25 mW (12,5 μ J). Die mit 10 mW (5 μ J) bestrahlten Tiere zeigten zwar in der Transmissionselektronenmikroskopie eine leichte Strukturänderung der kollagenen Fasern und einen Trend der Zunahme der Doppelbrechung nach 8 Wochen in der Polarisationsmikroskopie, allerdings war kein signifikanter Effekt in der Polarisations- und Durchlichtmikroskopie festzustellen. Bei den mit 50 mW (25 μ J) bestrahlten Mäusen konnte zwar eine deutliche Gewebezunahme in allen histologischen Analysen demonstriert werden, allerdings fiel eine überschießende Entzündungsreaktion und die Entstehung von „Brandblasen“ insbesondere nach 2 Wochen, auf. Die applizierte Intensität von 25 mW (12,5 μ J) zeigte sich in dieser Studie als die am ehesten geeignete applizierte Energie zur Induktion einer Kollagenneubildung und -remodellierung. Um mögliche Komplikationen im Sinne einer Entzündungsreaktion oder einer zu großflächigen Narbenbildung bzw. Schädigung des umliegenden Gewebes des Trommelfelles zu vermeiden, wäre es erstrebenswert weitere Studien durchzuführen und die applizierte Laserenergie weiter zu optimieren. Daher sollten Energien zwischen 10 mW (5 μ J) und 25 mW (12,5 μ J) in weiterführenden Untersuchungen betrachtet werden.

5.2 Zeitabhängige Entwicklung der Gewebeneubildung bzw. Kollagenremodellierung des TFs

Die zweite betrachtete Variable war der Zeitpunkt der Opferung der Tiere nach Bestrahlung. Wie bereits in zuvor durchgeführten Studien stellt die Kollagenremodellierung einen Prozess dar, welcher sich in einem Zeitraum von Wochen bis hin zu Jahren erstreckt [58, 82, 86]. Zudem zeigte sich in vorangegangenen Untersuchungen kurz nach Bestrahlung eine Entzündungsreaktion im Bereich des bestrahlten Gewebes [27]. Im Einklang hiermit zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine Entzündungsreaktion insbesondere bei 50 mW (25 μ J) nach 2 Wochen zu beobachten war. Eine Kollagenremodellierung konnte erst nach einem Zeitintervall von 4 Wochen festgestellt werden. Die folgenden 4 Wochen zeigten hingegen keine signifikante Zunahme doppelbrechender Strukturen (Kollagen) mehr. Auch diesbezüglich wären weitere Studien zur Betrachtung unterschiedlicher Opferungszeiträume zu diskutieren.

5.3 Einfluss der Laserbestrahlung auf die Hörleistung

Um einen möglichen negativen Einfluss der Laserbestrahlung auf das Innenohr auszuschließen erfolgten regelmäßig ABR-Messungen. Es konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach der Bestrahlung das Hören identisch zu den Ausgangswerten war. Zudem konnte in den ABR Messungen kurz vor Opferung der Tiere keine Verschlechterung des Hörvermögens auf dem bestrahlten Ohr im Vergleich zum kontralateralen nicht bestrahlten Ohr festgestellt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass eine genaue Aussage über das Hörvermögen der CD1 Mäuse bei hereditärer Hörstörung schwierig ist [76] und weitere Studien mit genauer Betrachtung der Hörleistung nach Laserbestrahlung, insbesondere der Langzeiteffekte, notwendig sind. Zudem wäre eine Optimierung des Versuchsaufbaus der ABR Messung mit einer genaueren seitengetrenten Hörmessung der Ohren mittels Ohrstöpseln wünschenswert.

