Aus dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Die Rückenhautkammer der Maus

als neues Modell für die Trommelfellperforation

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Christoph Lachmann | geb. am 22. September 1985 in Osterburg

aus Aachen

Rostock | 2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005157

Doktorarbeit

Universitätsmedizin Rostock

Universität Rostock Traditio et Innovatio

Universitätsmedizin Rostock

ERSTGUTACHTER: UNIV.-PROF. DR. MED. BRIGITTE VOLLMAR
EINRICHTUNG: RUDOLF-ZENKER-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE CHIRURGIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: UNIV.-PROF. DR. MED. ROBERT MLYNSKI
EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HALS-NASEN-OHRENHEILKUNDE, KOPF- UND HALSCHIRURGIE „OTTO KÖRNER“, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. AGMAL SCHERZAD
EINRICHTUNG: KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HALS-NASEN-OHRENHEILKUNDE, KOPF- UND HALS-CHIRURGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM WÜRZBURG

JAHR DER EINREICHUNG: 2024

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2025

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG 1

II. ABSTRACT 3

III. EINLEITUNG 5

3.1 TROMMELFELLPERFORATION 5

3.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINISCHE BEDEUTUNG 5

3.1.2 PATHOGENESE 6

3.1.3 THERAPIE 8

3.2 BIOAKTIVE MATERIALIEN ZUR THERAPIE DER TROMMELFELLPERFORATION 10

3.3 EXPERIMENTELLE MODELLE FÜR DIE TROMMELFELLPERFORATION 14

3.4 DIE RÜCKENHAUTKAMMER DER MAUS ALS MODELL ZUR WUNDHEILUNG 17

IV. ZIELE 21

V. MATERIAL UND METHODEN 22

5.1 VERSUCHSTIERE 22

5.2 EXPERIMENTELLE GRUPPEN 22

5.3 ANÄSTHESIE 23

5.4 PRÄPARATION DER RÜCKENHAUTKAMMER 24

5.5. INTRAVITALMIKROSKOPIE UND PLANIMETRIE 25

5.5 COMPUTERGESTÜTZTE BILDANALYSE 26

5.6 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOLOGIE 27

5.7 STATISTIK 27

VI. ERGEBNISSE 28

6.1 EPITHELISIERUNG DES WUNDRANDES 29

6.2 SPONTANE DEFEKTSCHRUMPFUNG 29

6.3 INTRAVITALMIKROSKOPISCHE KAPILLARDICHTE 32

6.4 INFLAMMATION 34

VII. DISKUSSION 37

7.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN 41

7.2 LIMITATIONEN 44

7.3 SCHLUSSFOLGERUNG 46

VIII. AUSBLICK 47

IX. ZEHN THESEN ZUR DISSERTATION 48

X. LITERATURVERZEICHNIS 49

XI. LEBENSLAUF ..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

XII. DANKSAGUNG 61

XIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 62

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: DIE VORZEITIGE EPITHELISIERUNG DES DEFEKTRANDES ALS PATHOLOGIE DER PERSISTIERENDEN TROMMELFELLPERFORATION 8

ABBILDUNG 2: OPERATIVE SCHRITTE EINER TYMPANOPLASTIK TYP I 9

ABBILDUNG 3: DIE RÜCKENHAUTKAMMER DER MAUS 18

ABBILDUNG 4: HISTOLOGISCHER AUFBAU DES TROMMELFELLS UND DER RÜCKENHAUTKAMMER DER MAUS 19

ABBILDUNG 5: EXPERIMENTELLE GRUPPEN 23

ABBILDUNG 6: VERSUCHSPROTOKOLL 26

ABBILDUNG 7: VORZEITIGE EPITHELISIERUNG DER WUNDE 29

ABBILDUNG 8: REPETITIVE PLANIMETRIE DER PERFORATIONSGRÖßE. 31

ABBILDUNG 9: PLANIMETRIE 32

ABBILDUNG 10: REPETITIVE ANALYSE DER KAPILLARDICHTE 33

ABBILDUNG 11: REPRÄSENTATIVE BILDER DER INTRAVITALMIKROSKOPIE 34

ABBILDUNG 12: INTRAVITALE VISUALISIERUNG DER LEUKOZYTENMIGRATION 35

ABBILDUNG 13: REPRÄSENTATIVE IMMUNHISTOCHEMIE ZUR AUSWERTUNG VON PROLIFERATION UND INFLAMMATION 36

ABBILDUNG 14: ZUKÜNFTIGE ANWENDUNG DES MODELLS ZUR UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG BIOAKTIVER WUNDAUFLAGEN AUF EPITHELISIERTEN WUNDEN 47

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: POLYMERE FÜR DIE REGENERATION DES TROMMELFELLS DURCH TISSUE ENGINEERING 11

TABELLE 2: BIOMOLEKÜLE FÜR DIE REGENERATION DES TROMMELFELLS DURCH TISSUE ENGINEERING 12

TABELLE 3: AKTUELLE ORTHOTOPE MODELLE DER TROMMELFELLPERFORATION..... 15

I. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Trommelfellperforationen sind eine häufige Komplikation von Traumata und Infektionen. Persistierende Perforationen sind auf die besondere Anatomie des Trommelfells zurückzuführen: Die Wunde ist von der Luft des Mittelohrs und des äußeren Gehörgangs umgeben. Das unzureichende Wundbett und die unzureichende Versorgung mit Wachstumsfaktoren und Blut führen zu einer zirkulären Epithelisierung des Perforationsrandes und einer vorzeitigen Unterbrechung des Defektverschlusses. In orthotopen Tiermodellen zur Identifizierung von bioaktiven Wundauflagen zur Überwindung der vorzeitigen Epithelisierung wird das Trommelfell mechanisch oder chemisch perforiert. Bei allen orthotopen Modellen fehlt jedoch die wiederholte Visualisierung der Schnittstelle zwischen Biomaterial und Wunde. Daher wurden die jüngsten Fortschritte beim 3D-Druck von maßgeschneiderten Wundauflagen noch nicht auf die speziellen Wundverhältnisse der Trommelfellperforation übertragen. In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung der Rückenhautkammer der Maus mit einem epithelisierten, durchgreifenden Defekt als Trommelfellperforationsmodell vorgestellt.

Methoden: Mit einer Biopsiestanze wurde ein zirkulärer 2 mm großer Defekt in die gespannte Doppelhautfalte der Rückenhaut geschnitten. Die Doppelhautfalte wurde entweder ohne oder nach vorheriger Resektion einer Hautschicht perforiert. In beiden Gruppen wurde die Wunde mit einem Deckglas verschlossen oder unverschlossen gelassen (n = 4). Alle Tiere wurden auf die Epithelisierung des Randes (Histologie), die Größe der Perforation (Planimetrie), die Neovaskularisation (repetitive intravitale Fluoreszenzmikroskopie) und die Entzündung (Immunhistologie) hin untersucht.

Ergebnisse: Der Perforationsrand war in allen Präparaten von verhorntem Plattenepithel überwachsen. Die Verkleinerung der Perforation wurde durch Auflegen eines Deckglases verstärkt. Die klassische Präparation der Rückenhautkammer (mikrochirurgische Resektion einer Hautschicht vor der Perforation mit der Biopsiestanze) und die Versiegelung mit einem Deckglas ermöglichten eine wiederholte intravitale Fluoreszenzmikroskopie von hoher Qualität. Allerdings kam es häufig zur spontanen Verkleinerung der Perforation. Daher war die direkte Perforation mit der Biopsiestanze ohne mikrochirurgische Hautresektion vorteilhaft: Eine spontane Verkleinerung trat während der gesamten 20 Tage nicht auf. Die Visualisierung der Neovaskularisation war in der Intravitalmikroskopie ausreichend.

Schlussfolgerungen: Die Rückenhautkammer mit einem durchgreifenden Defekt ist eine wertvolle Ergänzung zu orthotopen Modellen der Trommelfellperforation. Die wiederholte

intravitale Mikroskopie des epithelisierten Randes ermöglicht die Untersuchung der zugrunde liegenden Pathophysiologie während des Überganges von der Inflammations- zur Proliferationsphase der Wundheilung. Unter Verwendung etablierter Analyseverfahren bietet das vorliegende Modell eine effektive Plattform für das Screening bioaktiver Materialien und die Übertragung von Fortschritten im Tissue Engineering auf die speziellen Bedingungen der Trommelfellwundheilung.

II. ABSTRACT

Background: Tympanic membrane perforations are a common complication of trauma and infection. Persisting perforations result from the unique location of the tympanic membrane. The wound is surrounded by the air of the middle ear and the external auditory canal. The inadequate wound bed, growth factor and blood supply lead to circular epithelialization of the perforation edge and premature interruption of defect closure. Orthotopic animal models use mechanical or chemical tympanic membrane laceration to identify bioactive wound dressings and overcome premature epithelialization. However, all orthotopic models essentially lack repetitive visualization of the biomaterial-wound interface. Therefore, recent progress in 3D printing of customized wound dressings has not yet been transferred to the unique wound setup of the tympanic membrane perforation. Here we present a novel application for the mice dorsal skinfold chamber with an epithelialized full - thickness defect as a tympanic membrane perforation model.

Methods: A circular 2 mm defect was cut into the extended dorsal skinfold using a biopsy punch. The skinfold was either perforated through both skin layers without prior preparation or perforated on one side following resection of the opposing skin layer. In both groups, the wound was sealed with a coverslip or left unclosed (n = 4). All animals were examined for epithelialization of the edge (histology), size of the perforation (planimetry), neovascularization (repetitive intravital fluorescence microscopy) and inflammation (immunohistology).

Results: The edge of the perforation was overgrown by cornified squamous epithelium in all preparations. Reduction in the perforation size was enhanced by application of a coverslip. Microsurgical preparation before biopsy punch perforation and sealing with a coverslip enabled repetitive high quality intravital fluorescence microscopy. However, spontaneous reduction of the perforation occurred frequently. Therefore, the direct biopsy punch perforation without microsurgical preparation was favorable: Spontaneous reduction did not occur throughout 20 days. Moreover, the visualization of the neovascularization was sufficient in intravital microscopy.

Conclusions: The dorsal skinfold chamber full-thickness defect is a valuable supplement to orthotopic tympanic membrane perforation models. Repetitive intravital microscopy of the epithelialized edge enables investigation of the underlying pathophysiology during the transition from the inflammation to the proliferation phase of wound healing. Using established analysis procedures, the present model provides an effective platform for the

screening of bioactive materials and transferring progress in tissue engineering to the special conditions of tympanic membrane wound healing.

III. EINLEITUNG

3.1 TROMMELFELLPERFORATION

Trommelfellperforationen sind eine häufige Komplikation von Traumata und Mittelohrentzündungen. Traumatische Trommelfellperforationen entstehen durch direkte (Zahnstocher, Zweige, Haarnadeln, Wattestäbchen, unsachgemäße Ohrspülungen, Schweißperlen) oder indirekte (Ohrfeige, Kopfsprung ins Wasser, Explosionstrauma) Krafteinwirkung auf das Trommelfell. Ebenso kann ein Barotrauma zu einem Einriss des Trommelfells führen. In 3 - 5 % kommt es nach dem Legen von Paukenröhrchen zu einem persistierenden Trommelfelldefekt. Die häufigste Ursache aber sind chronische und chronisch rezidivierende Infektionen des Mittelohres [9, 10, 40, 53, 88, 88, 106, 118]. Abhängig vom Fortbestehen der Perforation werden sie in akute und chronische Perforationen unterteilt. Eine chronische Trommelfellperforation liegt vor, wenn diese für mehr als drei Monate persistiert [118]. Ein persistierender, zentraler Trommelfelldefekt wird dann als chronisch mesotympanale Otitis media bezeichnet. In der Regel bleiben dabei im Gegensatz zum Cholesteatom die knöcherne Begrenzung des Trommelfells und der Anulus fibrosus intakt [67]. In der Literatur werden häufig Synonyme für die chronisch mesotympanale Otitis media verwendet: Chronische Schleimhauteiterung, chronisch eitrige Otitis media, chronisch purulente Otitis media [19].

3.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Trotz eines spontanen Verschlusses akuter Trommelfellperforation in 38 - 94 % der Fälle kommt es bei ca. 30 Millionen Menschen jährlich zu einer persistierenden Trommelfellperforation [15, 21, 37, 51, 53, 87, 92, 118]. Die weltweite Prävalenz liegt bei 4,76 %. Kinder sind mit einer Prävalenz von 22,6 % um ein Vielfaches häufiger betroffen. Nur wenige Studien zeigen eine Zunahme der Prävalenz in der Erwachsenbevölkerung [18, 82, 102]. Die WHO schätzte 2004, dass 65 bis 330 Millionen Menschen an einer persistierenden Trommelfellperforation leiden [12, 51, 82, 114, 121]. Besonders hoch ist die Prävalenz in den Bevölkerungsgruppen mit eingeschränktem Zugang zum Gesundheitssystem. In den indigenen Gruppen wie den Aborigines, pazifischen Inselbewohnern, amerikanischen Uhreinwohnern und den Inuiten liegt die Prävalenz bei über 4 %. Die Prävalenz in den Entwicklungsländern liegt bei über 2 %, während die Prävalenz in den Industriestaaten bei unter 1 % liegt [12, 82, 114]. Für Deutschland gibt es nur wenige

Studien zur Prävalenz von persistierenden Trommelfellperforationen. Kaftan et al. untersuchten 2008 die Prävalenz in Mecklenburg-Vorpommern. 1000 Personen im Alter von 18 - 93 Jahren wurden per Zufallsprinzip in die Studie eingeschlossen. Die Prävalenz der chronischen Trommelfellperforationen betrug hier 0,45 % [45].

Patienten mit persistierenden Trommelfellperforationen leiden unter einem progredienten Hörverlust. Zum einen durch die ineffektive Schallübertragung (Schallleitungsschwerhörigkeit) aufgrund der Trommelfellperforation und Arrosion der Gehörknöchelchenkette, zum anderen durch die Schädigung der Haarsinneszellen des Innenohres aufgrund rezidivierender bakterieller Infektionen (Schallempfindungsschwerhörigkeit). Dies führt zu einer kombinierten Schwerhörigkeit [7, 51, 53, 82, 119, 121]. Durch den Hörverlust sind die Patienten in ihrer Kommunikation eingeschränkt. Dieser Effekt verstärkt sich in Gruppen und in geräuschvoller Umgebung (Cocktailparty-Effekt). Die mangelhafte Kommunikationsfähigkeit kann zu sozialem Rückzug führen [22, 121]. Besonders bei Kindern, der Bevölkerungsgruppe mit der höchsten Prävalenz persistierender Trommelfellperforationen, kann die Hörminderung gravierende Langzeitfolgen haben: Sprachentwicklungsstörungen, auditive Verarbeitungs- und Wahrnehmungsstörungen, Lernstörungen sowie Störungen der psychosozialen und geistigen Entwicklung [11, 82, 121]. Schwerwiegende Komplikationen sind selten. Durch die chronische Entzündung kann es aber zu Arrosionen der knöchernen Begrenzung des Mittelohrs und des Mastoides kommen. Dies kann zu ernst zu nehmenden Komplikationen führen: Gesichtsnervenlähmung, Sinusvenenthrombose, Labyrinthitis, Meningitis und Hirnabszess [21, 121].

3.1.2 PATHOGENESE

Das Trommelfell ist eine ovale Membran mit einer Dicke von 100 µm und einer Größe von 10 x 8 mm. Als Grenze zwischen dem äußeren Gehörgang und der Paukenhöhle ist es beidseits von Luft umgeben und dient dem Schutz des Mittelohrs vor Schmutz und Krankheitserregern aus der Umgebung sowie der Transformation von Schallwellen in mechanische Bewegung [7, 51, 118]. Schallwellen treffen auf das Trommelfell und versetzen dieses in Schwingung. Die Schwingung wird über die Gehörknöchelchenkette des Mittelohres auf die Perilymphe des Innenohrs übertragen und somit die Haarsinneszellen des Cortiorgans stimuliert, welche die mechanische Energie in neuronale Impulse umwandeln [51, 51, 84, 118].

Die dynamischen Funktionen des Trommelfells werden durch seinen besonderen histologischen Aufbau gewährleistet. Die Pars tensa, der Hauptanteil, in dem die meisten Perforationen auftreten, besteht aus drei Schichten. Die Grundlage bildet das Stratum fibrosum, ein Kollagenfasernetz überwiegend aus Kollagen Typ II, Typ III und Fibroblasten. Die innere Schicht dieser Kollagenfasern verläuft zirkulär und die äußere radiär. Dies sorgt für die mechanische Stabilität und Elastizität des Trommelfelles. Der Anulus fibrocartilagineus bildet die Verbindung zum Knochen, welcher kranial eine kleine Einkerbung, die Incisura tympanica, aufweist. Hier befindet sich die kleinere Pars flaccida des Trommelfells. Im Gegensatz zur Pars tensa besitzt die Pars flaccida kein Kollagenfasernetz, sondern nur lockeres Bindegewebe als Lamina propria. Außen schließt sich schwach verhornendes Plattenepithel und innen respiratorisches Epithel an. Das schwach verhornende Plattenepithel liegt flach auf dem Fasergerüst des Trommelfells auf. Es setzt sich aus 10 Lagen flacher Keratinozyten und einer dünnen subepidermalen Lamina propria zusammen. Im Gegensatz zum verhornenden Plattenepithel der Haut fehlen die Hautanhangsgebilde wie Haare und Drüsen sowie die Dermispapillen mit ihren verzahnten Epithelkämmen. Die Mukosaschicht des respiratorischen Epithels der Trommelfellinnenseite besteht aus einer Lage flacher bis kubischer Zellen ohne deutliche Lamina propria [7, 118].

Akute Trommelfellperforationen heilen spontan innerhalb von 7 - 10 Tagen. Bei einer Verletzung des Trommelfells kommt es zum Flüssigkeitsaustritt aus dem Intra- und Extravasalraum, bestehend aus Lymphflüssigkeit und interstitielle Flüssigkeit, die sich zusammen mit den Blutbestandteilen um den Defektrand legen. Dieser Wundschorf schützt die Wunde vor Austrocknung und gewährleistet die Wundheilung. Ausgehend vom Hammerkopf und dem Anulus fibrosus des Trommelfells kommt es zu einer Immigration von Epithelzellen und Blutgefäßen in Richtung der Perforation. Das Granulationsgewebe wird sukzessive ersetzt und es verbleibt eine dünne, transparente Epithelschicht. Durch Proliferation von Fibroblasten bildet sich das Stratum fibrosum und das Trommelfell wird dicker [8, 68, 73, 118, 119].

Bei der persistierenden Trommelfellperforation sind diese Heilungsmechanismen gestört. Die pathologische Trommelfellwundheilung ist das Resultat der besonderen Lage: Die Wunde ist von beiden Seiten (Mittelohr und äußerer Gehörgang) von Luft umgeben. Hierdurch kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Wundrand und Wundfläche: in Relation ist die Wundfläche um ein Vielfaches größer als der Wundrand. Das dadurch fehlende Wundbett behindert die Zellmigration, die Perfusion und die Versorgung mit Wachstumsfaktoren [53, 109, 118, 119]. Die wesentlichen Wundheilungsphasen Inflammation und Proliferation werden abgekürzt. Daher epithelisiert der zirkuläre Rand der Perforation und unterbricht den

Defektverschluss (Abbildung 1) [7, 39, 73, 74, 95, 118, 119]. Dieser Effekt wird durch wiederkehrende und persistierende Infektionen verstärkt [114]. Es kommt zur Zerstörung der Gehörknöchelchen, welches zusammen mit der Trommelfellperforation zur Hörminderung beiträgt [121].

