

Laseranwendungen an der Cochlea – Bildgebung und Stimulation

Alexander Heisterkamp^{1,2}, M. Schultz^{2,3}, N. Tinne^{2,3}, N. Kallweit^{2,3}, A. Krüger^{2,3},

Wolfgang Ertmer^{1,2}, T. Ripken^{2,3}

¹ *Institut für Quantenoptik, Leibniz Universität Hannover, 30167 Hannover,
E-Mail: heisterkamp@iqo.uni-hannover.de*

² *Exzellenzcluster Hearing for all, 30167 Hannover*

³ *Laser Zentrum Hannover e.V., 30419 Hannover*

Einleitung

Über Laserstrahlung lassen sich berührungslos und hochauflösend Gewebe charakterisieren, manipulieren oder bearbeiten. Mittels optischer Tomographie können in Modellsystemen und im Tier einzelne Haarzellen bzw. sogar die Auslenkung der Basilarmembran aufgelöst und charakterisiert werden. Im Rahmen der Optoakustik kann Laserstrahlung genutzt werden, um Schall mittels Lasern im Gewebe zu generieren. Dieses Phänomen kann einerseits wiederum zur Bildgebung und andererseits zur Stimulation der Cochlea genutzt werden. In Untersuchungen am Standort Hannover wurden neben der optischen Abbildung cochleärer Strukturen insbesondere die direkte Stimulation von Sinneszellen mit Laserstrahlung untersucht und hinsichtlich der möglichen zugrunde liegenden Mechanismen studiert. Weitere optische Verfahren erlauben über zusätzliche Mechanismen die Auslösung von Aktionspotentialen am Hörnerv.

Laser-basierte Bildgebung der Cochlea

Im Rahmen einer hochauflösenden optischen Bildgebung kommen im wesentlichen mikroskopische Verfahren zum Einsatz, die subzelluläre Strukturen aufzulösen vermögen, jedoch durch Streuung und Absorption im Gewebe auf etwa unter hundert Mikrometer Eindringtiefe begrenzt sind. Die konfokale Lasermikroskopie kann subzelluläre Auflösungen liefern, um eine entsprechend große Probe wie die gesamte Cochlea z.B. des Meerschweinchens darzustellen, muss zusätzlicher Aufwand betrieben werden, um die dominante Streuung im Gewebe und knöchernen Strukturen herabzusetzen. Fixierte Proben können daher beispielsweise mittels Spalteholz-Lösung (Methyl-Salicylat-Benzyl-Benzoat; MSBB [1]) aufgeklärt werden, wodurch deutlich höhere Eindringtiefen und somit eine Bildgebung der gesamten Struktur bei zellulärer Auflösung erfolgen kann [2].

Ähnliche 3D-Bilddaten lassen sich über optische Projektionstomographie (OPT) erstellen, die ihren Ursprung in der Beobachtung der Embryonalentwicklung hat und durch James Sharpe begründet wurde [3]. Die OPT arbeitet dabei vergleichbar mit der Computertomographie-Bildgebung, Lichtquelle und Detektor rotieren relativ zur Probe bzw. die Probe wird rotiert und die projizierten Daten werden durch mathematische Rücktransformation in 3D-Daten umgesetzt.

Diese Projektionstechnik nimmt zusammen mit den Lichtblatmikroskopie-Techniken und der optischen Kohärenztomographie (OCT) den wichtigen Bereich der mesoskaligen Objekte bzw. Probengrößen ab, der mit den Standardverfahren der Mikroskopie nicht erreichbar ist. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Bildgebungsmodalitäten und deren erreichbaren Auflösungen bei entsprechender Probengröße.