5.4 Bestrahlung eines definierten TF-Areals zur lokalen Kollagenremodellierung

Ein weiterer wichtiger Aspekt war das Auftragen eines Pigmentes, in diesem Fall Fuchsin. Im Verlauf der Methodenetablierung fiel auf, dass ohne ein Auftragen eines solchen Pigmentes zur gezielten Absorption der Laserenergie kein histologischer Effekt beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies liegt vermutlich an der transparenten Struktur des TFs. Als Kontrolluntersuchung demonstrierte das alleinige Auftragen von Fuchsin ohne Bestrahlung histologisch keine Veränderung der TF-Struktur. Durch das Pigment war es möglich die applizierte Laserenergie, im Vergleich zu anderen Studien wie von Kurokawa und Goode [45], Ostrowski und Bojrab [60], sowie Brawner *et al.* [13], niedrig zu halten. Kurokawa und Goode [45] waren die ersten, die im Jahr 2003 eine Behandlung von atrophen Narben beim Menschen mittels Laser untersuchten. Die applizierten Laserenergien stellten sich hier allerdings als deutlich höher, mit Werten von 6,5 bis 19,5 J/cm² (2 bis 6 W), dar. Ostrowski und Bojrab [60] behandelten in ihrer Arbeit von 2003 „Minimally invasive laser contraction myringoplasty for tympanic membrane atelectasis“ Retraktionstaschen des TFs beim Menschen mit einem CO₂-Laser mit Energien von 0,1 bis 1 W um eine Kontraktion des TFs zu erreichen. Eine weitere Studie zur Behandlung des TFs von Menschen mittels Laser wurde 2008 von Brawner *et al.* [13] publiziert. In „Laser myringoplasty for tympanic membrane atelectasis“ wurde ein pulsediode potassium-titanyl-phosphate (KTP) Laser (532 nm) mit niedriger power (800 bis 1200 mW) verwendet, zudem wurde der Einsatz eines Pigmentes beschrieben. 2013 wurde eine weitere Arbeit von Ryan and Kaylie [69] zum Thema „CO₂ Laser Myringoplasty“ veröffentlicht,

die applizierte Laserenergie war hier 2 W. Im Vergleich zu den aufgeführten Studien wurden in dieser Doktorarbeit sehr niedrige Laserenergien von 10 bis 50 mW (5 bis 25 μ J) appliziert. Obwohl sich Fuchsin bezüglich seines Absorptionsspektrums als ideal darstellte, ist es aufgrund seiner Kanzerogenität [68] in Zukunft unerlässlich ein alternatives Pigment zu verwenden. Weitere Studien sind hierfür notwendig.

5.5 Bestrahlung atropher oder atelektatischer TF-Areale zur Stabilisierung des Gewebes

Auch wenn in dieser Dissertation eine gezielte, histologisch verifizierte, Kollagenremodellierung des TFs induziert werden konnte, handelte es sich dennoch um gesunde TFe von Mäusen. Eine gezielte Bestrahlung atropher oder atelektatischer TF-Areale beim Menschen ist möglich, eine anschließende histologische Aufarbeitung stellt sich jedoch als schwierig dar. Bei den Studien von Ostrowski und Bojrab [60], Brawner *et al.* [13] und Ryan und Kaylie [69], welche atrophie und atelektatisch veränderte TFe mit Laser bestrahlten, konnten eine Verkleinerung der bestrahlten atelektatischen Areale dokumentieren werden. Allerdings erfolgte hier nur eine Fotodokumentation ohne histologische Aufarbeitung. Eine mögliche Erklärung für die Verkleinerung dieser atroph-atelektatischen TF-Areale ist nun, in Anbetracht der erfolgten histologischen Analysen in dieser Doktorarbeit, die laserinduzierte Kollagenremodellierung. Diese Form der Geweberemodellierung mit Stabilisierung des Gewebes via Laserbestrahlung konnte bereits an anderen anatomischen Strukturen, z.B. dem medialen Seitenband in der Studie von Fung *et al.* [21] oder der Basilarmembran des Innenohres in der Studie von Wenzel *et al.* [91], demonstriert werden.