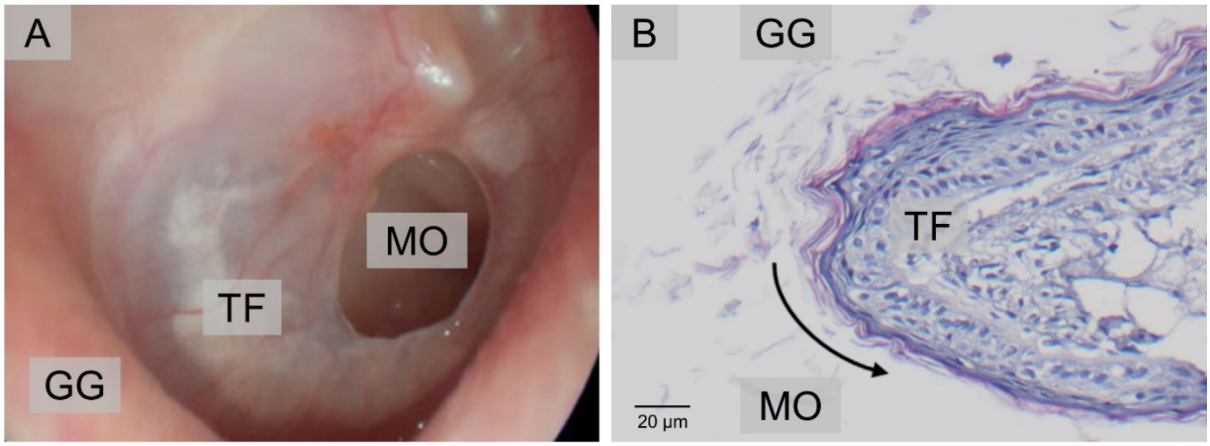

Abbildung 1: Die vorzeitige Epithelisierung des Defektrandes als Pathologie der persistierenden Trommelfellperforation. (A) Repräsentative Ohrmikroskopie einer persistierenden Trommelfellperforation in einem reizlosen Trommelfell. In der Perforation sind makroskopisch vollständig epithelisierte Defektränder zu erkennen. In der Umgebung der Perforation bestehen weder eine gesteigerte Vaskularisation noch eine gesteigerte Inflammation. (B) Histologisches Präparat (HE) einer intraoperativ entnommenen chronischen Trommelfellper-foration. Das verhornende Plattenepithel der lateralen Trommelfellfläche (äußerer Gehörgang) besitzt eine höhere Proliferation als das respiratorische / kubische Epithel auf der medialen Seite (Mittelohr). Im histologischen Präparat ist das Überwachsen (schwarzer Pfeil) des verhornenden Plattenepithels auf das mediale Blatt des Trommelfells zu erkennen. Äußerer Gehörgang (GG), Mittelohr (MO), Trommelfell (TF).

3.1.3 THERAPIE

Die Routinetherapie akuter Trommelfellperforationen umfasst ein chemisches Debridement (zum Beispiel Albothyl®) und anschließende Schienung. Hierfür kommen verschiedene inerte Materialen zur Anwendung: Silikonfolien, Gelatine, Papierschienen, Seidenfasern, Alloderm®, azelluläres Kollagen oder Eierschalenmembran [15, 17, 30, 41, 43, 73, 96, 125]. Bisherige Untersuchungen konnten jedoch keinen nachhaltigen Effekt auf den Verschluss der Perforation durch die Schienung des Trommelfells mit inerten Materialien nachweisen [30, 37, 52, 71, 73]. So war die Schienung des Trommelfells mit Silikon in 51,6 % (n = 128) erfolgreich, während in der Kontrollgruppe (n = 30) ein Spontanverschluss in 53,3 % der Fälle auftrat [37]. Persistierende Trommelfellperforationen verursachen eine chronische Mittelohrentzündung (chronisch mesotympanale Otitis media) und erfordern eine

mikrochirurgische Intervention in Vollnarkose (Tympanoplastik), um die Funktion des Trommelfells wiederherzustellen [7, 37, 51, 53, 92, 118, 119].

Emil Berthold (1837 - 1906) verschloss erstmals 1878 einen Trommelfelldefekt mit einem Vollhauttransplantat. Die moderne Mittelohrchirurgie wurde durch Moritz, Wullstein und Zöllner in den 1950er Jahren entwickelt. Wullstein prägte den Begriff Tympanoplastik - ein operatives Verfahren zur Wiederherstellung der Kontinuität der Gehörknöchelchenkette und des Trommelfells. Diese unterteilte er in fünf Typen: Tympanoplastik Typ I - V. Die alleinige Wiederherstellung der Kontinuität des Trommelfells entspricht einer Tympanoplastik Typ I. Synonym wird hierfür der Begriff Myringoplastik benutzt [7, 30, 118, 122]. Nach dem Debridement der Wundränder der Trommelfellperforation erfolgt die Abdeckung des Defektes mit einem Transplantat, welches über einen retroaurikulären, endauralen oder endomeatalen Zugang erfolgen kann. Das Transplantat wird dabei über (Overlaytechnik) oder unter (Underlaytechnik) das Trommelfell gelegt. Üblicherweise wird autologes Gewebe verwendet: Perichondrium und Knorpel (aus Concha oder Tragus), Temporalisfaszie und seltener Venen oder Fett. Es folgt der schichtweise Wundverschluss und Austamponierung des Gehörganges (Abbildung 2) [38, 51, 55, 118].

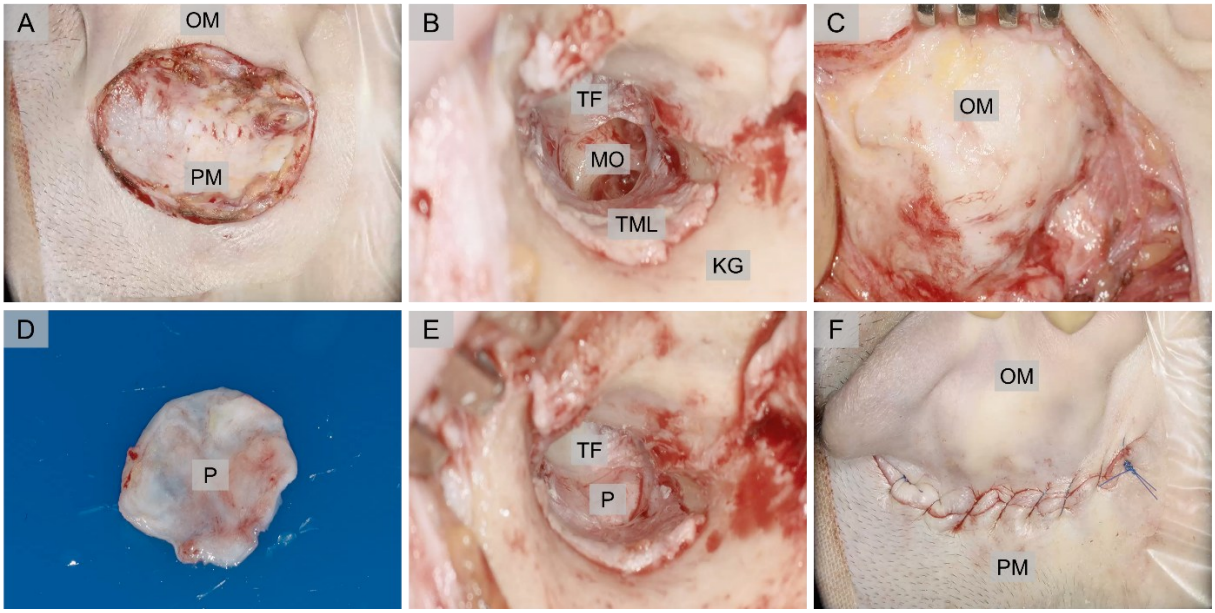

Abbildung 2: Operative Schritte einer Tympanoplastik Typ I. Bei persistierenden Trommelfellperforationen erfolgt der operative Verschluss zum Schutz vor Infektionen und zur Verbesserung des Hörvermögens. Die Abbildung zeigt ein rechtes Ohr. Nach Infiltrationsanästhesie, Mikroinspektion und Gehörgangsreinigung erfolgt die retroaurikuläre Eröffnung und das Eingehen auf das Planum mastoideum (PM) (A). Anschließend wird der Gehörgangsschlauch ausgelöst und der tympanomeatale Lappen (TML) gehoben (B). Nach Weitschleifen des knöchernen Gehörgangs (KG) kann die komplette Zirkumferenz des Trommelfells (TF) überblickt werden. Über den Defekt der Paukenabdeckung erhält man Einblick in das Mittelohr (MO) mit der Gehörknöchelchenkette. In

diesem Beispiel besteht eine subtotale Perforation des Trommelfells. Es erfolgt die retroaurikuläre Entnahme von Perichondrium (P) aus dem Cavum conchae der Ohrmuschel (OM) (C und D). Die Trommelfellperforation wird mit entnommenem Perichondrium unterfüttert und der tympanomeatale Lappen zurückgeklappt (E). Die Rekonstruktion der Paukenabdeckung wird mit Silikonfolien und Doxycyclin-getränkten Gelittaschwämmchen geschient. Anschließend erfolgt der mehrschichtige retroauriculäre Wundverschluss (F).

55.000 Tympanoplastiken werden jährlich in den Vereinigten Staaten durchgeführt [53]. Die Erfolgsquote hängt im hohen Maße von der Erfahrung des Operateurs ab. Sie variiert zwischen 43 % und 100 % [53]. Die mikrochirurgische Operation des Mittelohrs ist mit hohem personellem und zeitlichem Aufwand verbunden. Weitere Limitationen der Tympanoplastik sind die hohen Kosten für spezielle Instrumente, das Benötigen einer Allgemeinnarkose und Substanzdefekte an der Transplantatentnahmestelle. Postoperativ verbleiben die Patienten für mehrere Tage im Krankenhaus, um Komplikationen frühzeitig erkennen und behandeln zu können. Die wichtigsten Komplikationen sind postoperative Wundinfektionen mit Labyrinthitis, eine traumatische Verletzung des Sinus sigmoideus, der mittleren Schädelgrübe oder des Nervus facialis mit daraus resultierender Thrombose, Meningitis, Bewegungsstörungen der Gesichtsmuskulatur und Schmeckstörungen. Das Nahtmaterial wird nach einer Woche entfernt, die Gehörgangstamponade nach drei Wochen. Oft schließt sich eine mehrwöchige lokale Behandlung des Gehörganges an. Jeder zehnte Patient benötigt eine erneute Operation aufgrund einer persistierenden Perforation oder zur Vebresserung des audiologischen Ergebnisses. Bei einer Revisionsoperation aufgrund einer Rezidivperforation können dem Chirurgen keine geeigneten Transplantate zur Verfügung stehen, da die Menge an autologem Material begrenzt ist. Daher braucht es kostengünstige und sichere Alternativen [7, 30, 37, 51, 51, 53, 53, 92, 95, 99, 118, 119].

3.2 BIOAKTIVE MATERIALIEN ZUR THERAPIE DER TROMMELFELLPERFORATION

Moderne Wundauflagen mit spezifischer Mikroarchitektur (Porengröße, Elastizität) und Biologie (Zelladhäsion/Migration, selektive Medikamentenfreisetzung) unterstützen die Zellmigration, die Bildung von Granulationsgewebe und die Versorgung mit Wachstumsfaktoren. Jüngste Forschungsergebnisse auf dem Gebiet des Tissue Engineerings zeigen eine vielversprechende Regeneration des Trommelfells unter Verwendung von Wachstumsfaktoren, Stammzellen und Antibiotika beladenen Nanofasern (Elektrospinning), Polymilchsäuren, Chitosan und Alginatgerüsten (Tabelle 1 und 2).

Tissue Engineering umfasst drei Hauptelemente: Gerüstmaterialien, Biomoleküle und Zellen. Die Gerüstmaterialien, bestehend aus Polymeren oder dezellularisiertem Gewebe, dienen als mechanische Unterstützung für die Zellproliferation, -migration und -differenzierung und die Biomoleküle schaffen eine geeignete biochemische Mikroumgebung. Biomoleküle, die aktuell in klinischen Studien zum Trommelfellperforationsverschluss verwendet werden, sind EGF, TGF-α, TGF-β, PGF, KGF, PDGF, VEGF, autologes Serum aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut, humanes Insulin, thrombozytenreiches Plasma und Plasminogen. Als Gerüstmaterialien dienen Gelfoam®, Polylysin, Seidenfasern, Chitosan, Kalziumalginat, Hyaloronsäure, Polyglycerolsebacat, Glykosaminoglykane und Silikonmembranen. Die Effekte auf die Wundheilung am menschlichen Trommelfell wurden bisher für Gelfoam®, Polylysin, Hyaloronsäure, Silikonmembranen, EGF, PGF, PDGF, autologes Serum, Hyaloronsäure und Insulin im Rahmen einzelner klinischen Studien erforscht. Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet des Tisssue Enngineering fehlt es aber an einer nennenswerten Implementierung dieser Forschungsergebnisse in den klinischen Alltag, bedingt durch unzureichende experimentelle Modelle für die persistierende Trommelfellperforation [2, 29, 35, 36, 51, 65, 73–75, 80, 89, 95, 99, 100, 108].

Tabelle 1: Polymere für die Regeneration des Trommelfells durch Tissue Engineering (modifiziert nach Villar-Fernandez, Lopez-Escamez 2015 - Outlook for Tissue Engineering) [118].

Polymer	Modell	Hauptergebnissse
Gelfoam®	Mensch	Hämostatisches, resorbierbares Material, das zum Halten des Transplantats und als Gerüst für die Abgabe von Wachstumsfaktoren verwendet wird. Gute Biokompatibilität. Schnellerer Trommelfellverschluss.
Polylysin, polymerisiert mit Latex	Mensch	Induktion einer stärkeren Vaskularisierung des Gewebes (möglicherweise Vorhandensein vaskulärer Wachstumsfaktoren, die die Angiogenese verbessern). Gute Biokompatibilität (keine Toxizität oder allergische Reaktion). Keine signifikanten Veränderungen der Hörfunktion oder der Heilungsrate.
Seidenfasern	In vitro	Aufrechterhaltung des Wachstums der Keratinozyten, der Zelladhäsion und -integrität. Erleichterung eines kontinuierlichen Epithelwachstums unter Erhalt der Membrankontur. Kontinuierliche Bereitstellung einer hydratisierten Oberfläche.
	Tier	Transparente und trilaminare Struktur der Neomembran, ähnlich dem Trommelfell. Besser organisiertes Wachstum von Epithelzellen und Bindegewebe. Beschleunigter Trommelfellverschluss und Erholung des Gehörs.
Chitosan		
wasserlöslich	Tier	Die Heilungsrate ist mit der natürlichen Heilungsrate vergleichbar. Höhere Kollagendichte und besser organisierte Struktur als bei der natürlichen Heilung.
wasserunlöslich	Tier	Bessere Proliferation von Trommelfellzellen. Gute Biokompatibilität. Bessere Qualität der Neomembran als bei Papierauflagen.
3D Gerüst	Tier	Gute Zellproliferation. Poröse Struktur, die die Zellinfiltration erleichtert. Trilaminäre Struktur der Neomembran ähnlich des Trommelfells.

Kalziumalginat	Tier	Wachstumsförderung von Schleimhaut und verhornendem Epithel. Die Quervernetzung mit Kalzium erleichtert die Bearbeitung. Höhere Rate des Trommelfellverschlusses als bei Papierauflagen. Mögliches Risiko der Ototoxizität beim Menschen.
Hyaluronsäure	Tier	Geringere Zeit und höhere Rate des Trommelfellverschlusses. Bessere Qualität der Neomembran.
	Mensch	Die alleinige Anwendung (Epifilm®) führt nicht zu einer Verbesserung der Perforationsverschlussrate. Die Anwendung von Epidisc™ mit einem Fetttransplantat ergab eine ähnliche Verschlussrate wie bei der Myringoplastik mit Fett oder Knorpel und eine kürzere Operationszeit.
Polyglycerolsebacat	Tier	Biologisch abbaubar. Förderung der Neovaskularisierung. Gute histologische Struktur der Neomembran. Notwendigkeit die Abbaugeschwindigkeit zu beschleunigen um eine optimale Regeneration des Trommelfells zu fördern.
Hydrogele und Schwämme abgeleitet von Glykosaminoglykanen	Tier	Verstärkte Reepithelisierung. Verkürzte Zeit des Trommelfellverschlusses (Carbylan-GSX). Unterschiedliche Ergebnisse je nach Art des Hydrogels. Mögliche entzündliche Reaktion (CS-SX).
Bilaminare Atelokollagen-Silikonmembran	Mensch	Gute Biokompatibilität. Silikon bewahrt die Kollagenkonfiguration und Feuchtigkeit. Die Anwendung von bFGF verbessert die Ergebnisse des Trommelfellverschlusses (Erfolgsrate, Zeit und Wiederherstellung des Hörvermögens). Oft muss das Verfahren wiederholt werden, um einen vollständigen Verschluss der Perforation zu erreichen.

Carbylan-GSX, Carbylan-S/Gelatin-DTPH; CS-SX, cross-linked thiolated chondroitin sulfate [CS-DTPH-PEGDA (CS-SX)]; bFGF, basic fibroblast growth factor.

Tabelle 2: Biomoleküle für die Regeneration des Trommelfells durch Tissue Engineering (modifiziert nach Villar-Fernandez, Lopez-Escamez 2015 - Outlook for Tissue Engineering) [118].

Biomolekül	Eigenschaft	Modell	Hauptergebnisse
EGF	Mitogene Wirkung.	Tier	Besserer Trommelfellschluss in kürzerer Zeit. Neomembran-dicke und -histologie ähnlich dem nativen Trommelfell. Die beim Spontanverschluss erreichte Dicke beträgt weniger als die Hälfte der normalen Dicke des TF. Stimuliert Neovaskularisierung und Fibroblastenanzahl. Stimuliert Proliferation (hauptsächlich der Plattenepithelschicht). Langfristige Anwendung führt zu einer erneuten Perforation und zur Bildung von Cholesteatomen.
		Mensch	Keine Verbesserung des Trommelfellschlusses. Keine Toxizität.
TGF-α		In vitro	Wirksamer als EGF bei der Heilung von Verletzungen. Bessere Pro-Motilitäts-Aktivität als EGF.
		Tier	TGF-α wurde in normalem TF nicht beobachtet. Wurde aber nach einer Perforation exprimiert.
TGF-β	Chemotaxis-Induktion. Produktion von extrazellulärer Matrix. Angiogenese-stimulation, mögliche Kelloidbildung. Dickeres TF.	Tier	Verkürzung der Perforationsverschlusszeit. Notwendigkeit einer wiederholten Anwendung. Mögliche Bildung einer fibrösen Narbe.