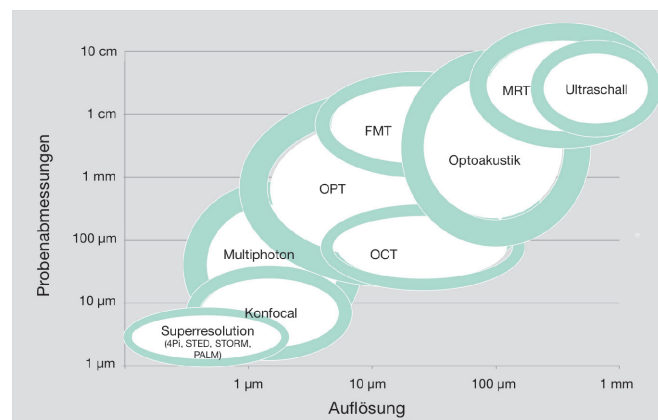


Abbildung 1: Skalen der optischen Bildgebungstechniken im Vergleich zu klinischen Verfahren (MRT, Ultraschall). Neben den hochauflösenden und sog. Superresolution-Verfahren die bei größeren Objekten (mm-cm-Bereich) versagen, bieten sich Tomographie-Verfahren wie OCT und OPT an, um bei relativ guter Auflösung noch die gesamte Probe abbilden zu können.

Am Laser Zentrum Hannover wurde diese Technik durch Integration einer scannenden Laserquelle erweitert und so in der erreichbaren Sammeleffizienz deutlich verbessert [4], [5]. Mit der sog. Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) lassen sich hochauflösend nichtangefärbte (über Streuung und Absorption) als auch fluoreszenz-markierte Proben vermessen. Abbildung 2 zeigt einen 3D Datensatz einer fixierten und aufgeklärten Meerschweinchen-Cornea, ein Dummy eines Cochlea-Implantates ist am Eingang der Cochlea zu erkennen.

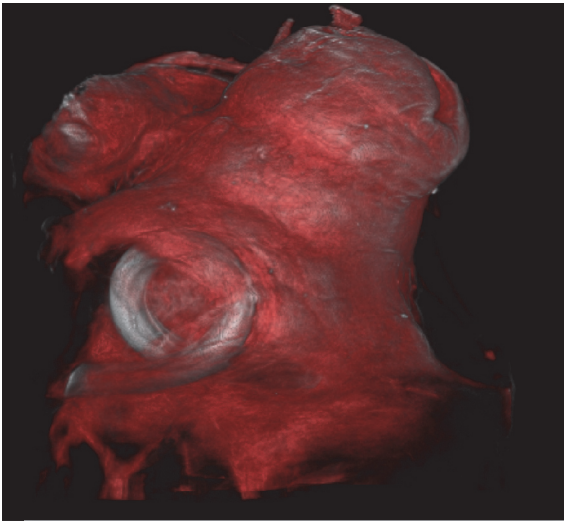


Abbildung 2: Cochlea (vom Meerschweinchen) mit Silikonimplantat, Vorbehandlung: fixiert und optisch aufgeklärt mit Methylsalicylat, Kontrastmechanismus: Autofluoreszenz (Anregung:532nm, Detektionsfilter: 624nm/40nm)

Laser-basierte Stimulation

Über fokussierte Laserstrahlung lassen sich nicht nur hochauflösend Objekte abbilden und charakterisieren sondern auch, bei entsprechend höherer Leistung, manipulieren bzw. bearbeiten. So treten beispielsweise bei der Ablation von Gewebe mittels Laserstrahlung immer begleitende akustische Phänomene auf, wie z.B. das Ausbilden einer thermoelastischen Druckwelle. Über diese erzeugte Druckwelle ließe sich bei intakten Sinneszellen eine Stimulation der Cochlea realisieren. Darüberhinaus wurde in der Gruppe von Richter und Walsh postuliert, dass eine direkte Stimulation von Nervenzellen bzw. beschädigten Sinneszellen mittels nah-infraroter Laserstrahlung möglich ist [6]. Eine Realisierung eines optischen Cochlea-Implantats erschien damit möglich.