5.6 Fazit

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kollagenremodellierung durch Laserbestrahlung des TFs induziert werden kann. Dies wurde histologisch verifiziert und dokumentiert. Durch die Verwendung eines Pigmentes konnte die Absorption von Photonen erhöht werden und somit die applizierte Laserenergie auf einem niedrigen Wert gehalten werden. Zudem war es hierdurch möglich ein gezieltes TF-Areal zu bestrahlen und das restliche Gewebe zu schonen und in seiner Struktur nicht zu verändern. Diese Methode kann daher einen möglichen neuen Therapieansatz in der Behandlung von pathologisch veränderten TF-Arealen darstellen, wobei umliegendes gesundes Gewebe von der Lasertherapie unbeeinflusst bleibt. Diese Studie

stellt bis dato die erste Arbeit dar, welche sich mit der histologischen Analyse von TFen beschäftigt, die zuvor mit Laser gezielt bestrahlt wurden, um eine Kollagenremodellierung zu induzieren. Hinzu kommen die elektrophysiologischen Messungen, welche keine Hörschwellenverschiebung nach Laserbestrahlung feststellen konnten. Dies unterstreicht den nicht-invasiven therapeutischen Effekt auf das Hörorgan.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbas, P.J., *Electrophysiology of the auditory system*. Clinical Physics and Physiological Measurement, 1988. 9(1): p. 1.
2. Adamič, M., et al., *Vascular lasers and IPLS: guidelines for care from the European Society for Laser Dermatology (ESLD)*. Journal of cosmetic and laser therapy, 2007. 9(2): p. 113-124.
3. Adamič, M., et al., *Guidelines of care for vascular lasers and intense pulse light sources from the European Society for Laser Dermatology*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2015. 29(9): p. 1661-1678.
4. Aldinger, K.A., et al., *Genetic variation and population substructure in outbred CD-1 mice: implications for genome-wide association studies*. PloS one, 2009. 4(3).
5. Allen, J.B., *Cochlear micromechanics—a physical model of transduction*. The Journal of the Acoustical Society of America, 1980. 68(6): p. 1660-1670.
6. de Araújo, M.M., et al., *Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats*. Brazilian journal of otorhinolaryngology, 2014. 80(4): p. 330-338.
7. Arnold, W. and U. Ganzer, *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Checkliste*. 2011, Stuttgart: Thieme.
8. Asiy-Vogel, M.N., et al., *Histologic analysis of thermal effects of laser thermokeratoplasty and corneal ablation using Sirius-red polarization microscopy*. Journal of Cataract & Refractive Surgery, 1997. 23(4): p. 515-526.
9. Barnert, S., et al. *Transmissionselektronenmikroskopie*. Lexikon der Physik; Available from: .
10. von Békésy, G., *Travelling waves as frequency analysers in the cochlea*. Nature, 1970. 225: p. 1207-1209.
11. Bergmann, L., W. Raith, and C. Schaefer, *Elektromagnetismus*, in *Lehrbuch der Experimentalphysik*. 1999, Walter de Gruyter: Berlin.
12. Bernstein, E.F., M. Ferreira, and D. Anderson, *A pilot investigation to subjectively measure treatment effect and side-effect profile of non-ablative skin remodeling using a 532 nm, 2 ms pulse-duration laser*. Journal of Cutaneous Laser Therapy, 2001. 3(3): p. 137-141.
13. Brawner, J.T., J.E. Saunders, and W.E. Berryhill, *Laser myringoplasty for tympanic membrane atelectasis*. Otolaryngology—Head and Neck Surgery, 2008. 139(1): p. 47-50.
14. Carroll, L. and T.R. Humphreys, *LASER-tissue interactions*. Clin Dermatol, 2006. 24(1): p. 2-7.