PGF	Stimulation von Fibroblasten und Endothelzellen. Stimulation der Keratinozytenproliferation und -differenzierung. Stimulierung des Wachstums von Kollagenfibrillen. Förderung der Vasodilatation. Stimulierung der Proteaseproduktion.	Tier	Hyperplasie des Epithels und/oder des Bindegewebes. ErhöhteTrommelfellverschlussrate bei direkter Anwendung auf der Perforation. Bei Anwendung mit Gelfoam® Bildung einer hypertrophen Narbe, die in das Mittelohr hineinwächst (Verwendung von Gelfoam® nicht ratsam).
		Mensch	Erhöhte Trommelfellverschlussrate und verkürzte Zeit des TF-Verschlusses. Bessere Erholung des Gehörs. Mögliche Bildung von Epithelperlen. Verringerung von Mittelohrentzündungen. Hyperplasie des Granulationsgewebes, das innerhalb von 5-7 Tagen verschwindet.
KGF	Abbau reaktiver Sauerstoffe. Förderung der Reepithelisierung. Proliferation und Migration von Keratinozyten.	Tier	Verbesserte epitheliale Migration und Proliferation. Keine höhere Trommelfellverschlussrate. Besser organisierter Reparaturprozess.
PDGF	Fibroblastenmitogen.	Tier	Erhöhte Trommelfellverschlussrate. Verkürzung der Perforationsverschlusszeit. Reichhaltigere bindegewebige Faserschicht.
		Mensch	Keine erhöhte Trommelfellverschlussrate.
VEGF	Fibroblastenmitogen. Stimulation der Angiogenese. Induktion der Kollagen-bildung. Epithelisierung.	Tier	VEGF ist spezifischer und wichtiger als bFGF beim akuten Perforationsverschluss.
Autologes Serum aus peripherem Blut	Förderung der Wundheilung. Keine Antigenität. Große Menge an Wachstumsfaktoren.	Mensch	Erfordert keine Anästhesie. Verringert oder verschließt chronische Perforationen vollständig. Setzt eine kontinuierliche Versorgung mit Wachstumsfaktoren durch den eigenen Patienten voraus. Weitere Studien sind erforderlich, um festzustellen, ob die positive Wirkung auf das Serum oder auf das für den Trommelfellverschluss verwendete Gerüst zurückzuführen ist.
Serum aus menschlichem Nabelschnur-blut	Große Menge an Wachstumsfaktoren (höhere Konzentration von EGF, NGF und TGF-αβ als in autologem Serum aus peripherem Blut).	Tier	Bei Anwendung eines 3D-Kollagengerüsts werden der Verschluss der chronischen Perforation und die Hörfähigkeit bereits in frühen Stadien deutlich verbessert (im Vergleich zu Papierauflagen). Weitere Studien sind erforderlich, um festzustellen, ob die positive Wirkung auf das Serum oder auf das für den Trommelfellverschluss verwendete Gerüst zurückzuführen ist.
Hyaluronsäure	Viskoelastische Eigenschaften. Kann als Gerüst oder als in Tropfen verabreichtes Biomolekül verwendet werden. Erhöht die Motilität und die phagozytische Aktivität der Leukozyten	Tier	Verkürzte Perforationsverschlusszeit. Höhere Erfolgsrate als beim natürlichen Perforationsverschluss. Erhöhte FGF- und VEGF-Spiegel.
		Mensch	Keine erhöhte Erfolgsrate beim Trommelfellverschluss.
Humanes insulin	Neovaskularisierung. Erhöhtes Fibro-blastenwachstum. Erhöhte Keratino-zytenproliferation, -migration und -differenzierung an den Perforations-rändern. Aktivierung des Insulin-rezeptors und des IGF-1-Rezeptors. Stimulierung der Keratinmigration.	Tier	Positiver Effekt bei der Epithelisierung von Perforationen. Neovaskularisierung. Bildung von fingerartigen Fortsätzen. Fibroblasten-Aktivität. Vorhandensein von Entzündungszellen in der Lamina propria.
		Mensch	Verstärkte Mikrovaskularisierung von den Resten des Trommelfells oder des Transplantats in Richtung Perforation, mit der Induktion von Entzündung und Epithelisierung von den Perforationsrändern. Halbierung der Perforationsgröße nach der vierten oder fünften Anwendung.

Thrombo-zytenreiches Plasma	Die α-Granula der Blutplättchen enthalten Wachstumsfaktoren.	Tier	Verkürzung der durchschnittlichen Zeit des Trommelfell-verschlusses.
Plasminogen	Abbau von Fibrin und extrazellulären Matrixproteinen.	Tier	Verkürzte Zeit des Trommelfellverschlusses.

EGF, epidermic growth factor; TF, Trommelfell; TGF-α, -β, transformant growth factor type α, -β; FGF, fibroblast growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; ASET, autologous serum eardrop therapy; NGF, nerve growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor type I.

3.3 EXPERIMENTELLE MODELLE FÜR DIE TROMMELFELLPERFORATION

Zur Erforschung der pathologischen Wundheilung chronischer Wunden stehen eine Vielzahl von *in-vivo*- und *in-vitro/ex-vivo*-Wundheilungsmodellen zur Verfügung. In den letzten Jahren wurden viele neue *in-vitro/ex-vivo*-Modelle entwickelt, die sich mit der Pathogenese der Wundheilung und der Identifizierung neuer Arzneimittel und Biomarker befassen. Sie haben zum Ziel, Tierexperimente zur reduzieren und werden zur Beantwortung grundlegender Fragen der Zell-Zell-Interaktion in Abhängigkeit von verschiedenen Signalmolekülen verwendet. Vielversprechende neue Methoden sind der 3D-Druck [6, 33, 47, 70, 76] und Skin- bzw. Wound-on-a-Chip-Plattformen [1, 14, 54, 91]. *In-virtuo/in-silico*-Modelle sind in der Lage isolierte Organ- und Zellfunktionen an Computermodellen zu simulieren. Biologische Prozesse werden durch zuvor festgelegte Algorithmen abgebildet. Dabei wird aus einer Reihe von Gleichungen ein mathematisches Model erstellt, das für die zu untersuchenden biologischen Merkmale geeignet ist (Diskretisierung). Mit dieser Methode können biologische Prozesse auf verschiedenen Komplexitätsstufen simuliert werden [16, 34, 77, 85, 98, 105, 116]. Allerdings ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse aufgrund der komplexen Vorgänge bei der Wundheilung oft begrenzt. *Ex-vivo*-Modelle können zur Beantwortung spezifischer Fragestellungen dienen. [31, 113]. Sie allein können aber insbesondere die pathologischen Vorgänge der Wundheilung am Trommelfell nicht ausreichend simulieren [119].

In-vivo-Modelle sind nach wie vor der Goldstandard für die Untersuchung physiologischer und pathologischer Wundheilungsprozesse [31]. Zur Erforschung der *in-vivo*-Wundheilung der persistierenden Trommelfellperforation kommen aktuell ausschließlich orthotope Wundheilungsmodelle zum Einsatz. Als Versuchstiere dienen Maus, Chinchilla, Meerschweinchen und Hund (Tabelle 3) [4, 42, 86, 103, 104, 111, 112]. Nach der Inzision des Trommelfells werden die mit Biomulekülen beladenen Wundauflagen direkt auf den Trommelfelldefekt appliziert. Orthotope Trommelfellperforationsmodelle weisen dabei zwei wesentliche Einschränkungen auf: Die fehlende Wundvisualisierung nach der Applikation der

Wundauflage und der nicht standardisierte spontane Defektverschluss. Die Perforation des Trommelfells von Nagetieren führt zu einem regelmäßigen spontanen Verschluss innerhalb weniger Wochen [24, 44, 46, 78]. Daher werden verschiedene Methoden zur mechanischen und biochemischen Inhibition des Spontanverschlusses eingesetzt (zum Beispiel thermische Myringotomien, epithelisierte Lappen, topisches Mitomycin/Kortikoid) [2, 12, 20, 25, 53, 57, 119, 126]. Die daraus resultierende Defektgröße ist jedoch nicht standardisiert und die medikamentöse bzw. mechanische Inhibition des Spontanverschluss kann die Wundheilung beeinträchtigen. Die zweite große Einschränkung der orthotopen Modelle ist die fehlende Wundvisualisierung. Der geringe Durchmesser des äußeren Gehörgangs erschwert die Wundbeobachtung nach der Applikation der Wundauflage. Daher muss bei jeder Messung des Defekts die Wundauflage entfernt werden. Eine wiederholte intravitale Visualisierung der dynamischen Grenzfläche zwischen Wunde und Biomaterial kann daher nicht durchgeführt werden. Eine *in-vivo*-Bewertung mikrovaskulärer Parameter ist nicht möglich. Die Analyse der Immunantwort basiert auf der (Immun-) Histologie zu einem einzigen postmortalen Zeitpunkt und die meisten Wundauflagen setzten die Wirkstoffe nur einmalig frei [3, 119, 120]. Eine sequenzielle Wirkstofffreisetzung könnte effektiver sein, um die spezifische Pathologie der vorzeitigen Epithelisierung während des Übergangs von Entzündung zu Proliferation zu überwinden. Die Verlängerung der Entzündungsphase durch proinflammatorische Zytokine kann die Sekretion und die Bildung eines Wundbettes induzieren. Anschließend kann die Bildung von Granulationsgewebe und die Proliferation von Zellen durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren unterstützt werden. Weiterhin ist die Verfügbarkeit der Versuchstiere begrenzt. Es sind mikrochirurgische Eingriffe durch den engen äußeren Gehörgang und eine Unterbringung/Überwachung der Versuchstiere für 8 Wochen nach der Myringotomie notwendig. Tabelle 3 fasst die jüngsten Forschungsergebnisse zu orthotopen Modellen zusammen und verdeutlicht die Heterogenität in Bezug auf Tiere, Methoden und Spontanverschlussraten zwischen 0 % und 100 %. Diese Einschränkungen vermindern die Reproduzierbarkeit von orthotopen Modellen der Trommelfellperforation und schränken sinnvolle Studien mit komplexen Wundauflagen ein.

Tabelle 3: Aktuelle orthotope Modelle der Trommelfellperforation.

Autor	Jahr	Spontan-verschluss (%)	Inhibition Wund-verschluss	Perforations-methode	Versuchs-tiere	An-zahl (n)	Zeit-raum (w)	Methode
Dirain et al.	2018	**100**	Koagulation	Laser	Ratte	9	4	antibiotische Ohrentropfen

Emami et al.	2014	**100**	Koagulation + Lappenplastik	Thermische Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	8	6	M & M
Kaftan et al.	2012	**100**	ohne	Myringotomie	Ratte	6	4	SU5402
Shen et. al.	2013	**100**	ohne	Myringotomie	Ratte	30	4	Fibroin, Kollagen, Papier, Gelfoam ®
McFeely et al.	2000	**90**	Lappenplastik	Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	10	4	AlloDerm ®
Ramalho et al.	2006	**45**	Koagulation + Lappenplastik	Thermische Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	10	4	EGF, Pentoxifyllin
Jang et al.	2013	**43**	Lokale Medikamente + Koagulation	Thermische Myringotomie + Mitomycin + Dexamethason	Meer-schwein	10	6	3D Kollagen Gerüst
Downey et al.	2003	**35**	Koagulation + Lappenplastik	Thermische Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	17	10	AlloDerm ®
Wieland et al.	2010	**31**	Koagulation + Lappenplastik	Thermische Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	11	8	Polyglycerin-sebacat-pfropfen
Kuo et al.	2018	**25**	Ohne	Myringotomie	Chinchilla	4-6	21	Bioprint-Gelatine
Wang et al.	2017	**20**	Lokale Medikamente	Myringotomie	Ratte	40	10	M & M
Seonwoo et al.	2013	**20**	Lokale Medikamente + Koagulation	Thermische Myringotomie + Mitomycin + Dexamethason	Ratte	24	10	EGF Chitosan-Patch
Laidlaw et al.	2001	**15**	Koagulation	Thermische Myringotomie	Chinchilla	23	8	AlloDerm ®
Langston et al.	2019	**13**	Lokale Medikamente	Myringotomie + Mitomycin + Dexamethason	Maus	50	8	M & M
Seonwoo et al.	2019	**12**	Koagulation	Thermische Myringotomie	Ratte	38	8	EGF freisetzender Nanopatch
Santa Maria et al.	2011	**12**	Lokale Medikamente	Myringotomy + Metalloproteinase + Tubenobstraktion	rat	18	12	M & M
Deng et al.	2009	**11**	Lappenplastik	Myringotomie + Einkrempeln	Meerschw ein	40	8	azelluläre Dermis, Dura mater

Rahman et al.	2008	**10**	Koagulation	Laser	Ratte	10	4	Stammzellen
Spiegel et al.	2005	**0**	Lappenplastik	Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	10	8	azelluläre Submukosa vom Schwein
Parekh et al.	2009	**0**	Lappenplastik	Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	11	8	Harnblasen-matrix
Weber et al.	2009	**n.a.**	Koagulation	Thermische Myringotomie	Chinchilla	11	6	Alginat
Sundback et al.	2012	**n.a.**	Koagulation + Lappenplastik	Thermische Myringotomie + Einkrempeln	Chinchilla	11	8	Polyglycerin-sebacat-pfropfen
Aksoy et al.	2018	**n.a.**	keine	Myringotomie	Ratte	10	3	PRP-getränktes Fett

M & M, Veröffentlichung von Materialien und Methoden; EGF, epidermic growth factor; SU 5402, Multi-Targeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor; PRP, platelet rich plasma.

Mit den derzeitigen *in-vitro*- und *in-vivo*-Trommelfellmodellen können die Auswirkungen moderner Wundauflagen und Biomoleküle auf die pathologische Wundheilung der pesistierenden Trommelfellperforation nicht ausreichend dargestellt werden. Für profunde Kenntnisse über die Pathophysiologie in den spezifischen Phasen der Wundheilung persistierender Trommelfellperforationen erfordern künftige Studien eine standartisierte und repetitive Darstellung des Wundrandes, der Epithelisierung, Vaskularisation und Inflammation [119].

3.4 DIE RÜCKENHAUTKAMMER DER MAUS ALS MODELL ZUR WUNDHEILUNG

Ein etabliertes Modell für die wiederholte intravitale Untersuchung der Wundheilung und der Schnittstelle zwischen Biomaterialien und Wunde ist die Rückenhautkammer der Maus [23, 48, 58–64, 69, 80, 93, 94, 108, 110]. Die Erstbeschreibung der Implantation einer Beobachtungskammer zur Intravitalmikroskopie bei Tieren geht auf Sandison aus dem Jahr 1924 zurück und wurde in den folgenden Jahren auf die Rückenhaut der Maus übertragen [31, 66]. Die Rückenhaut wird als Doppelhautfalte auf dem Rücken der, für die Präparation narkotisierten, Maus in einem symmetrischen Titan- oder Polymerrahmen fixiert. Auf einer Seite wird die Dermis, der M. panniculus carnosis und die Subkutis in einem kreisrunden Areal entfernt, sodass ein Beobachtungsfenster für die Gegenseite bestehend aus Muskel, Haut und Unterhautgewebe für die nachfolgenden Analysen entsteht. Das freigelegte Gewebe ist mit einem Deckglas befestigt, das mit einem Sprengring im Kammerrahmen

fixiert ist [61, 79]. In Kombination mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht dieses Modell die repetitive Darstellung und quantitative Bewertung dynamischer Prozesse der Inflammation, Angiogenese, Gefäßumbau und Mikrozirkulation (Abbildung 3). Dementsprechend kommt die Rückenhautkammer der Maus vielfach zur präklinischen Erforschung im Tissue-Engineering zum Einsatz [31, 59].

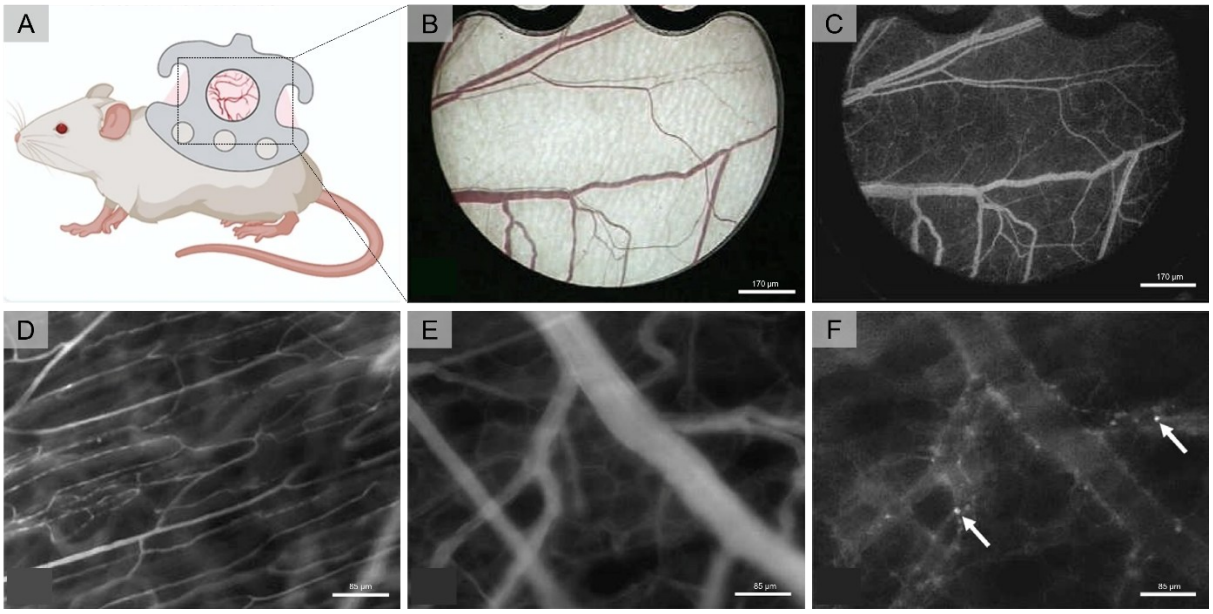

Abbildung 3: Die Rückenhautkammer der Maus (modifiziert nach Laschke MW, Vollmar, Menger MD 2011 - The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue) [61]. Das Modell der Rückenhautkamer der Maus (A) ermöglicht in Verbindung mit der Intravitalmikroskopie (B – F) die repetitivie Darstellung und quantititive Bewertung der Angiogenese und Inflammation: Beobachtungsfenster in Transillumination (B) und Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (FITC-Dextran) (C), Muskelkapillaren (D), postkapilläre Venole (E), Rhodamin-6G-gefärbte Leukozyten (Pfeil) der unter B dargestellten Venole (F).

Analog zum Trommelfell ist die Rückenhautkammer der Maus ein mit Epithel bedecktes Gewebe, das in einem Rahmen aufgespannt ist. Beide Gewebe bestehen aus zwei Epithelschichten, die durch ein vaskularisiertes Bindegewebe getrennt sind (Abbildung 4). Die Pars tensa des Trommelfells hat einen charakteristischen dreischichtigen Aufbau: Der äußeren, dem Gehörgang zugewandte Epithelschicht aus verhornenden Plattenepithel schließt sich eine Bindegewebsschicht mit radiären (Stratum radiatum) und zirkulären (Stratum circulare) Fasern an. Nach paukenwärts bildet eine Schleimhautschicht (respiratorisches Epithel) den Abschluss. Zwischen den Schichten liegt jeweils die Lamina propria [7, 51, 118]. Die Doppelhautfalte der Rückenhautkammer besteht ebenfalls aus zwei äußeren Epithelschichten aus verhornenden Plattenepithel und einer darunter liegenden Lamina propria [59, 61]. Die wichtigsten Unterschiede des Trommelfells im Vergleich zur

Doppelhautfalte sind das respiratorische Epithel, der geringere Durchmesser (100 µm vs. 600 µm) und das Fehlen einer Muskelschicht. Nach einer durchgreifenden Perforation haben jedoch beide Gewebe den Wundheilungsmechanismus der Epithelisierung durch epidermales Plattenepithel gemeinsam [7, 107, 119].