Untersuchungen am Laser Zentrum Hannover und am Vienna sowie der Medizinischen Hochschule Hannover hatte diese direkte Stimulation von Nervenzellen zum Gegenstand und verglichen die erreichbaren Schwellen und Parameter mit der sog. optoakustischen Stimulation, die durch die Laserstrahlung erzeugte Druckwelle an intakten Sinneszellen erzeugt werden kann. Sowohl im Tiermodell [7] als auch an Zellen in Zellkultur [8] (in Patch-Clamp-Ableitung) konnten dabei nicht die publizierten Ergebnisse hinsichtlich einer direkt optischen Stimulation erreicht werden. Vielmehr sprechen die gefundenen Schwellenwerte hinsichtlich Laserpulsdauer und Bestrahlungsstärke für eine optoakustische Stimulation, die gut mit der Absorption der Laserstrahlung in Perilymphe und umliegendem Gewebe korreliert [7].

Fazit

Laser-basierte Verfahren eignen sich hervorragend für eine schädigungsarme Bildgebung von mesoskaligen Objekten wie der Cochlea, wobei auf aufwändige

Präparationstechniken wie Histologie verzichtet werden kann, jedoch chemische Aufklarungsprotokolle für eine Reduktion der Streuung in der Probe hingenommen werden müssen.

Zusätzlich können akustische Phänomene durch Laserstrahlen hervorgerufen werden, eine in der Literatur viel diskutierten direkte Nervenstimulation mittels Laser ließ sich jedoch nicht verifizieren. Neue Wege könnte in dieser Hinsicht die Einbringung von Genkonstrukten in die zu stimulierenden Zellen eröffnen, die im Rahmen der sog. Optogenetik eine direkte Stimulation und Auslösung von Aktionspotentialen in Zellen mittels Laserstrahlung erlaubt [10].

Literatur

- [1] Spalteholz, W.: Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen nebst Anhang, Leipzig, S. Hirzel (1914), 1861-1940.
- [2] Wrzeszcz, A.; Reuter, G.; Nolte, I.; Lenarz, T.; Scheper, V.: Spiral ganglion neuron quantification in the guinea pig cochlea using Confocal Laser Scanning Microscopy compared to embedding methods. *Hearing Research*, 306 (2013), 145-155.
- [3] Sharpe, J.; Ahlgren, U.; Perry, P.; Hill, B.; Hecksher-Soerensen, J.; Baldock, R.; Davidson, D.: Optical Projection Tomography as a Tool for 3D Microscopy and Gene Expression Studies. *Science*, 296 (2002), 541-545.
- [4] Eickhoff, R.; Lorbeer, R.A.; Scheiblich, H.; Heisterkamp, A.; Meyer, H.; Stern, M.; Bicker, G.: Scanning Laser Optical Tomography Resolves Structural Plasticity during Regeneration in an Insect Brain. *PLoS One*, 7 (2012), 7:e41236.
- [5] Lorbeer, R.A.; Heidrich, M.; Lorbeer, C.; Ramirez, D.; Bicker, G.; Meyer, H.; Heisterkamp, A.: Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph. *Opt. Expr.*, 6 (2011), 5419-5430.
- [6] Izzo, A.D.; Richter, C.P.; Jansen, E.D.; Walsh, J.T.: Laser stimulation of the auditory nerve. *Lasers Surg. Med.* 38 (2006), 745-753.
- [7] Schultz, M.; Baumhoff, P.; Maier, H.; Teudt, I.U.; Krüger, A.; Lenarz, T.; Kral, A.: Nanosecond laser pulse stimulation of the inner ear-a wavelength study. *Biomed. Opt. Express* 3(2012), 3332–3345.
- [8] Rettenmaier, A.; Lenarz, T.; Reuter, G.: Nanosecond laser pulse stimulation of spiral ganglion neurons and model cells. *Biom. Opt. Exp.* 5 (2014), 1014-1025.
- [9] Hernandez, V.H.; Gehrt, A.; Reuter, K.; Jing, Z.; Jeschke, M.; Mendoza Schulz, A.; Hoch, G.; Bartels, M.; Vogt, G.; Garnham, C.W.; Yawo, H.; Fukazawa, Y.; Augustine, G.J.; Bamberg, E.; Kügler, S.; Salditt, T.; de Hoz, L.; Strenzke, N.; Moser, T.: Optogenetic stimulation of the auditory pathway. *J Clin Invest.*, 124 (2014), 1114-1129.