15. Constantine, V. and R. Mowry, *Selective staining of human dermal collagen: II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy*. Journal of Investigative Dermatology, 1968. 50(5): p. 419-423.
16. Cui, S., C. Chesson, and R. Hope, *Genetic variation within and between strains of outbred Swiss mice*. Laboratory animals, 1993. 27(2): p. 116-123.
17. Dardenne, M.-U., et al., *Retrospective study of retinal detachment following neodymium: YAG laser posterior capsulotomy*. Journal of Cataract & Refractive Surgery, 1989. 15(6): p. 676-680.
18. Długaiczek, J., et al., *Loss of glycine receptors containing the $\alpha 3$ subunit compromises auditory nerve activity, but not outer hair cell function*. Hearing research, 2016. 337: p. 25-34.
19. Edderkaoui, B., et al., *Deficiency of duffy antigen receptor for chemokines ameliorated cochlear damage from noise exposure*. Frontiers in molecular neuroscience, 2018. 11: p. 173.
20. Ehret, G. and A.J. Moffat, *Noise masking of tone responses and critical ratios in single units of the mouse cochlear nerve and cochlear nucleus*. Hearing research, 1984. 14(1): p. 45-57.
21. Fung, D.T., et al., *Therapeutic low energy laser improves the mechanical strength of repairing medial collateral ligament*. Lasers in surgery and medicine, 2002. 31(2): p. 91-96.
22. Geneser, F., *Color Atlas of Histology*. 1989, Copenhagen: Munksgaard.
23. GmbH, L.C. *Ein vergelich zwischen Nd:YAG und Nd:YVO4*. 2016; Available from: https://www.lasercomponents.com/de/?embedded=1&file=fileadmin/user_upload/home/Datasheets/lc/applikationsreport/laserstaebe.pdf&no_cache=1.
24. Govaerts, P., W. Jacob, and J. Marquet, *Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations*. Acta oto-laryngologica, 1988. 105(3-4): p. 297-302.
25. Grehl, H. and F.-M. Reinhardt, *Checkliste Neurologie*. 5th ed. 2012, Stuttgart: Thieme.
26. Greiner, C., et al. *A method to compensate for the underestimation of collagen with polarized picosirius red imaging in human artery atherosclerotic plaques*. in *SPIE BiOS*. 2016. International Society for Optics and Photonics.
27. Hahn, Y., et al., *Histologic changes after CO2 laser myringoplasty in Gerbils*. Otolaryngology–Head and Neck Surgery, 2010. 143(2_suppl): p. P236-P236.
28. Hayashi, K., et al., *Effect of nonablative laser energy on the joint capsule: an in vivo rabbit study using a holmium: YAG laser*. Lasers in surgery and medicine, 1997. 20(2): p. 164-171.

29. Hayashi, K., et al., *The biologic response to laser thermal modification in an in vivo sheep model*. Clinical orthopaedics and related research, 2000. 373: p. 265-276.
30. Hartwein, J., H. Mensing, and G. Schaeg, *Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Kollagenfaserstruktur des menschlichen Trommelfells beim Adhäsivprozess*, in *Archiv für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde Teil II: Sitzungsbericht*, K. Fleischer and H. Rudert, Editors. 1989, Springer: Berlin, Hamburg.
31. Hecht, E., *Optik*. 5th ed. 2009, Oldenburg: Wissenschaftsverlag.
32. Hentzer, E., *Ultrastructure of the human tympanic membrane*. Acta otolaryngologica, 1969. 68(1-6): p. 376-390.
33. Hoth, S. and T. Lenarz, *Otoakustische Emissionen*. 2nd ed. 1994, Stuttgart: Thieme.
34. Huggins, R.J., et al., *Histologic and ultrastructural evaluation of sutures used for surgical fixation of the SMAS*. Aesthetic Plast Surg, 2007. 31(6): p. 719-24.
35. Junqueira, L., W. Cossermelli, and R. Brentani, *Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy*. Archivum histologicum Japonicum= Nihon soshikigaku kiroku, 1978. 41(3): p. 267-274.
36. Junqueira, L.C.U., G. Bignolas, and R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. The Histochemical journal, 1979. 11(4): p. 447-455.
37. Kalokasidis, K., et al., *The effect of Q-switched Nd: YAG 1064 nm/532 nm laser in the treatment of onychomycosis in vivo*. Dermatology research and practice, 2013. 2013.
38. Kawabata, I. and H. Ishii, *Fiber Arrangement in the Tympanic Membrane: Scanning Electron Microscope Observations*. Acta oto-laryngologica, 1971. 72(1-6): p. 243-254.
39. Kersten - Thiele, P., *Osteogene Differenzierung von humanen Naberschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärenen Zellkultur sowie auf boviner, kollagener Knochenmatrix*, in *Fachbereich Veterinärmedizin*. 2011, stus-Liebig-Universität Gießen: Gießen.
40. Kesler, G., et al., *Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER: YAG laser periodontal plastic surgery*. Journal of clinical laser medicine & surgery, 2000. 18(4): p. 203-207.
41. Kitazawa, Y., T. Taniguchi, and K. Sugiyama, *Use of apraclonidine to reduce acute intraocular pressure rise following Q-switched Nd: YAG laser iridotomy*. Ophthalmic surgery, 1989. 20(1): p. 49-52.
42. Klinke, R., *Hören und Sprechen: Kommunikation des Menschen*, in *Physiologie*, R. Klinke, et al., Editors. 2010, Thieme: Stuttgart. p. 676-691.