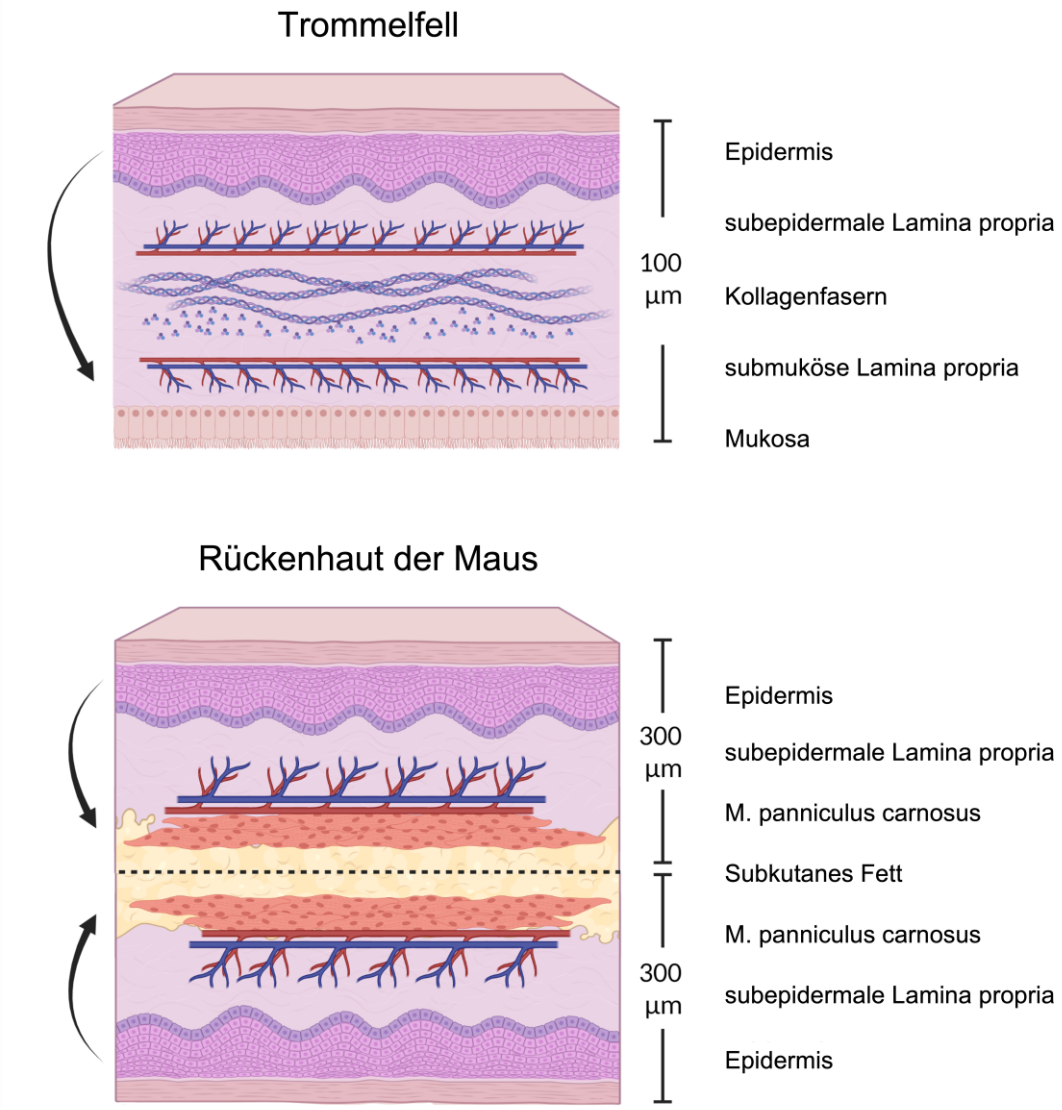

Abbildung 4: Histologischer Aufbau des Trommelfells und der Rückenhautkammer der Maus. Beide Gewebe bestehen aus zwei Epithelschichten, die durch ein vaskularisiertes Bindegewebe getrennt sind. Vom Gehörgang nach paukenwärts bilden eine Epithelschicht aus verhornendem Plattenepithel, eine Bindegewebsschicht mit radiären (Stratum radiatum) und zirkulären (Stratum circulare) Fasern gefolgt von einer Schleimhautschicht (respiratorisches Epithel) die Pars tensa des Trommelfells. Zwischen den Schichten liegt jeweils die Lamina propria. Die Doppelhautfalte der Rückenhautkammer besteht ebenfalls aus zwei äußeren Epithelschichten aus verhornendem Plattenepithel und einer darunter liegenden Lamina propria. Unterschiede

zum Trommelfell sind das respiratorische Epithel, der geringere Durchmesser (100 µm vs. 600 µm) und das Fehlen einer Muskelschicht. Beide Gewebe haben den Wundheilungsmechanismus der Epithelisierung durch epidermales Plattenepithel gemeinsam (durch Pfeile gekennzeichnet).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rückenhautkammer mit einem durchgreifenden Defekt präpariert. Es wurde untersucht, ob diese Modifikation des etablierten Modells wesentliche Mechanismen der Wundheilung am Trommelfell erfasst und eine standardisierte Auswertung der Defektgröße und mikrovaskulärer Parameter ermöglicht.

Ziel der vorliegenden Studie war die Identifizierung einer Präparation mit einer stabilen Größe der Perforation und geringer Angiogenese an den Wundgrenzen. Es wurden vier verschiedene Präparationen hinsichtlich der Wundepithelisierung, des Spontanverschlusses und der Intravitalmikroskopie getestet. Mit Hilfe etablierter Analyseverfahren soll dieses neue Tiermodell eine unkomplizierte Übertragung der Fortschritte des Tissue Engineering und der Biomaterialien auf die speziellen Bedingungen der Wundheilung des Trommelfelles ermöglichen.

IV. ZIELE

Die Rückenhautkammer der Maus ist ein neues Modell zur repetitiven Untersuchung der pathologischen Wundheilung der Trommelfellperforation.

Um die Rückenhautkammer als Modell für die Trommelfellperforation zu evaluieren, sind folgende Untersuchungen erforderlich:

- Untersuchung der vorzeitigen Epithelisierung der Wundränder
- Ausschluss einer spontanen Defektschrumpfung
- Visualisierung der Inflammation und Angiogenese am Wundrand
- Möglichkeit zur repetitiven intravitalen Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Präparationstechniken der Rückenhautkammer als neues Modell für vorzeitig epithelisierte Wunden evaluiert. Dazu wurden jeweils in zwei Gruppen die Rückenhautkammern ohne vorherige Präparation perforiert und in zwei weiteren experimentellen Gruppen der subkutane Gefäßplexus mikrochirurgisch exponiert und anschließend perforiert. Jeweils eine Präparation wurde durch Versiegelung mit einem Deckglas verschlossen bzw. an der Luft belassen.

Die Rückenhautkammer der Maus als neuartiges Wundheilungsmodell zur Untersuchung der persistierenden Trommelfellperforation kann eine Basis für die standardisierte Erforschung geeigneter Wundauflagen zum minimalinvasiven Verschluss von persistierenden Trommelfellperforationen werden. Morbidität und Gesundheitsausgaben könnten so, insbesondere in Ländern mit beschränktem Gesundheitssystem, gesenkt werden.

V. MATERIAL UND METHODEN

5.1 VERSUCHSTIERE

Für die *in-vivo*-Versuche wurden SKH-1hr Mäuse verwendet. Diese Mäuse sind phänotypisch durch den Verlust des Haarkleides gekennzeichnet. Es wurden männliche Tiere ab einem Alter von 6 - 8 Wochen und einem Gewicht von 25 g - 30 g verwendet. Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz § 8 Abs. 1 (AZ 7221.3-1-033/19) genehmigt und standen unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock. Die Tiere wurden in Einzelhaltung mit einem zwölfstündigen Licht-Dunkel-Zyklus bei 22°C (± 2°C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-65% untergebracht und hatten ständig Zugang zu Nahrung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser.

5.2 EXPERIMENTELLE GRUPPEN

Es wurden 20 Mäuse verwendet. Diese wurden nach dem Zufallsprinzip in vier experimentelle Gruppen (n = 5) eingeteilt:

- symmetrische Perforation mit durchgreifendem Defekt ohne Deckglas
- symmetrische Perforation mit durchgreifendem Defekt mit Deckglas
- asymmetrische Perforation nach Präparation der Rückenhautkammer ohne Deckglas
- asymmetrische Perforation nach Präparation der Rückenhautkammer mit Deckglas

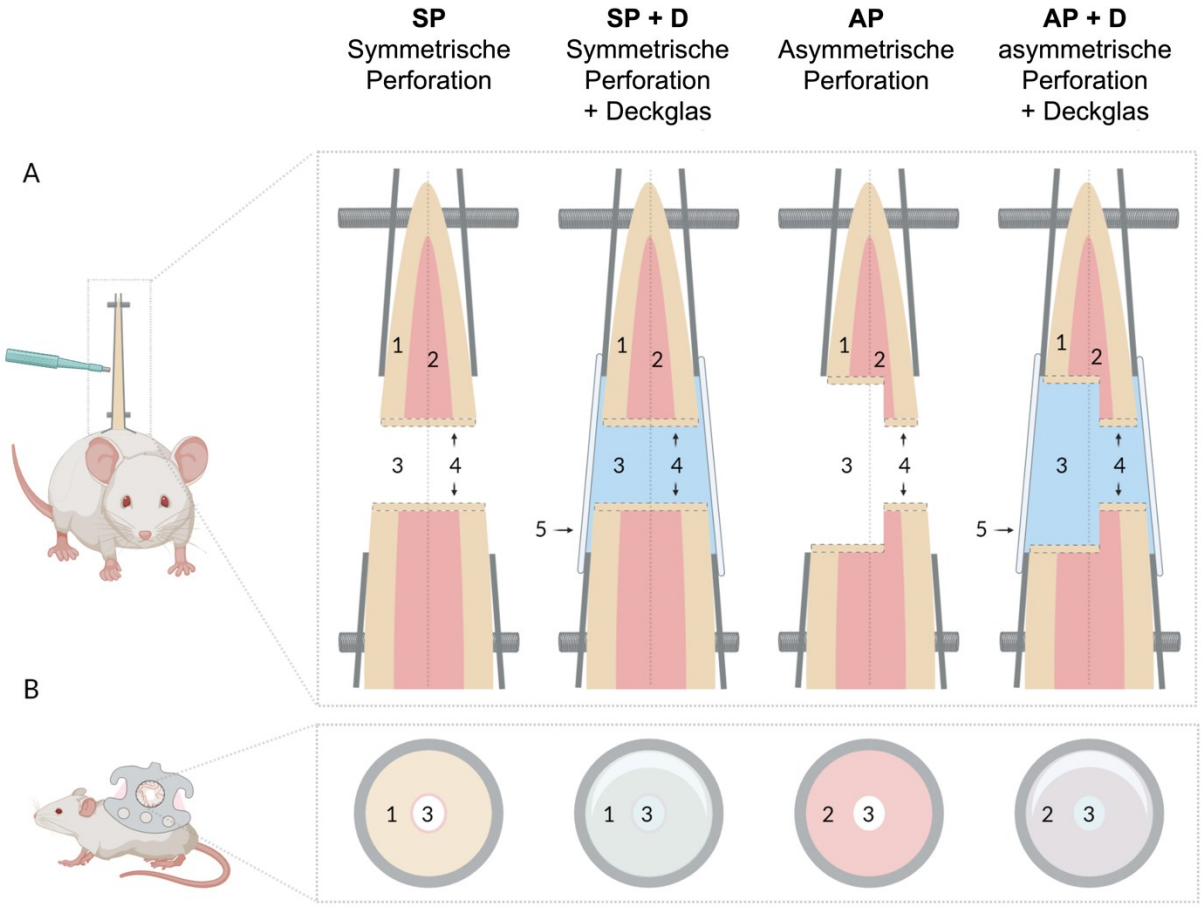

Abbildung 5: Experimentelle Gruppen. Die Versuchstiere wurden in vier experimentelle Gruppen eingeteilt. Bei der symmetrischen Perforation (SP) erfolgte die Exzision eines durchgreifenden Defektes (4) mit einer 2 mm Hautstanze durch beide Hautschichten (1) und den Musculus panniculus carnosus (2) ohne vorherige Präparation des Musculus panniculus carnosus. Der Defekt blieb offen. Auf die gleiche Weise erfolgte die Präparation der symmetrischen Perforation mit Deckglas (SP+D). Im Anschluss wurde zunächst ein Deckglas mit einem Sprengring fixiert, die Kammer mit 0,9% NaCl-Lösung befüllt und durch Aufbringen eines zweiten Deckglases wasserdicht verschlossen (5). Die asymmetrische Präparation umfasste die mikrochirurgische Freilegung des Musculus panniculus carnosus (2) vor der Exzision des Defekts (3). Auch hier blieb die Kammer offen (AP) oder wurde mit einem Deckglas verschlossen (AP+D). (n = 5, A transversale Ebene, B sagittale Ebene).

5.3 ANÄSTHESIE

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von Ketamin-Hydrochlorid (100 mg/kg) (CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Deutschland) und Xylazin-Hydrochlorid (6 mg/kg) (Bayer AG, Leverkusen, Deuschland) in 0,9%iger Kochsalzlösung. Die ausreichende Narkosetiefe (fehlende Reaktion auf Fußrückziehreflex) wurde initial sowie deren Erhalt repetitiv überprüft und überwacht. Für längere Untersuchungen wurde nach 60 Minuten eine 1:10 Verdünnung der Ketamin-Hydrochlorid-

Lösung gewichtsadaptiert intraperitoneal appliziert, um die Narkose aufrecht zu erhalten. Dies geschah alle 30 Minuten bis zum Ende der Untersuchung.

5.4 PRÄPARATION DER RÜCKENHAUTKAMMER

Zwei durch Schrauben miteinander verbundene, symmetrische Titanrahmen bildeten die Rückenhautkammer mit einem Gewicht von ca. 4 g. Nach dem Wiegen der Versuchstiere erfolgte die gewichtsadaptierte, intraperitoneale Anästhesie (s.o.). Bepanthen® (Bayer AG, Leverkusen, Deuschland) Augensalbe wurde zum Schutz der Augen vor Austrocknung aufgetragen. Die Versuchstiere wurden zur Aufrechterhaltung einer Körpertemperatur von 37 °C auf einer Heizplatte bei 37,5 °C gelagert. Es erfolgte die Desinfektion des Operationsgebietes mit Octiderm® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Durch vorsichtige Extension der Rückenhaut wurde anschließend die Doppelhautfalte in der Medianlinie der Maus aufgespannt und temporär mit einem kranialen und kaudalen Haltefaden (Polyester 4/0) an einem Fixierungsbügel fixiert. Wenn sich die großen Gefäße der extendierten Rückenhaut im Gegenlicht einer Schwanenhalslampe kongruent darstellten, war die mediane Position erreicht. Die beiden Elemente des Titanrahmens wurden mit vier Nähten (Prolene 4/0) an der Oberseite der Hautfalte fixiert. Für die kaudale Verbindung der Elemente des Titanrahmens wurden mit einem 11er Skalpell zwei Stichinzisionen der medianen Doppelhautfalte korrespondierend zu den Verbindungsschrauben durchgeführt. Die Verbindungsschrauben des Titanrahmens wurden durch die Inzisionen geführt und mit zwei Klemmen an den Schrauben fixiert. Im Gegenlicht erfolgte anschließend die farbliche Markierung der Präparationsfläche mit einem Durchmesser von ca. 15 mm.

In den zwei Versuchsgruppen der symmetrischen Perforation, mit und ohne Deckglas, wurde mit einer 2 mm Einmal-Hautstanze (BIOPSY PUNCH, Stiefel Laboratories, Brentford, UK) ein durchgreifender Defekt gesetzt. In den Versuchsgruppen mit asymmetrischer Präparation wurde zunächst in Seitenlage unter dem Stereomikroskop im angezeichneten Areal mikrochirurgisch die Cutis, Subcutis, der M. panniculus carnosus sowie zwei Schichten des Rektraktormuskels vollständig bis auf den M. panniculus carnosus der Gegenseite abpräpariert. Anschließend wurde ebenfalls ein durchgreifender Defekt mit einer 2 mm Einmal-Hautstanze gesetzt. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde die Präparationsfläche kontinuierlich mit 0,9% NaCl Lösung benetzt. Feuchte Wattestäbchen oder Kompressen wurden während der Präparation zur Blutstillung eingesetzt. Verbindungsschrauben, welche die Titanrahmen auf einem Abstand von 450 µm halten, dienten als Kompressionsschutz der Blutgefäße. Die Vorderseite der Kammer wurde im

Anschluss an die Präparation auf die drei Verbindungsschrauben aufgebracht und mit Muttern unter sanftem Druck fixiert. Dann wurde in den Versuchsgruppen mit geschlossener Kammer zunächst ein Deckglas mit einem Sprengring fixiert. Die Kammer wurde mit 0,9% NaCl-Lösung befüllt und durch Aufbringen eines zweiten Deckglases wasserdicht verschlossen. Im Anschluss erwachten die Versuchstiere aus der Narkose. Zur Prophylaxe möglicher Wundschmerzen wurde eine Analgesie mit Metamizol (4 Tropfen von 500 mg/ml Metamizol in 100 ml Trinkwasser, täglicher Wechsel des Trinkwassers) (Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland) durchgeführt.

5.5. INTRAVITALMIKROSKOPIE UND PLANIMETRIE

An Tag vier nach der Kammerpräparation erfolgte erstmals die Planimetrie und Intravitalmikroskopie. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere anästhesiert und auf einer Heizplatte bei 37,5 °C fixiert. Die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiozyanat (FITC)-Dextran (0,05 ml, 5%, MW: 150 kD) und Rhodamin 6 G (0,05 ml, 2%, MW: 496 D) zur Visualisierung des mikrovaskulären Systems und Leukozyten erfolgte durch retrobulbäre Injektion mit einer Insulinspritze und anschließender Blutstillung durch Druck mit einem Wattestäbchen. Anschließend wurden die Tiere auf einer speziell angefertigten Plexiglasplattform fixiert, sodass die Rückenhautkammer der Mikroskopie zugänglich war.

Um die Wunde zu untersuchen, erfolgte zunächst die Planimetrie mit einem Stereomikroskop (Leica M651/M655, LeicaMicrosystems AG, Heerbrugg, Schweiz) in 16- und 40-facher Vergrößerung und anschließend die Intravitalmikroskopie mit 5-, 10- und 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Axiotech® Vario 100 Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Epiillumination erfolgte mit einer 100-W-HBO-Quecksilberdampflampe und entsprechenden Filtersets: Blau (Anregung, 450 - 490 nm; Emission 520 nm) und grün (Anregung 530 - 560nm, Emission 580 nm). Zu jedem Zeitpunkt wurden drei proximal zur Perforation liegende und die entsprechenden peripheren Sichtfelder untersucht: Jedes Mal wurde ein Sichtfeld bei 10- und 20-facher Vergrößerung in der Nähe des Perforationsrandes für 20 Sekunden beobachtet. Dann wurde das Mikroskop radial um ein Sichtfeld (10-fache Vergrößerung) von der Perforation wegbewegt. Dieses periphere Sichtfeld wurde für weitere 20 Sekunden bei 10- und 20-facher Vergrößerung beobachtet. Die Leukozytenflussdynamik und die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen wurden mit dem Grünfilter und 20-facher Vergrößerung untersucht. Dazu wurden drei Venolen im Sichtfeld 30 Sekunden lang visualisiert.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Videokamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) zur Offline-Auswertung auf DVD (DMR-EX99V, Panasonic, Kadoma, Japan) aufgezeichnet. An den Tagen 8, 12, 16 und 20 wurden die Untersuchungen in gleicher Weise wiederholt. Am Ende der Versuche, nach der Intravitalmikroskopie an Tag 20, erfolgte direkt im Anschluss die Tötung durch intravenöse Applikation von Narkoselösung und zervikale Dislokation. Nach Entfernung der Rückenhautkammer erfolgte die Asservierung des Hautgewebes in 4% phosphatgepuffertem Formalin für die spätere histologische und immunhistochemische Analyse.

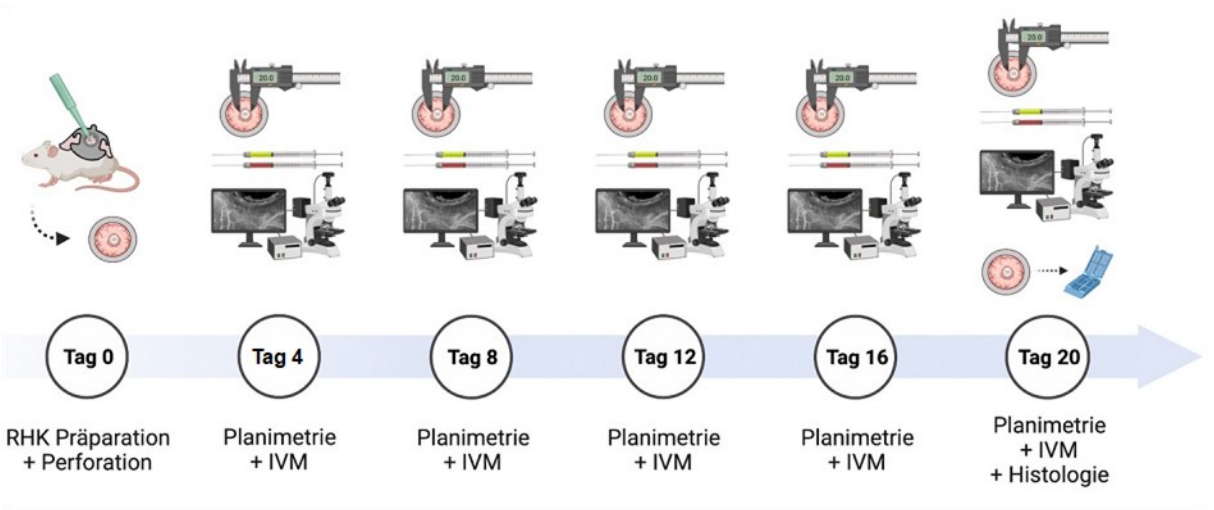

Abbildung 6: Versuchsprotokoll. Nach der Präparation der Rückenhautkammer und der anschließenden Perforation der Haut mit einer 2 mm Hautstanze erfolgte an den Tagen 4, 8, 12, 16 und 20 die Planimetrie mit einem Stereomikroskop in 16- und 40-facher Vergrößerung. Im Anschluss erfolgte die Intravitalmikroskopie (IVM) mit 50-, 100- und 200-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Axiotech® vario Mikroskops. Während der Intravitalmikroskopie wurden das mikrovaskuläre System und die Leukozyten durch die gleichzeitige intravenöse Injektion von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertem Dextran und Rhodamin 6G sichtbar gemacht. Nach der Intravitalmikroskopie an Tag 20 wurde das Kammergewebe für die Histologie entnommen, für 3 Tage in 4 % phosphatgepuffertem Formalin fixiert und dann in Paraffin eingebettet. (IVM, intravitale Fluoreszenzmikroskopie)

5.5 COMPUTERGESTÜTZTE BILDANALYSE

Die computergestützte Bildanalyse erfolgte offline mit CapImage (Zeintl Software, Dreieich, Deutschland). Die Größe der Perforation wurde durch Planimetrie (mm^2) bestimmt. Der Defektrand wurde manuell markiert und die resultierende Fläche automatisch berechnet. Auf gleiche Weise wurde Detritus markiert. Die Differenz aus beiden Flächen ergab die Fläche des Detritus. Erythrozyten werden als Schatten im FITC gefärbten Plasma sichtbar. Die Analyse der Mikrozirkulation erfolgte anhand der Untersuchung der Venolen und umfasste

die Gefäßdurchmesser (µm), die Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten (µm/s) und die funktionelle Kapillardichte (cm/cm²). Die Durchmesser wurden senkrecht zum Gefäßverlauf gemessen. Die Erythrozytengeschwindigkeit wurde mit der Line-Shift-Methode ermittelt. Die funktionelle Kapillardichte wurde definiert als die Länge der mit Erythrozyten durchbluteten Kapillaren pro Sichtfeld. Die Entzündung wurde durch Messung der Leukozytenzahl pro Sichtfeld (Zellen/mm²), des Leukozytenflusses (Zellen/mm²/s) und der Leukozyten-Endothel-Interaktion (Zellen/mm²) quantifiziert. Adhärente Leukozyten wurden als Rhodamin-6G-gefärbte Zellen pro Sichtfeld definiert. Rollende Leukozyten wurden als Rhodamin-6G-positive Zellen definiert, die sich langsamer als rote Blutkörperchen bewegen.

5.6 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOLOGIE

Das Gewebe wurde drei Tage lang in 4 % phosphatgepuffertem Formalin fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Für die histologische Routineuntersuchung wurden 4 µm große Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Inflammation wurde durch AS-D Chloracetat-Esterase (CAE) Leukozytenfärbung und F4/80 Makrophagenfärbung (polyklonaler Ratten-Anti-Maus-Anti-F4/80, 1:10, Serotec, Hercules, USA; sekundärer Maus-Anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörper, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) sichtbar gemacht. Ki-67 als Marker für proliferierende Zellen wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki-67 markiert (1:200, Abcam, Cambridge, UK; sekundärer polyklonaler Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG mit alkalischer Phosphatase, 1:100, Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA). Alle Schnitte wurden mit Hämalaun/Permanentrot-Lösung (Agilent Dako, Santa Clara, Kalifornien, USA) gegengefärbt und lichtmikroskopisch (BX51, Olympus, Tokio, Japan) mit einem 40-fach-Objektiv (Plan N ×40/0,65 W, Olympus) untersucht.

5.7 STATISTIK

Zur Evaluation wurden primäre und sekundäre experimentelle Endpunkte definiert. Primäre Endpunkte waren die Größe der Perforation (mm^2) und die Epithelisierung des Defektrandes (ja/nein). Sekundäre Endpunkte waren die Neovaskularisierung (Intravitalmikroskopie, Immunhistochemie) und die Entzündungsinfiltration (Intravitalmikroskopie, Immunhistochemie), um Ausgangsdaten für zukünftige Experimente zu erhalten. Die statistische Analyse erfolgte mit der ANOVA/Mixed Effects-Analyse, gefolgt von Tukey's oder Sidak's Vergleichstests.

VI. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Wundheilungsmodell für persistierende Trommelfellperforationen vorgestellt. Vier modifizierte Modelle der Rückenhautkammer wurden auf Machbarkeit, Defektepithelisierung, Veränderung des Perforationsdurchmessers, Vaskularisierung und Inflammation untersucht. Die besten Ergebnisse zeigten sich dabei für die symmetrische Perforation ohne Deckglas und ohne vorherige Präparation des Musculus panniculus carnosus. Die Präparation der symmetrischen Perforation ohne Deckglas war einfach durchzuführen. Der Perforationsrand wurde durch verhornendes Plattenepithel überwuchert. Es kam zu keinem spontanen Zusammenschrumpfen der Wunde. Gleichzeitig ermöglichte das Modell eine wiederholte intravitale Visualisierung der Defektgröße, der Mikrozirkulation und der Inflammation.

Die Präparationen der symmetrischen Perforation mit und ohne Deckglas sowie der asymmetrischen Perforation mit Deckglas wurden von den Versuchstieren gut vertragen und es kam nur zu wenigen Ausfällen. Insbesondere die Präparation der symmetrischen Defekte war einfach, gut reproduzierbar und erforderte keine mikrochirurgischen Eingriffe. Die Präparation einer symmetrischen Perforation dauerte circa 10 Minuten, während die Präparation der asymmetrischen Perforation circa 20 Minuten in Anspruch nahm. 80 % (4/5) der Versuchstiere der Gruppe mit symmetrischer Perforation ohne Deckglas überlebten 20 Tage ohne unerwünschte Ereignisse, während 20 % (1/5) der Mäuse am Tag 0 während der Narkose starben. In der Gruppe der symmetrischen Perforation mit Deckglas kam es an den Tagen 12, 16 und 20 zu späten Ausfällen aufgrund bekannter Komplikationen der Rückenhautkammer: seitliches Kippen der Kammer und Ausreißen der Nähte. 40 % (2/5) der Versuchstiere überlebten 20 Tage. In der Gruppe der asymmetrischen Perforation mit Deckglas schieden 20 % (1/5) Tiere am 15. Tag durch seitliches Kippen der Kammer aus und 80 % (4/5) der Mäuse konnten 20 Tage lang untersucht werden. In der Gruppe der asymmetrischen Perforation ohne Deckglas kam es rasch zur Wundkontamination durch Umgebungskeime mit Kammerinfektionen und Nekrosenbildung. Die Versuchstiere zeigten Anzeichen einer Dehydratation mit einem Gewichtsverlust von > 20%, Apathie und Automutilation. 100 % (5/5) der Tiere mussten vor der ersten Intravitalmikroskopie an Tag vier gemäß den Abbruchkriterien getötet werden. Daher wurde die Prüfung der asymmetrischen Präparate ohne Deckglas ausgesetzt.

6.1 EPITHELISIERUNG DES WUNDRANDES

Wie bei der persistierenden Trommelfellperforation des Mittelohrs epithelisierten auch die Wundränder der Hautdefekte in der Rückenhautkammer. Die Epithelisierung war lückenlos und zeigte sich in allen Präparaten in jeder der drei Versuchsgruppen (Abbildung 7).

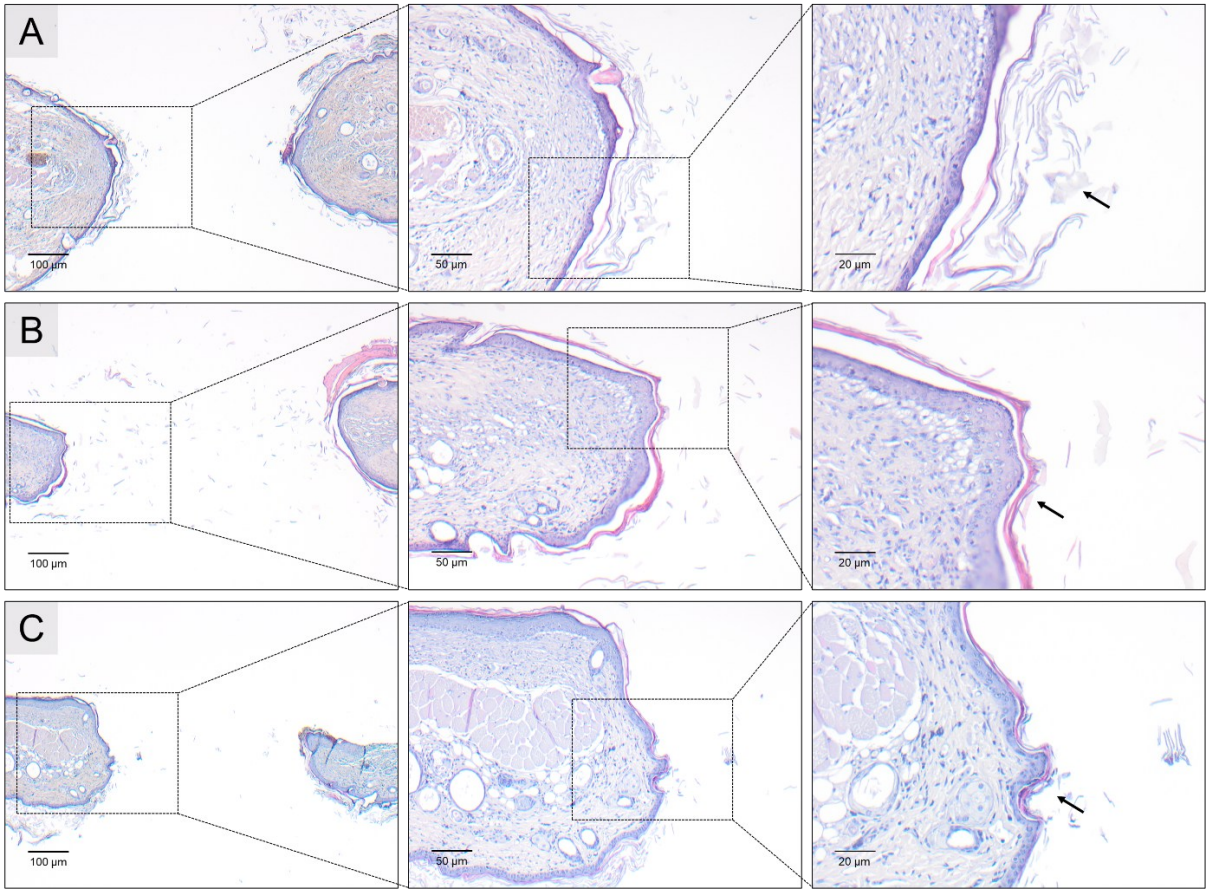

Abbildung 7: Vorzeitige Epithelisierung der Wunde. Nach der Fixierung des Gewebes der Rückenhautkammer wurden die Präparate für die histologische Untersuchung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die histologischen Abbildungen zeigen den Defektrand 20 Tage nach Durchführung einer symmetrischen Perforation (A), einer symmetrischen Perforation mit Deckglas (B) und einer asymmetrischen Perforation mit Deckglas (C) (5-, 10-, 20-fach, von links nach rechts). In allen Gruppen ist der Defektrand analog zur chronischen Trommelfellperforation beim Menschen mit verhornendem Plattenepithel überwachsen (Pfeil).

In den Versuchsgruppen der symmetrischen Perforation mit und ohne Deckglas war die Epithelisierung besonders ausgeprägt. Der Defektrand wurde vollständig von verhornenden Plattenepithel überwuchert. Mikroskopisch entsprach das Plattenepithel des Defektrandes dem physiologischen Epithel der Rückenhautkammer. Die Höhe der Epidermis war identisch. Nach Entfernung einer Epithelschicht in der asymmetrischen Präparation mit Deckglas wuchs das verbleibende Epithel ebenfalls über den Defektrand. Hier wuchs das Epithel

sogar über den, durch die Präparation entstandenen, Hautdefekt nach Entfernung des Musculus panniculus carnosus hinaus und bedeckte diesen vollständig. Im Vergleich zum physiologischen Epithel der Rückenhautkammer war die Epidermis auf der Seite des präparierten Musculus panniculus carnosus höher und die Keranozyten lockerer angeordnet. In allen Präparaten zeigte sich eine kräftige Verhornung analog zum physiologischen Epithel der Rückenhautkammer.

6.2 SPONTANE DEFEKTSCHRUMPFUNG

Alle Defekte wurden mit einer 2-mm-Biopsiestanze (Æ 3,14 mm²) an Tag null präpariert. Bei den symmetrischen Perforationen ohne Deckglas (n = 5, Drop-out 1/5 an Tag 0) kam es zu keiner signifikanten Verkleinerung der Perforation (Abbildung 8). Nach Stanzen des Defektes blieb dieser konstant bei 2,97 ± 0,52 mm² während der gesamten Versuchsdauer von 20 Tagen (p = 0,99; Tag 1 vs. letzte Messung). Das Aufbringen eines Deckglases nach der Präparation einer symmetrischen Perforation (symmetrische Perforation mit Deckglas) (n = 5, Drop-out 3/5 an Tag 12, 16, 20) führte zu einer Verkleinerung der Perforation ab Tag 4 (2,17 ± 0,26 mm²); die resultierende Perforation schrumpfte signifikant auf eine Größe von 1,49 ± 1,13 mm² an Tag 20 (p < 0,05; Tag 1 vs. letzte Messung). In der dritten Gruppe, der asymmetrischen Perforation mit Deckglas (n = 5, Drop-out 1/5 an Tag 15), wurde eine intermediäre, spontane Verkleinerung der Perforation beobachtet. Die Defektgröße war 12 Tage lang stabil und vergleichbar mit der symmetrischen Perforation ohne Deckglas (2,59 ± 0,47 mm²). In der dritten Woche schrumpfte der Defekt jedoch auf eine Endgröße von 2,15 ± 0,45 mm² (p = 0,22; Tag 1 vs. letzte Messung).

Zusätzlich zur konstanten Defektgröße war auch der Standardfehler/die Standardabweichung der Messungen bei der symmetrischen Perforation ohne Deckglas am geringsten: Die Standardfehler waren im Vergleich für die symmetrische Perforation ohne Deckglas (0,24 ± 0,07 mm²) zur symmetrischen Perforation mit Deckglas (0,55 ± 0,16 mm^2) und asymmetrischen Perforation mit Deckglas (0,46 ± 0,03 mm^2) signifikant niedriger (symmetrische Perforation ohne Deckglas vs. symmetrische Perforation mit Deckglas p < 0,05; symmtrische Perforation ohne Deckglas vs. asymmetrische Perforation mit Deckglas p < 0,05; symmetrische Perforation mit Deckglas vs. asymmetrische Perforation mit Deckglas p = 0,39).