43. Kunstwort, D., *Lasertypen*, in *Laser Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, J. Eichler and H.J. Eichler, Editors. 2006, Springer: Berlin. p. 55.
44. Kunze, K., *Praxis der Neurologie*. 1999, Stuttgart: Thieme.
45. Kurokawa, H. and R.L. Goode, *Treatment of tympanic membrane retraction with the holmium laser*. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 1995. 112(4): p. 512-519.
46. Laboratoories, S. *Picrosirius Red Stain Kit*. Available from: .
47. Lattouf, R., et al., *Picrosirius red staining a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2014. 62(10): p. 751-758.
48. Lenarz, T. and H.-G. Boennighaus, *HNO*. 14th ed. Ohr. 2012, Berlin: Springer.
49. Leonhardt, H., *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 1990, Stuttgart: Thieme.
50. Liberman, M.C., *Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. I. Threshold shift and characteristic-frequency shift*. *Hearing research*, 1984. 16(1): p. 33-41
51. Lim, D., *Tympanic membrane: electron microscopic observation part I: pars tensa*. *Acta oto-laryngologica*, 1968. 66(1-6): p. 181-198.
52. Lim, D., *Human tympanic membrane: an ultrastructural observation*. *Acta oto-laryngologica*, 1970. 70(3): p. 176-186.
53. Lim, D., *Tympanic Membrane Part II.: Pars Flaccida*. *Acta oto-laryngologica*, 1968. 66(1-6): p. 515-532.
54. Leunert, M., *Polarisationsoptische Methodik zur Herstellung eines 3D Fasermodells des menschlichen Hirnstamms*, in *Medizinischen Fakultät*. 2014, Friedrich-Schiller-Universität Jena: Jena.
55. Lorenz, S., *Interaktion von Nanopartikeln mit immortalisierten Zelllinien und Stammzellen*, in *Fakultät der Naturwissenschaften*. 2010, Universität Ulm: Ulm.
56. Melrose, J., S. Simith, and P. Ghosh, *Histological and Immunohistological studies on cartilage*, in *Cartilage and Osteoarthritis Volume 2. Structure and in Vivo Analysis*, M. Sabatini, F. De Ceuninck, and P. Pastoureau, Editors. 2004, Humana Press: Totowa. p. 54.
57. Módis, L., *Organization of the extracellular matrix*. 1990: CRC Press.
58. Moody, B.R., J.E. McCarthy, and G.J. Hruza, *Collagen remodeling after 585 - nm pulsed dye laser irradiation: an ultrasonographic analysis*. *Dermatologic surgery*, 2003. 29(10): p. 997-1000.