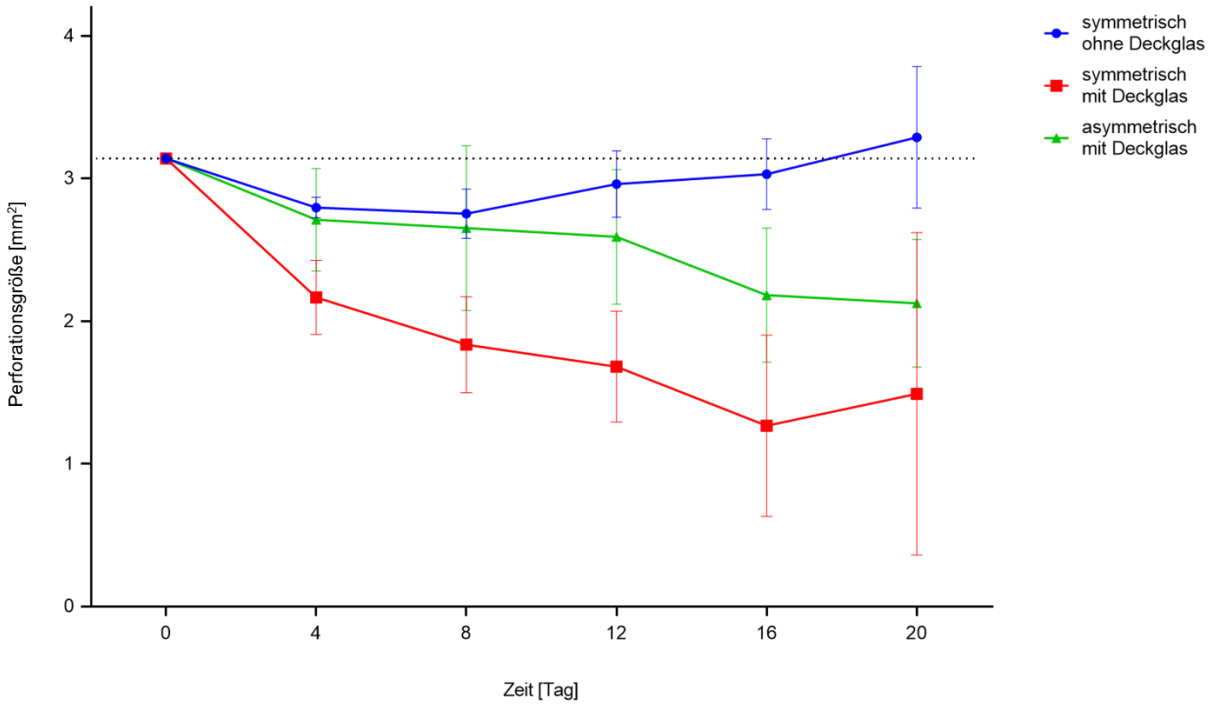

Abbildung 8: Repetitive Planimetrie der Perforationsgröße. Alle Defekte wurden mit einer 2 - mm Biopsiestanze (Æ 3,14 mm^2) präpariert. Nach der Präparation einer symmetrischen Perforation (n = 5, Dropout 1/5 an Tag 0, blau) bleibt die Defektgröße über 20 Tage unverändert. Die Präparation einer symmetrischen Perforation mit Deckglas (n = 5, Dropout 3/5 an den Tagen 12, 16, 20, rot) oder einer asymmetrischen Perforation mit Deckglas (n = 5, Dropout 1/5 an Tag 15, grün) führt jedoch zu einer Verkleinerung der Perforation. Die Standardabweichung war am niedrigsten für die symmetrische Perforation ohne Deckglas. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM von unabhängigen Versuchen angegeben.

Die hohen Standardfehler der symmetrischen und asymmetrischen Perforation mit Deckglas waren hierbei mit einer Detritus-Sekretion verbunden, welche sich im Gegensatz zur symmetrischen Perforation ohne Deckglas unter dem Deckglas akkumulierte und so eine präzise Messung der Perforationsgröße erschwerten. Dieser Effekt wurde durch die Freilegung des Subkutangewebes bei den asymmetrischen Perforationen mit Deckglas weiter verstärkt. Große Bereiche der Perforation wurden hierdurch verdeckt: 88,28 ± 6,60 % bei symmetrischen Perforationen mit Deckglas und sogar 96,93 ± 3,07 % (Durchschnitt von Tag 4 bis 20) bei den asymmetrischen Perforationen mit Deckglas. Im Gegenzug waren bei den symmetrischen Perforationen ohne Deckglas nur 51,84 ± 3,83 % des Defekts mit Detritus bedeckt (Abbildung 9).

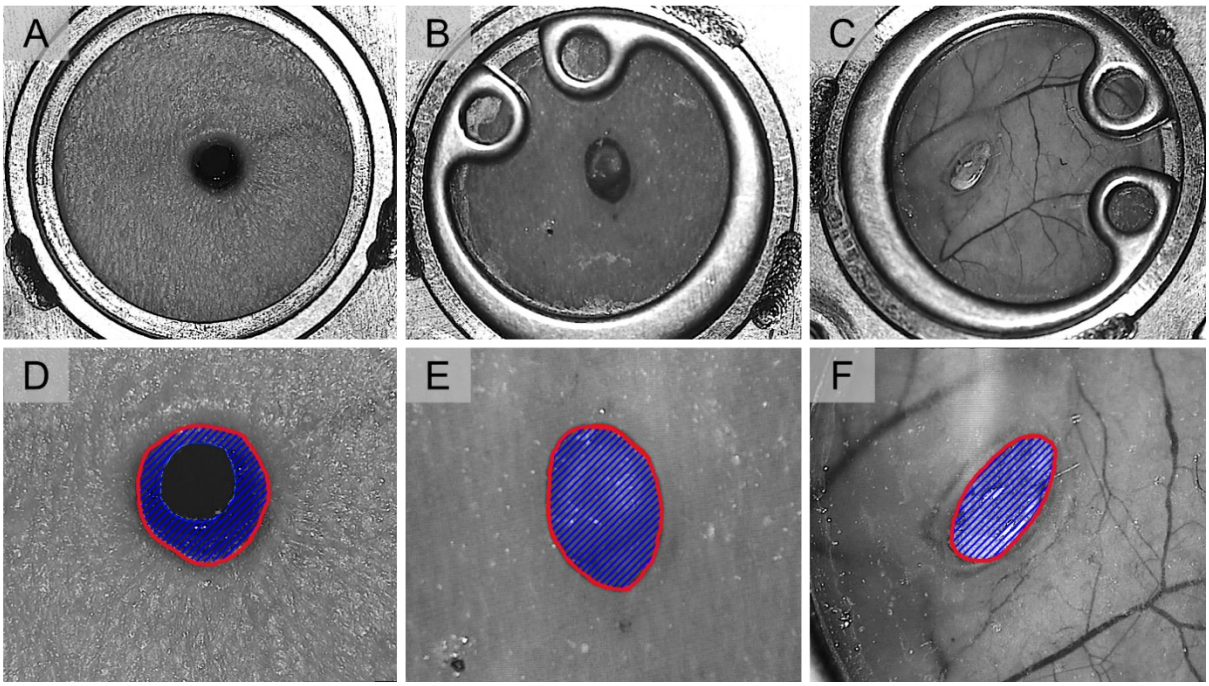

Abbildung 9: Planimetrie. Dargestellt sind die stereomikroskopischen Bilder der symmetrischen Perforation ohne (A, D) und symmetrischen Perforation mit Deckglas (B, E) an Tag 8 sowie der asymmetrischen Perforation mit Deckglas (C, F) an Tag 4 in 16- (A, B, C) und 40- facher (D, E, F) Vergrößerung. Insbesondere bei den Präparationen mit Deckglas kommt es zu einer Akkumulation von Detritus im Defekt, sodass eine präzise Messung der Defektgröße erschwert wird. Bei der asymmetrischen Perforation wird dieser Effekt noch verstärkt. Im Gegensatz dazu war bei der symmetrischen Perforation mit Deckglas die Detritusakkumulation weitaus weniger ausgeprägt. Die symmetrische Präparation ohne Deckglas ist der Präparation mit Deckglas bezüglich der Visualisierung der Defektgröße überlegen. Rote Linie: Fläche des Gesamtdefekt; blau schraffiert: Detritus.

6.3 INTRAVITALMIKROSKOPISCHE KAPILLARDICHTE

Alle Rückenhautkammerpräparate ermöglichten eine wiederholte Intravitalmikroskopie und Messung der Kapillardichte. Die Kapillardichte wurde in definierten zentralen (nahe dem Defekt) und peripheren (>1 Beobachtungsfeld bei 10-facher Vergrößerung) Sichtfeldern gemessen (Abbildung 10). Alle drei Präparationsarten erlauben die Visualisierung und Observierung der Mikrozirkulation in ausreichender Bildqualität, wobei die asymmetrische Präparation mit Deckglas die höchste Qualität bietet und somit für Fragestellungen der Gefäßversorgung am besten geeignet ist (Abbildung 11).

Die Kapillardichte (cm/cm^2) wurde mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie nach intravenöser FITC-Dextran-Injektion gemessen. Zwei Beobachtungsfelder wurden durch den Abstand zur Perforation definiert: Zentraler Bereich = nahe an der Perforation (innerhalb eines Beobachtungsfeldes bei 20-facher Vergrößerung) und peripherer Bereich = weit von der

Perforation entfernt (>1 Beobachtungsfeld bei 10-facher Vergrößerung). Die computergestützte Bildanalyse war bei allen Präparaten (symmetrische Perforation ± Deckglas, asymmetrische Perforation + Deckglas) durchführbar. Die Kapillardichte war perforationsnah und perforationsfern gleich. Der Vergleich zentral (unter einer möglichen Wundauflage) und peripher (jenseits einer Wundauflage) ermöglicht eine Bewertung des Blutflusses in Abhängigkeit von der Wundtherapie.

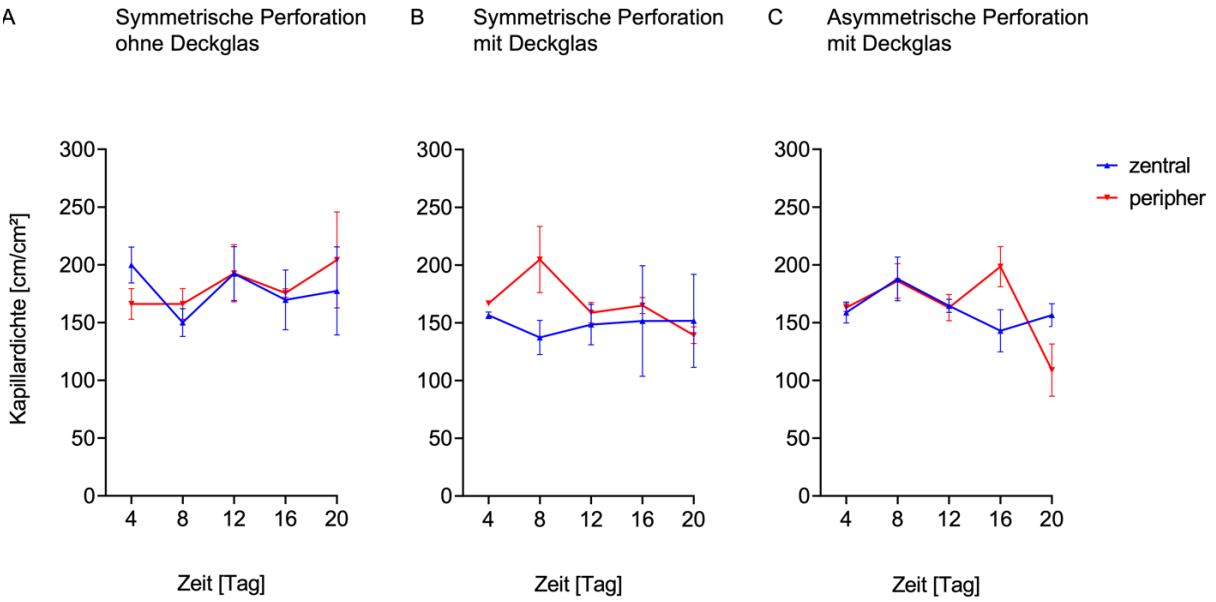

Abbildung 10: Repetitive Analyse der Kapillardichte. Die Kapillardichte war während des gesamten Versuchsverlaufs zwischen zentral (rot) und peripher (blau), zwischen den Gruppen und zeitlich konstant ($p > 0,05$). Die Werte sind als Mittelwerte ± SD angegeben (n = 5, Ausfälle: symmetrische Perforation 1/5 an Tag 0; symmetrische Perforation mit Deckglas 3/5 an Tag 12, 16, 20; asymmetrische Perforation mit Deckglas 1/5 an Tag 15)

Die Kapillardichte betrug für die symmetrische Perforation ohne Deckglas zentral und peripher 199,8 cm/cm^2 vs. 166,1 cm/cm^2 an Tag vier (± 30,41 cm/cm^2; $p = 0,8$); 150 cm/cm^2 vs. 166,1 cm/cm^2 an Tag acht (± 28,15 cm/cm^2; $p = 0,92$); 192,4 cm/cm^2 vs. 192,6 cm/cm^2 an Tag 12 (± 28,15 cm/cm^2; $p = 0,99$); 169,6 cm/cm^2 vs. 175,6 cm/cm^2 an Tag 16 (± 32,51 cm/cm^2; $p = 0,98$) und 177,3 cm/cm^2 vs. 204,2 cm/cm^2 an Tag 20 (± 35,61 cm/cm^2; $p = 0,91$). Für die symmetrische Perforation mit Deckglas betrug die Kapillardichte 156,5 cm/cm^2 vs. 166,9 cm/cm^2 an Tag vier (± 3,2 cm/cm^2; $p = 0,09$); 137,3 cm/cm^2 vs. 204,8 cm/cm^2 an Tag acht (± 32,28 cm/cm^2; $p = 0,29$); 148,5 cm/cm^2 vs. 158,8 cm/cm^2 an Tag 12 (± 40,88 cm/cm^2; $p = 0,95$); 151,5 cm/cm^2 vs. 165,0 cm/cm^2 an Tag 16 (± 40,88 cm/cm^2; $p = 0,95$) und 151,7 cm/cm^2 vs. 139,3 cm/cm^2 an Tag 20 (± 34,81 cm/cm^2; $p = 0,95$). Für die asymmetrische Perforation mit Deckglas betrug die Kapillardichte 158,8 cm/cm^2 vs.

163,1 cm/cm^2 an Tag vier (± 17,13 cm/cm^2; p = 0,99); 187,9 cm/cm^2 vs. 186 cm/cm^2 an Tag acht (± 17,13 cm/cm^2; p = 0,99); 164,6 cm/cm^2 vs. 162,9 cm/cm^2 an Tag 12 (± 19,16 cm/cm^2; p = 0,99); 142,9 cm/cm^2 vs. 198,4 cm/cm^2 an Tag 16 (± 22,12 cm/cm^2; p = 0,09) und 156,5 cm/cm^2 vs. 108,9 cm/cm^2 an Tag 20 (± 27,09 cm/cm^2; p = 0,31).

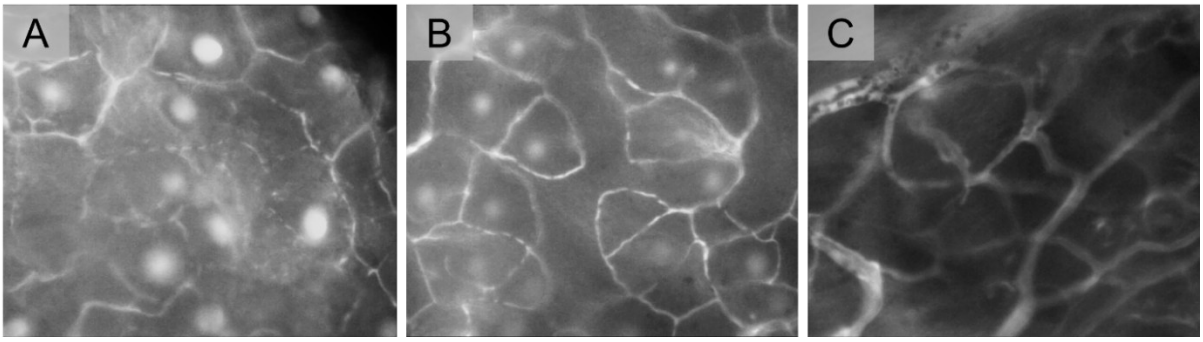

Abbildung 11: Repräsentative Bilder der Intravitalmikroskopie. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (FITC-Dextran) eines zentralen Kapillarfeldes einer symmetrischen Perforation ohne Deckglas (A), einer symmetrischen Perforation mit Deckglas (B) sowie einer asymmetrischen Perforation mit Deckglas (C) an Tag 8 (20x).

6.4 INFLAMMATION

Die intravitale Visualisierung der Leukozytenmigration erforderte die Präparation des Musculus panniculus carnosus, da die den Gefäßplexus bedeckende Gewebeschicht aus Muskel- und Hautgewebe die Beobachtung der Rhodamin-6G-gefärbten Leukozyten erschwerte. Somit war die intravitale Messung der Entzündung zwar bei der asymmetrischen Perforation mit Deckglas, nicht aber bei der symmetrischen Perforation mit und ohne Deckglas messbar (Abbildung 12). Die Inflammation und Proliferation wurden daher durch postmortale CAE-, Ki 67- und F4/80-Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Die CAE-, Ki-67- und F4/80-positive Färbung war gering, was auf eine geringe Inflammation und Proliferation hinweist. Die markierten Zellen befanden sich überwiegend subkutan, um die Gefäße des Musculus panniculus carnosus herum. Das regenerierte Epithel und die subepidermalen Schichten zeigten keine Zeichen für Immuninfiltration und -proliferation (Abbildung 13). Die geringe Proliferation und Inflammation spricht für die vorzeitige Terminierung der Wundheilungsphasen und für den Übergang in das Remodelling. Damit ist die Wunde stabil und es ist kein Verschluss der Perforation zu erwarten. Die geringe Proliferation und Inflammation in der Immunhistologie kann in zukünftigen Studien als Kontrolle gegen die Therapie mit Wundauflagen dienen.

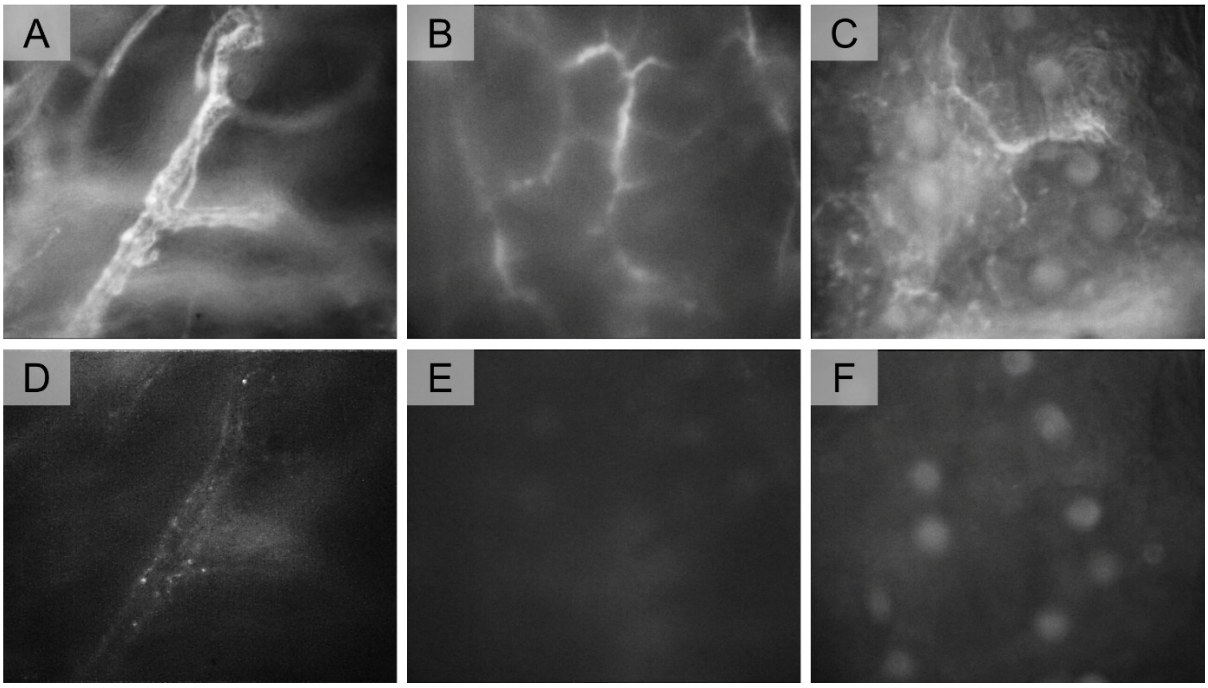

Abbildung 12: Intravitale Visualisierung der Leukozytenmigration. Dargestellt ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (FITC-Dextran) einer Venole einer asymmetrischen Perforation mit Deckglas an Tag 8 (A), einer symmetrischen Perforation mit Deckglas an Tag 8 (B) und symmetrischen Perforation ohne Deckglas an Tag 12 (C) (20x). Die Abbildungen D - F zeigen die Rhodamin-6G-gefärbten Leukozyten der unter A - C dargestellten Venole: asymmetrische Perforation mit Deckglas (D), symmetrische Perforation mit Deckglas (D), symmetrische Perforation ohne Deckglas (F) (20x). Die intravitale Visualisierung der Venolen und Leukozyten war bei der asymmetrischen Perforation mit Deckglas (A und D), nicht aber bei der symmetrischen Perforation mit und ohne Deckglas möglich (B und C, E und F).

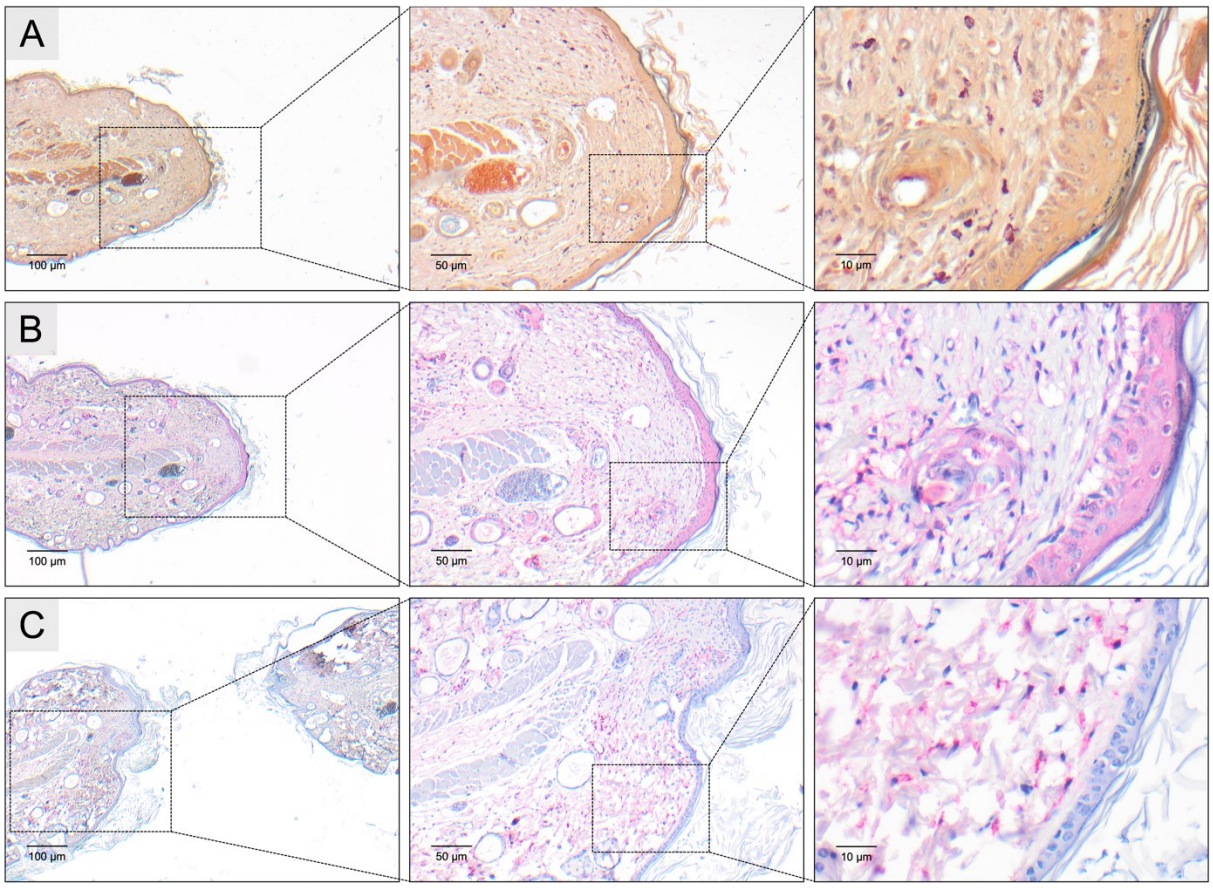

Abbildung 13: Repräsentative Immunhistochemie zur Auswertung von Proliferation und Inflammation. Ki-67-Immunhistochemie (B): In dem vollständig epithelisierten Wundrand und perivaskulär besteht keine gesteigerte Proliferation. Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung der entzündlichen Infiltration durch Neutrophile (CAE) (A) und Makrophagen (F4/80 (C) zeigt eine geringe Entzündung.

VII. DISKUSSION

Die jüngsten Fortschritte auf dem Gebiet des Tissue-Engineerings haben eine Vielzahl von Biomaterialien für die Behandlung von Hautwunden, aber auch potenzielle neue Therapien für persistierende Trommelfellperforationen hervorgebracht. Alle potenziellen Wundauflagen unterscheiden sich erheblich in Bezug auf das Herstellungsverfahren (Elektrospinning, Bioprinting), die Materialien (Gelatine, Kollagen, PGS), der physikalischen Eigenschaften (Ausrichtung der Nanofasern, Porengröße) und den biologischen Wechselwirkungen (Wachstumsfaktoren, Stammzellen, Antibiotika) [53, 108, 124].

Eine sichere und effektive klinische Anwendung von Biomaterialien erfordert eine systematische *in-vitro*- und *in-vivo*-Bewertung der Biokompatibilität und Wirksamkeit [50]. Die derzeitigen orthotopen Modelle für die persistierende Trommelfellperforation weisen aber zwei wesentliche Einschränkungen auf, die den Fortschritt bei der Erforschung neuer Wundauflagen zur Regeneration des Trommelfells behindern: spontaner Defektverschluss ohne konstante Defektgröße und fehlende Wundvisualisierung nach der Applikation von Biomaterialien. Die Analyse basiert auf der Histologie und Immunhistologie eines variablen Defekts nach dem Aufbringen einer Biomaterialprobe zu einem einzigen Zeitpunkt (Tabelle 3). Die vorliegende Arbeit untersucht eine Modifikation der Rückenhautkammer der Maus mit einem standardisierten epithelisierten Defekt als Modell für die pathologische Wundheilung bei persistierenden Trommelperforationen. Im Gegensatz zur postmortalen histologischen Analyse ermöglicht das vorgeschlagene Modell die wiederholte intravitale Visualisierung und Messung funktioneller Parameter [61, 118].

Die durchgreifende Perforation der Rückenhautkammer spiegelt die Schlüsselelemente der pathologischen Wundheilung der persistierenden Trommelfellperforation wider: das Fehlen eines Wundbettes und die mangelnde Versorgung mit Wachstumsfaktoren. Es wurde gezeigt, dass verhornendes Plattenepithel den Perforationsrand überwuchert und dass die Rückenhautkammer der Maus eine wiederholte Analyse der Defektgröße und Angiogenese nach einer Hautperforation ermöglicht. Unter Verwendung etablierter Analyseverfahren bietet dieses modifizierte Wundheilungsmodell eine effektive Plattform für das Screening bioaktiver Materialien und die Übertragung von Fortschritten im Tissue-Engineering auf die speziellen Bedingungen der pathologischen Wundheilung persistierender Trommelfellperforationen.

Die vorzeitige Epithelisierung des Defektrandes ist ein wichtiger Faktor bei der pathologischen Wundheilung persistierender Trommelfellperforationen und muss in jedem Trommelfellmodell berücksichtigt werden [73, 74, 95, 118, 119]. Im vorgeschlagenen Modell

wurde der Defektrand der Wunde innerhalb weniger Tage nach der Perforation der Haut von einer Epithelschicht überwuchert, im Gegensatz zu aktuellen orthotopen Trommelfellmodellen ohne weitere mechanische oder chemische Manipulation. Die vorzeitige Epithelisierung steht dabei im Zusammenhang mit der kleinen Wundfläche von 3,77 mm² (Defektumfang x Defekthöhe). Die Epithelisierung des Defektrandes findet auch in derzeitigen orthotopen Trommelfellmodellen bei Nagetieren statt. Jedoch ist die Kontraktion der Hauptfaktor bei der Wundheilung bei Nagetieren und führt zu einer hohen Rate an Spontanverschlüssen bei den derzeitigen orthotopen Trommelfellmodellen [28]. Um Spontanverschlüsse zu verhindern, muss die Trommelfellwundheilung in orthotopen Trommelfellmodellen bei Nagetieren durch thermische/Laser-Myringotomie und topische Medikamentenapplikation abgeschwächt werden (Tabelle 3). Das kann die Wirkung von Wundauflagen beeinträchtigen. Bei der menschlichen Wundheilung ist die Kontraktion weniger wichtig. Entscheidend für die Wundheilung ist die Zellmigration und -proliferation [28]. Im gezeigten Modell minimiert das feste Aufspannen der Haut in der Rückenhautkammer die unerwünschte Wundkontraktion und fördert die Wundheilung durch Migration und Proliferation [79, 80]. Analog spannt sich das Trommelfell zwischen dem äußeren Gehörgang und den Gehörknöchelchen auf, während es keine kontraktilen Elemente aufweist (Abbildung 1). Der durchgreifende Hautdefekt in der Rückenhautkammer der Maus kann daher die Abhängigkeit von Proliferation und Zellmigration bei Trommelfelldefekten besonders gut simulieren.

Von den vier getesteten Präparationen war die symmetrische Perforation ohne Deckglas am besten geeignet. Die symmetrische Perforation ohne Deckglas war einfach durchzuführen und dauerte nur 10 Minuten. Die Narkosezeiten konnten somit begrenzt werden. Wichtig ist, dass die Perforationsgröße als primäre Zielgröße über 20 Tage hinweg konstant blieb und die Planimetrie am besten reproduzierbar war. Die symmetrische Perforation ohne Deckglas ist der persistierenden Trommelfellperforation auch am ähnlichsten. Wie bei der persistierenden Trommelfellperforation beim Menschen ist der Hautdefekt auf beiden Seiten von Luft umgeben.

Im Gegensatz dazu führte die geschlossene Präparation nach Aufbringen eines Deckglases und anschließende Befüllung der Rückenhautkammer mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer mäßigen (asymmetrische Perforation mit Deckglas) oder starken (symmetrische Perforation mit Deckglas) Verringerung der Defektgröße. Außerdem blieb nach dem Auflegen des Deckglases aufgrund der geschlossenen Kammer mehr Detritus zurück. Bei der Planimetrie wurde die Grenze des vitalen Gewebes zur Bestimmung des Durchmessers herangezogen und devitalisiertes Gewebe (Schorf/Detritus) wurde bei den Messungen nicht

berücksichtigt. Detritus erschwerte jedoch die genaue Bestimmung des vitalen Wundrandes. Dies spiegelt sich auch in den höheren Standardabweichungen für die geschlossenen Präparationen wider. In künftigen Experimenten könnte aber die nur vorübergehende Verwendung von Deckgläsern während der Intravitalmikroskpie den Detritus verringern und die Identifizierung des vitalen Wundrandes verbessern.

Bei der symmetrischen Perforation mit und ohne Deckglas wurde die Qualität der Intravitalmikroskopie zur Messung der funktionellen Kapillardichte im subkutanen Plexus durch die verbleibende Haut gemindert. Arteriolen und Venolen waren aber in einer tieferen Schicht sichtbar und dienten der Orientierung im Präparat und dem Wiederfinden der zuvor definierten Beobachtungsfelder. Die intakte Hautschicht schränkte jedoch die funktionellen Messungen und die Leukozytenquantifizierung ein. Die asymmetrische Perforation mit Deckglas zeigte die für die Rückenhautkammer der Maus charakteristische intravitalmikroskopische Qualität und ermöglichte die Quantifizierung funktioneller mikrovaskulärer Parameter und die Visualisierung von Leukozyten. Potenziell störender Detritus wurde innerhalb der Perforation lokalisiert, jedoch nicht im mikrochirurgisch präparierten Bereich für die Intravitalmikroskopie. In Anbetracht der mäßigen spontanen Defektschrumpfung und der Detritusablagerung kann die asymmetrische Perforation mit Deckglas bei speziellen wissenschaftlichen Fragestellungen eine Alternative sein, wenn die Analyse der Mikrozirkulation und Leukozytenmigration und -diapedese zur Messung der Inflammation die primäre Endgröße darstellen und die Defektgröße sekundär ist.

Die asymmetrische Perforation ohne Deckglas und die symmetrische Perforation mit Deckglas waren als Trommelfellperforationsmodelle nicht geeignet. Die asymmetrische Perforation ohne Deckglas war aufgrund der freiliegenden Faszie und Mikrogefäße des Musculus panniculus carnosus anfällig für Kontaminationen, Infektionen und Nekrosen. Die symmetrische Perforation mit Deckglas war der asymmetrischen Perforation mit Deckglas in der Intravitalmikroskopie sowie der symmetrischen Perforation ohne Deckglas in der spontanen Defektschrumpfung unterlegen. Die Defektschrumpfung bei der symmetrischen und asymmetrischen Perforation mit Deckglas könnte jedoch auf das Potenzial der feuchten Wundheilung für epithelisierte Defekte am Trommelfell hinweisen. Auch beim Menschen wurde für Trommelfellperforationen eine positive Korrelation von Spontanverschlüssen bei feuchten und blutigen Trommelfelldefekten beschrieben [72, 73].

Die Defektgröße ist das übliche primäre Endergebnis bei Wundheilungstests. Bei keiner Präparation kam es zu einer nennenswerten Defektschrumpfung aufgrund von Kontraktion. Allerdings kam es zur einer Defektverkleinerung durch Detritus in den Präparationen mit

Deckglas. Die symmetrische Präparation ohne Deckglas liefert die besten Ergebnisse in Bezug auf die Standardabweichung und der Defektvisualisierung und ist den anderen Präparationsarten in diesem Punkt überlegen. Daher sollte in zukünftigen Studien diese Präparation zur Anwendung kommen (zum Beispiel vier Gruppen mit n = 8; für einen relevanten Unterschied von 20 %, F-Test -ANOVA).

Die intravitalmikroskopischen Messungen der Kapillardichte zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen (symmetrische Perforation, symmetrische Perforation mit Deckglas- und asymmetrische Perforation mit Deckglas) und zwischen zentralen und peripheren Beobachtungsfeldern. Frühere Studien der Rückenhautkammer der Maus weisen aber im Gegensatz dazu charakteristische mikrovaskuläre Veränderungen auf. Hier kommt es zur Bildung von zirkulären und radialen Gefäßen an der Wundgrenze [107]. Bei diesen Studien wurde die Wunde aber nicht durch beide Hautschichten der Rückenhautkammer gestanzt. Daher stand ein großflächiges Wundbett zur Verfügung, das ausreichend Zytokine lieferte. Die Wundheilung konnte somit die physiologischen Phasen der Entzündung und Proliferation durchlaufen. Die Rückenhautkammer der Maus als Modell der persistierenden Trommelfellperforation weist aber eine andere Pathologie auf. Das Wundbett ist auf den schmalen Rand der Perforation beschränkt. Der Wunde fehlt somit die wesentliche Unterstützung für die Zellmigration und die Zytokinversorgung. Beide sind wesentlich für die charakteristischen mikrovaskulären Veränderungen der physiologischen Wundheilung. Die geringe CAE/Ki-67-Expression in der Immunhistologie bestätigt die geringe mikrovaskuläre Wundheilungsaktivität ebenfalls.

Der Schlüssel zur pathologischen Wundheilung der persistierenden Trommelfellperforation ist die Verkürzung der Wundheilungsphasen Inflammation und Proliferation durch Verschluss des Defektrandes mit Plattenepithel. Dieser Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. In der Immunhistologie zeigte sich nur eine geringe Immuninfiltration und Proliferation. Die geringe Zytokinversorgung verkürzt die Proliferations- und Entzündungsphase der Wundheilung. In zukünftigen Studien könnten Wundauflagen mit einer sequenziellen Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren die Wundheilungsphasen der Inflammation und Proliferation verlängern.

7.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN

Für die *in-vivo*-Versuche wurden haarlose SKH-1hr Mäuse verwendet. Diese Mäuse sind phänotypisch durch den Verlust des Haarkleides gekennzeichnet. Hierdurch sind sie besonders für das Modell der Rückenhautkammer der Maus geeignet. Die Wundheilung wird nicht durch nachwachsende Haare im Anschluss an die Rasur beeinflusst. Ein weiterer Vorteil ist die Minimierung der Anästhesiezeit während der Präparation. Im Allgemeinen eignet sich aber jede genetisch modifizierte Mäusespezies für Experimente mit der Rückenhautkammer. Im Gegensatz dazu sind die meisten orthotopen Modelle auf Wildtyp-Tiere beschränkt. Der unerwünschte Effekt der unterschiedlichen Wundheilung von Nagetieren (Wundkontraktion) im Vergleich zum Menschen (Zellmigration und Proliferation) konnte durch das Aufspannen der Haut minimiert werden. Obwohl Mäuse kleiner sind als die Tiere in orthotopen Trommelfellmodellen, entspricht der Durchmesser der Haut der Maus in der Rückenhautkammer mit 10 mm dem menschlichen Trommelfell [117]. Die Defektgröße kann mit unterschiedlichem Durchmesser der Hautbiopsiestanzen variiert werden. Wir präparierten die häufigste Defektgröße menschlicher Trommelfellperforationen (2-4 mm²) mit einer 2 mm-Stanze (= 3,14 mm²) [83].

Die Anästhesiedauer zur Präparation der Rückenhautkammer dauerte circa 45 Minuten. Die repetitive Intravitalmikroskopie und Planimetrie circa 30 Minuten. Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin und wurde insgesamt von den Versuchstieren gut vertragen. Es kam nur zu einem Ausfall aufgrund einer Narkosekomplikation, dennoch war die intraperitoneale Anästhesie schwierig zu steuern und die wiederholte Injektion stellt ein Risiko für die Versuchstiere dar. Eine Inhalationsnarkose kann in zukünftigen Versuchen die Steuerung der Narkose vereinfachen und die Belastung der Versuchstiere minimieren [26].