59. Nowotny, M., et al., *Hearing without neuroglobin*. Neuroscience, 2017. 366: p. 138-148.
60. Ostrowski, V.B. and D.I. Bojrab, *Minimally invasive laser contraction myringoplasty for tympanic membrane atelectasis*. Otolaryngology—Head and Neck Surgery, 2003. 128(5): p. 711-718.
61. Photonics, X., *TEM00 beam profile, air cooled, Q-switched solid-state Laser Wavelengths 1064, 532 and 355nm*, in *INCA Datasheet*, X. Photonics, Editor.: Kaiserslautern.
62. Piérard, G.E., *Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers*. Matrix, 1989. 9(1): p. 68-71.
63. Poon, V.K., L. Huang, and A. Burd, *Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd: YAG 532nm laser: Collagen remodeling and pigmentation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2005. 81(1): p. 1-8.
64. Popelář, J., et al., *The absence of brain-specific link protein Bral2 in perineuronal nets hampers auditory temporal resolution and neural adaptation in mice*. Physiological research, 2017. 66(5).
65. Probst, R., G. Grevers, and H. Iro, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 3rd ed. 2008, Stuttgart: Thieme.
66. Rennie, C., et al., *Nd: YAG laser treatment for premacular subhyaloid haemorrhage*. Eye, 2001. 15(4): p. 519-524.
67. Rice, M.C. and S.J. O'Brien, *Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice*. Nature, 1980. 283(5743): p. 157-161.
68. Rubino, G.F., et al., *The carcinogenic effect of aromatic amines: an epidemiological study on the role of o-toluidine and 4, 4' -methylene bis (2-methylaniline) in inducing bladder cancer in man*. Environmental research, 1982. 27(2): p. 241-254.
69. Ryan, M. and D. Kaylie, *CO2 laser myringoplasty: a minimally invasive technique for treating tympanic membrane atelectasis*. Otology & Neurotology, 2013. 34(9): p. 1694-1698.
70. S. A. L. Schacht, P.S., M. Hinsberger, B. Hoetzer, B. Schick, G. I. Wenzel, *Laser-induzierte Stabilisierung des Trommelfells*, in *DGA 20. Jahrestagung 25.02.2017*. 2017: Aalen.
71. Schacht, S.A., et al., *Laser-induced tissue remodeling within the tympanic membrane*. Journal of biomedical optics, 2018. 23(12): p. 121614.

72. Scheper, V., *Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen zum protektiven Effekt von Glial cell line-derived neurotrophic factor, Brain-derived neurotrophic factor, Dexamethason und Elektrostimulation auf Spiralganglienzellen ertaubter Meerschweinchen*, in *Institut für Zoologie*. 2007, Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover: Hannover. p. 131.
73. Schünke, M., et al., *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2nd ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme.
74. Seiferle, E., *Gleichgewichts- und Gehörorgan, Organum vestibulocochleare*, in *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, R. Seiferle, A. Schummer, and E. Seiferle, Editors. 1992, Paul Parey: Berlin. p. 444-472.
75. Sharma, A. and J.U. Sheth, *Argon green-Nd: YAG dual laser posterior hyaloidotomy: An innovative approach toward treatment of premacular hemorrhage*. *Chronicles of Young Scientists*, 2013. 4(2): p. 170.
76. Shone, G., Y. Raphael, and J.M. Miller, *Hereditary deafness occurring in cd/1 mice*. *Hearing research*, 1991. 57(1): p. 153-156.
77. Sorensen, A., et al., *Dermoscopy for Identification of Basal Cell Carcinomas in Basal Cell Nevus Syndrome During Carbon Dioxide Laser Surgery*. *Pediatric dermatology*, 2016. 33(1): p. 109-111.
78. Stenfeldt, K., C. Johansson, and S. Hellström, *The collagen structure of the tympanic membrane: collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection*. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2006. 132(3): p. 293-298.
79. Sunita, M., *Atropic Tympanic Membrane and Hearing Assessment*. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 2012. 64(1): p. 22-24.
80. Sweat, F., H. Puchtler, and S.I. Rosenthal, *Sirius red F3BA as a stain for connective tissue*. *Archives of pathology*, 1964. 78: p. 69-72.
81. Tang, J., et al., *Fluorescence spectroscopic imaging to detect changes in collagen and elastin following laser tissue welding*. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 2000. 18(1): p. 3-8.
82. Tanzi, E.L., C.M. Williams, and T.S. Alster, *Treatment of Facial Rhytides With a Nonablative 1,450 - nm Diode Laser: A Controlled Clinical and Histologic Study*. *Dermatologic surgery*, 2003. 29(2): p. 124-128.
83. Tanzi, E.L., J.R. Lupton, and T.S. Alster, *Lasers in dermatology: four decades of progress*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2003. 49(1): p. 1-34.

84. Thee, S., *Die Entwicklung der auditorischen Hirnstammbahnen bei Kindern bis zum 2. Lebensjahr und deren Einfluss auf den späteren Spracherwerb*, in *Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin*. 2008, Charité – Universitätsmedizin Berlin.
85. Theden, F., *Etablierung eines Mausmodells zur Identifizierung Tinnitus-spezifischer Aktivierungsmuster nach Schalltrauma*, in *Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2013, Freie Universität Berlin: Berlin. p. 173.
86. Trelles, M.A., et al., *Pulsed and scanned carbon dioxide laser resurfacing 2 years after treatment: comparison by means of scanning electron microscopy*. *Plastic and reconstructive surgery*, 2003. 111(6): p. 2069-78; discussion 2079-81.
87. Vidal, B.D.C., M.L.S. Mello, and É.R. Pimentel, *Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen*. *The Histochemical Journal*, 1982. 14(6): p. 857-878.
88. Vinitha, G. and A. Ramalingam, *Nonlinear studies of Acid Fuchsin dye in liquid and solid media*. *Spectrochimica acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2008. 69(4): p. 1160-1164.
89. Welsch, U. and T. Deller, *Lehrbuch Histologie*. 3rd ed. 2010, München: Urban & Fischer.
90. Wenzel, G.I., et al., *Laser-induced collagen remodeling and deposition within the basilar membrane of the mouse cochlea*. *Journal of biomedical optics*, 2007. 12(2): p. 021007-021007-7.
91. Wenzel, G.I., et al., *Laser irradiation of the guinea pig basilar membrane*. *Lasers in surgery and medicine*, 2004. 35(3): p. 174-180.
92. Wien, U. *Prinzip der Polarisationsmikroskopie*. Available from: .
93. Yilmaz, T. and A. Yilmaz, *Long-term changes in subfoveal choroidal thickness and central macula thickness after Nd: YAG laser capsulotomy*. *International Ophthalmology*, 2016: p. 1-6.
94. Zahnert, T., *Differenzialdiagnose der Schwerhörigkeit*. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. 108(25): p. 432-43.
95. Zhou, X., et al., *Auditory brainstem responses in 10 inbred strains of mice*. *Brain research*, 2006. 1091(1): p. 16-26.
96. Zenner, H.P., *Physiologische und biochemische Grundlagen des normalen und gestörten Hörens*, in *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*, H.H. Naumann, et al., Editors. 1994, Thieme: Stuttgart. p. 81-231.
97. Zuccotti, A., et al., *Lack of brain-derived neurotrophic factor hampers inner hair cell synapse physiology, but protects against noise-induced hearing loss*. *The Journal of Neuroscience*, 2012. 32(25): p. 8545-8553.

7 Publikationen

Die vorliegende Doktorarbeit wurde bereits in Teilen als Vortrag und als publizierte Vortragskurzfassung auf Kongressen vorgestellt, sowie als vollständiges Paper publiziert:

- S. A. L. Schacht, P. Stahn, M. Hinsberger, B. Hoetzer, B. Schick, and G. I. Wenzel
Laser-induzierte Stabilisierung des Trommelfells
In: DGA 20. Jahrestagung 25.02.2017, Aalen (Vortrag)
- S. A. L. Schacht, P. Stahn, M. Hinsberger, B. Hoetzer, B. Schick, and G. I. Wenzel
Laser - Induced Stabilisation of the Tympanic Membrane
In: 2017 European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) meeting, Munich Germany 29.06.2017 (Vortrag)
- S. A. L. Schacht, P. Stahn, M. Hinsberger, B. Hoetzer, B. Schick, and G. I. Wenzel
Laser - Induced Stabilisation of the Tympanic Membrane
In: Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VIII, L. Lilge, ed., Vol. 10417 of SPIE Proceedings (Optical Society of America, 2017), paper 104170Q (Proceedings paper)
- S. A. L. Schacht, P. Stahn, M. Hinsberger, B. Hoetzer, B. Schick, and G. I. Wenzel
Laser-induced tissue remodeling within the tympanic membrane.
In: *Journal of biomedical optics*, 2018, 23. Jg., Nr. 12, S. 121614 (Publikation)

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. B. Schick danken, welcher mir das Arbeiten als Assistentärztin in dieser Klinik und die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglicht hat.

Zudem geht ein großer Dank an meine Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. Dr. G. I. Wenzel. Durch Ihre ständige Präsenz, sowie Ihre geistigen und praktischen Ratschläge habe ich mich zu jedem Zeitpunkt sehr gut betreut gefühlt. Ihre beeindruckende Arbeits- und Berufsauffassung ist mir weiterhin ein großes Vorbild.

Für die Anfertigung der Graphiken zur Bestrahlung des Trommelfells möchte ich Isaac Ayala meinen Dank aussprechen.

Im Besonderen möchte ich meiner Mutter, Marie-Luise Schacht danken, welche mich immer unterstützt hat, in Krisenzeiten für mich da war und mir beim Durchhalten Kraft gegeben hat. Ohne sie und meinen Vater wäre ich niemals dort wo ich jetzt bin.

9 Lebenslauf

„Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.“

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ABR	Auditory Brainstem Response, auditorische Hirnstamm-Potentiale
AABR	Acustically evoked Auditory Brainstem Response, Akustisch evozierte auditorische Hirnstamm- Potentiale
ant.	anterior
ANOVA	Analysis of Variance Varianzanalyse
Aqua dest.	aqua destillata, destiliertes Wasser
Art.	Articulatio (Gelenk)
BDMA	Benzyl dimethylamine
BERA	Brainstem Electric Response Audiometry, Hirnstammaudiometrie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CW	Continuous Wave
C.t.	Cavitas tympani (Paukenhöhle)
dB	Dezibel
DDSA	Dodenyl Succinic Anhydride
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
Epon	EM bed-812
et al.	et alii, und andere
FAEP	Frühe Akustisch Evozierte Potentiale
g	Gramm
GG	Gehörgang
h	hora, Stunde
H	Hörmessung
HE	Hämatoxylin-Eosin

Hz	Hertz
J	Joule
KGW	Körpergewicht
kHz	Kiloherz
Küv.	Küvette
kV	Kilovolt
l	Liter
li	links
Lat.	Latenz
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
m	milli (x 10 ⁻³)
m ²	Quadratmeter
M.	Musculus
Max.	Maximum
mg	Milligramm
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNA	Nadic Methyl Anhydride
mW	Milliwatt
n	Stichprobenumfang
N	Newton
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Nd:YVO4	Neodym-dotierter Ytterbium- Orthovanadat -Laser
p	Probability, Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
Pa	Pascal
post.	posterior
Proc.	Processus (Fortsatz)
re	Rechts

rmANOVA	repeated measure ANOVA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SE	Schnittebene
s. c.	sub cutan
sog.	sogenannt
SPL	Sound Pressure Level, Schalldruckpegel
str.	stratum (Schicht)
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TF	Trommelfell
TM	tympanic membrane
u. a.	unter anderem
V	Volt
v. a.	vor allem
vs.	versus
W	Watt
X	Variable für eine beliebige Zahl
z. B.	zum Beispiel