Die Präparation der Rückenhautkammer ist einfach durchzuführen und dauert 10 bis 20 min. Insbesondere die Präparation der symmetrischen Perforation ohne Deckglas erforderte keine aufwendige Präparation des M. panniculus carnosus und die Perforation der Rückenhaut mit der 2 mm Hautstanze führte zu einem definierten Defekt, der über die gesamte Beobachtungszeit von 20 Tagen konstant blieb. Andere Methoden der Rückenhautperforation könnten zu unregelmäßigen Wundrändern, zum Beispiel mit einem Skapell, oder zu einer gestörten Wundheilung, zum Beispiel mit einem Laser, führen. Der Hautdefekt war für die weiteren Untersuchungen (Planimetrie/Intravitalmikroskopie) gut zugänglich. Im Gegensatz dazu ist die mikroskopische Inspektion des Trommelfells

derzeitiger orthotoper Trommelfellmodelle durch den engen äußeren Gehörgang und das kleine Trommelfell der Versuchstiere erschwert [24, 44, 46, 78].

Weitere etablierte Mausmodelle wie das Ohrmodell der haarlosen Maus [81, 127, 128] und das Full-thickness splinted skin Modell [90, 97, 101] stehen zur Erforschung der Wundheilung zur Verfügung. Das Full-thickness splinted skin Modell ermöglicht aber keine Intravitalmikroskopie und das große Wundbett würde die pathologische Wundheilung der persistierenden Trommelfellperforation nicht simulieren können. Das Ohrmodell der haarlosen Maus könnte eine interessante Alternative darstellen. Allerdings ist hier zunächst der Beweis zu führen, dass bei einer Perforation analog zur Trommelfellperforation der Perforationsrand durch Plattenepithel überwuchert wird. Eine Fixierung von Wundauflagen ist im Gegensatz zur Rückenhautkammer nicht möglich. Des Weiteren ist die Qualität der Intravitalmikroskopie insbesondere bei Langzeituntersuchungen gemindert. Durch den Ohrknorpel könnte die pathologische Wundheilung des Trommelfells ggf. nicht ausreichend simuliert werden.

Obwohl das Modell der Rückenhautkammer mehrere wichtige Vorteile aufweist, gibt es aber auch erhebliche Einschränkungen. Als Hauptnachteile sind Belastungen für die Versuchstiere, Ausfälle und die begrenzte Beobachtungszeit zu nennen. Da die Titankammer mit einem Gewicht von 3,8 g auf dem Rücken der Mäuse fixiert ist, kippt die Kammer im Laufe der Zeit (ab Tag 10) zur Seite. Da das Kippen mit Immobilisierung, Schmerzen und Hautgeschwüren einhergeht, müssen bis zu 20 % der Versuche zwischen Tag 12 und 21 abgebrochen werden. Ein weiteres Problem, das mit dem Kippen der Kammer einhergeht, ist die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch Abknicken der Arterien und Venen der Rückenhaut [31]. Im Hinblick auf die Bedeutung von 3R (Replacement, Reduction, Refinement) zum Schutz des Tierwohls können aber bei der Rückenhautkammer der Maus die Versuchsgruppen durch die wiederholte Untersuchung desselben Tieres reduziert werden. Die Kammer exponiert die Wunde kontinuierlich. Somit ist für die wiederholte Intravitalmikroskopie kein weiterer chirurgischer Eingriff erforderlich. Fortschritte in der Herstellung der Rückenhautkammer aus Kunststoff können das Gewicht der Kammer und somit die Belastung der Versuchstiere weiter reduzieren und somit längere Versuchszeiten ermöglichen [123].

Die leichte Zugänglichkeit der Rückenhautkammer ermöglicht einen wiederholten Wechsel der Wundauflagen. Mögliche Trommelfellwundauflagen können nicht durch Nähen fixiert werden und müssen durch Adhäsion verbleiben. In der Rückenhautkammer kann die

Wundauflage unter einem Deckglas oder einer Gittereinlage fixiert werden, um eine Manipulation durch das Tier zu vermeiden (Abbildung 14).

Im Vergleich zu den derzeitigen orthotopen Trommelfellmodelle liegt ein weiterer Vorteil der Rückenhautkammer der Maus als neues Modell für die persistierende Trommelfellperforation in der repetitiven Intravitalmikroskopie nach Aufbringen einer Wundauflage. Die Vorteile der Präparation der Rückenhautkammer mit durchgreifendem Defekt sind die wiederholte Untersuchung der Wunde durch Planimetrie und Intravitalmikroskopie in einem gut etablierten Setup [59, 61, 79, 80, 107, 115]. Intravital- und konfokale Mikroskopie unter Verwendung von FITC-Dextran, Rhodamin 6G oder autofluoreszierenden Mäusen sind anerkannte Standards in der Wundheilungsforschung [59]. Verschiedene Software-Tools können die Quantifizierung von Mikrozirkulations- oder Entzündungsparametern durchführen. In dieser Studie kam die CapImage® Software (Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) zur Anwendung. Sie ermöglicht die Quantifizierung von Gefäßdurchmessern, Erythrozytengeschwindigkeit, funktioneller Kapillardichte, Flächenquantifizierung und Quantifizierung mikrovaskulärer Leckagen durch intra- und extravaskuläre Graustufenwerte. Diese Software wird bereits seit mehreren Jahren eingesetzt, doch fehlt eine automatisierte Analyse. Hochentwickelte Programme nutzen künstliche Intelligenz zur automatischen Bewertung von Gefäßparametern. In diesem Zusammenhang stehen Open-Source-Programme wie ImageJ [92] oder Matlab [13] zur Verfügung, mit denen Kapillardichte, Gefäßdurchmesser und andere mikrovaskuläre Parameter schnell, zeitsparend und zuverlässig bewertet werden können.

Nach Fixierung mit Formalin wurden die Präparate der Rückenhautkammer in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin gefärbt. Die Inflammation wurde mit CAE (Leukozytenfärbung) und F4/80 (Makrophagenfärbung) sichtbar gemacht. Die Proliferation wurde mit Ki-67 dargestellt. In allen Präparationen überwucherte Plattenepithel den Defektrand. Die gehemmte Wundheilung konnte durch die niedrige CAE und Ki-67 Expression dargestellt werden. Die histologische Aufarbeitung des entnommenen Hautgewebes der Rückenhaukammer der Maus ermöglicht prinzipiell alle gängigen immunhistologischen Untersuchungen. Diese können in zukünftigen Versuchen Anwendung finden, um spezielle Fragegestellungen der Biomaterial-Wund-Interaktion zu beantworten. Bekannt ist, dass Wundauflagen zu einer Granulationsbildung führen. Um Granulationen besser von Detritus differenzieren zu können, könnten zum Beispiel abgestorbene Zellen mit Caspase-3 Antikörpern in der Immunhistologie sichtbar gemacht werden [93].

7.2 LIMITATIONEN

Der Rückenhautkammer der Maus hat jedoch als Trommelfellmodell einige Einschränkungen. Der histologische Aufbau des jeweiligen Gewebes unterscheidet sich deutlich (Abbildung 4): Das Trommelfell ist mit 100 µm außerordentlich dünn, um eine gute Schallübertragung zu gewährleisten. Die Doppelhautfalte der Rückenhautkammer hat einen Querschnitt von bis zu 600 µm. Da die Wundfläche einer kreisförmigen Perforation der Mantelfläche eines Zylinders entspricht, hängt sie vom Durchmesser und der Dicke des Hautdefekts ab. Bei einem Defektdurchmesser von 2 mm beträgt die Wundfläche des Trommelfells 0,63 mm² und die Wundfläche der Rückenhautkammer 3,77 mm². Obwohl die größere Wundfläche der Rückenhautkammer eine bessere Unterstützung für die Proliferation und damit den Defektverschluss bieten kann, haben HE- und Immunhistologie die gleiche pathologische Wundheilung analog der persistierenden Trommelfellperforation gezeigt: die vorzeitige Epithelisierung des Defektrandes durch eine verminderte Inflammation und Proliferation.

Histologisch gesehen besteht die Rückenhautkammer der Maus aus zwei gegenüberliegenden Hautschichten mit einer gut vaskularisierten Lamina propria und dem M. panniculus carnosus. Der wichtigste Wundheilungsmechanismus in der Rückenhautkammer ist die Proliferation und Migration von Plattenepithel- und subepithelialen Zellen. Das Trommelfell trägt ein flaches, schwach verhornendes Plattenepithel auf der Seite des äußeren Gehörgangs und ein respiratorisches Epithel auf der Seite des Mittelohrs. Beide Schichten sind durch zwei Schichten von Kollagenfasern (radiär und zirkulär) sowie die jeweilige Lamina propria (mit geringer Vaskularisierung) getrennt. Das respiratorische Epithel des Trommelfells spielt bei der Epithelisierung eine untergeordnete Rolle, da die Proliferation im Vergleich zum Plattenepithel geringer ist [5, 27, 49]. Daher verschließt das Plattenepithel den Perforationsrand und unterbricht den Verschluss der Trommelfellperforation. In der Rückenhautkammer erfolgt die Epithelisierung des Defektrandes trotz der größeren Wundfläche und der günstigeren Wundverhältnisse vergleichbar - ohne dass es zum Verschluss der Wunde kommt. Die durchgreifende Perforation der Rückenhautkammer der Maus kann daher die Hauptpathologie der persistierenden Trommelfellperforation darstellen: Das Ungleichgewicht zwischen der Größe der Perforation und der Größe der tatsächlich freiliegenden subepithelialen Gewebes.

Eine offensichtliche Einschränkung sind die unterschiedlichen Umgebungsverhältnisse des Trommelfells und der Rückenhautkammer - mit spezifischer Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Das intakte Trommelfell trennt das Mittelohr vom äußeren Gehörgang. Das Trommelfell hat

eine Temperatur von ~37,3°C (Körperkerntemperatur) und die Luftfeuchtigkeit im menschlichen Gehörgang beträgt 50% (±10%) [32]. Im Vergleich dazu ist die Hauttemperatur der Maus mit 33°C niedriger, während die relative Luftfeuchtigkeit von 40-65% in der Labortierhaltung gleich ist. Nach Aufbringen einer Wundauflage auf der dem Gehörgang zugewandten Seite des Trommelfells ist die Perforation jedoch nur der feuchten und warmen Luft des Mittelohrs ausgesetzt. Dies kann für die Wundheilung im Vergleich zur offenen Präparation der Rückenhautkammer von Vorteil sein. Auch wenn Luftfeuchtigkeit und Temperatur bei der Wundheilung eine untergeordnete Rolle spielen, bleibt das Fehlen des spezifischen Mikroklimas des Ohrs eine Einschränkung dieses Modells. Dennoch ist die Rückenhautkammer der Maus seit jeher ein heterotopes Modell für die Wundheilung, Thrombogenese, Tumortherapie und Biomaterialintegration. In dieser künstlichen Umgebung hat die standardisierte, wiederholte und intravitale Visualisierung der verschiedenen Pathophysiologie bereits viele wertvolle Ergebnisse geliefert [59, 61, 107].

Eine weitere Einschränkung der Rückenhautkammer ist die Beschränkung auf maximal 21 Untersuchungstage. Die Rückenhautkammer kippt zwischen 10 und 21 Tagen zur Seite. Das Kippen verursacht bei den Tieren Stress durch Schmerzen und Bewegungseinschränkung. Das Abknicken der eintretenden Gefäße in die Rückenhautkammer vermindert die Blutversorgung. Orthotope Trommelfellmodelle weisen zwar eine hohe Spontanverschlussrate auf, ermöglichen aber eine Langzeitbeobachtung nach persistierender Perforation. Der Beobachtungszeitraum der Rückenhautkammer der Maus deckt jedoch den Übergang zwischen Entzündung und Proliferation bei der Wundheilung ab. Dieser Übergang ist entscheidend für die Wundheilung, erfordert spezifische Zell-Mediator-Interaktionen und ist prädisponierend für den langfristigen Verlauf für die Wundheilung [56, 108]. Längere Versuchszeiten könnten durch die Verwendung neuer, leichterer Materialien der Rückenhautkammer möglich sein [123].

Weiterhin muss bei allen Experimenten der Rückenhautkammer der Maus eine moderate Belastung für die Tiere durch Operation, körperliche Belastung und wiederholte Anästhesie in Betracht gezogen werden. In dieser Studie waren die Drop-outs vergleichsweise hoch: Bei der symmetrischen Perforation ohne Deckglas und der asymmetrischen Perforation mit Deckglas fiel eines von fünf Tieren vor Tag 20 aus (Anästhesiekomplikation an Tag 0 und > 90° Kammerneigung an Tag 15). Die Beobachtungszeit von 20 Tagen nach der Präparation der Rückenhautkammer ist im Vergleich zu früheren Experimenten lang. Ein Drop-out von 10-20 % ist zu planen. Das Kippen der Kammer in der zweiten und dritten Woche, das für die meisten Drop-outs verantwortlich war, kann in zukünftigen Experimenten durch leichtere Kammern deutlich minimiert werden [123].

7.3 SCHLUSSFOLGERUNG

Auf dem Gebiet der Trommelfellperforation haben orthotope Modelle Fortschritte bei der Kontrolle des Spontanverschlusses gemacht. Im Wesentlichen fehlt es ihnen aber an einer wiederholten Visualisierung der Kontaktstelle zwischen Wunde und Biomaterial. Daher wird ein präklinisches Modell benötigt, das ein standardisiertes Screening von vielversprechenden Biomaterialien ermöglicht. Die Rückenhautkammer der Maus mit einem durchgreifenden Defekt stellt hier ein wertvolles Instrument zur Optimierung von Trägermaterialien mit sequenzieller Freisetzung von Inflammation und Proliferation fördernden Faktoren zur Abschwächung der vorzeitigen Epithelisierung bei der Wundheilung des Trommelfells dar. Das vorgestellte Modell könnte daher zu einem Standardmodell werden, um Fortschritte im Tissue Engineering auf die Trommelfellregeneration zu übertragen. In der Folge können wirksame Biomaterialien gezielt in orthotopen Modellen und in klinischen Studien evaluiert werden. Die künftige standardisierte Entwicklung wirksamer Trommelfellwundauflagen könnte chronische Perforationen und mikroskopische Myringoplastiken bei ausgewählten Patienten verhindern.

VIII. AUSBLICK

Die Präparation der Rückenhautkammer mit einem durchgreifenden Defekt eignet sich für zukünftige Untersuchung geeigneter bioaktiver Wundauflagen mit spezifischer Architektur und Wirkstofffreisetzung (Abbildung 14). Auf diesem Modell aufbauend können Wundauflagen auf die Vorderseite der Perforation gelegt werden. Die Manipulation der Wundauflage durch die Versuchstiere wird durch das Anbringen eines Gitters verhindert. Die Wundränder der Perforation bleiben für die Intravitalmikroskopie auf der Rückseite der Perforation frei zugänglich und können repetitiv auf Inflammation, Proliferation und Defektgröße untersucht werden. Diese Modifikation der Rückenhautkammer ermöglicht eine repetitive, standardisierte Untersuchung neuer Wundauflagen für die persistierende Trommelfellperforation.

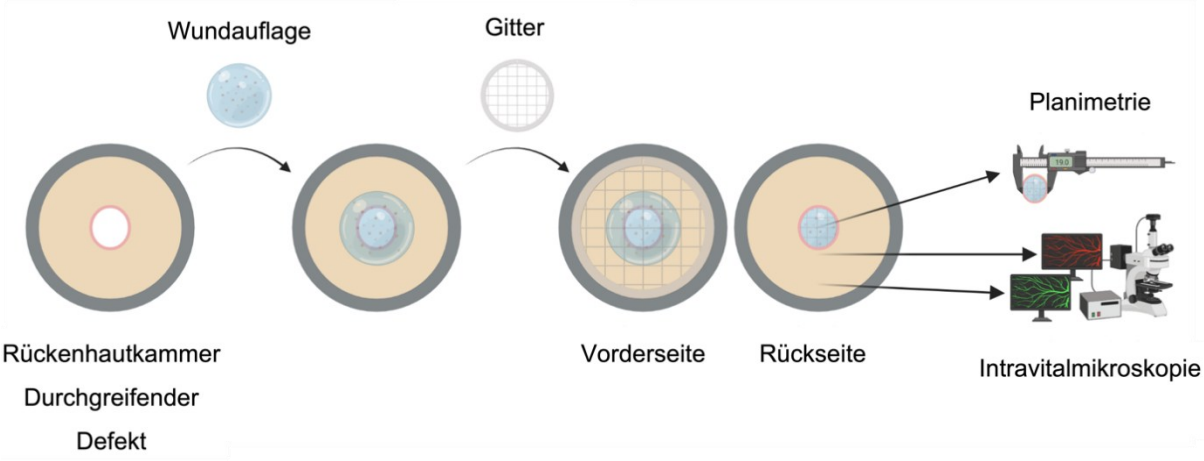

Abbildung 14: Zukünftige Anwendung des Modells zur Untersuchung der Wirkung bioaktiver Wundauflagen auf epithelisierten Wunden. Wundauflagen werden auf die Vorderseite der Perforation aufgebracht. Die Manipulation der Wundauflage durch die Versuchstiere kann durch Anbringen eines Gitters oder eines Deckblatts verhindert werden. Nach der Applikation des Biomaterials bleiben die Wundränder für die Planimetrie und die Intravitalmikroskopie von der Rückseite her zugänglich. Die Intravitalmikroskopie kann in zentralen Bereichen (unter dem Einfluss des Biomaterials, rot) und in peripheren Bereichen (außerhalb des Biomaterials, grün) durchgeführt werden.

IX. ZEHN THESEN ZUR DISSERTATION

- Aufgrund eines Missverhältnisses von Defktgröße und Wundfläche kommt es bei persistierenden Trommelfellperforation zur einer vorzeitigen Epithelisierung des Defektrandes. Der Wundschluss wird unterbrochen.
- Derzeitige Wundheilungsmodelle sind unzureichend für die Erlangung profunder Kenntnisse über die Auswirkung moderner Wundauflagen auf die spezielle Pathophysiologie persistierender Trommelfellperforationen.
- Die Rückenhautkammer der Maus als etabliertes Wundheilungsmodell kann als neues Modell zur repetitiven Untersuchung der pathologischen Wundheilung der Trommelfellperforation dienen.
- Hierzu wurden die vorzeitige Epithelisierung der Wundränder, der Ausschluss einer spontanen Defektschrumpfung, die Visualisierung der Inflammation und Angiogenese am Wundrand sowie die Möglichkeit zur repetitiven intravitalen Mikroskopie evaluiert.
- In allen Versuchsgruppen wurde der Defektrand von verhornenden Plattenepithel überwuchert.
- Das Aufbringen eines Deckglases führt zu einer Verkleinerung des Defektes.
- Alle Rückenhautkammerpräparate ermöglichten eine wiederholte Intravitalmikroskopie und Messung der Kapillardichte. Die intravitale Visualisierung der Leukozytenmigration erforderte die Exposition des subkutanen Gefäßplexus.
- In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rückenhautkammer der Maus die Schlüsselelemente der pathologischen Wundheilung der persistierenden Trommelfellperforation widerspiegelt.
- Das modifizierte Wundheilungsmodell der Rückenhautkammer der Maus bietet eine effektive Plattform für das Screening bioaktiver Materialien für die speziellen Bedingungen der pathologischen Wundheilung persistierender Trommelfellperforationen.
- Das vorgestellte Modell könnte zu einem Standardmodell werden, um Fortschritte im Tissue Engineering auf die Trommelfellregeneration zu übertragen. In der Folge können wirksame Biomaterialien gezielt in orthotopen Modellen und in klinischen Studien evaluiert werden.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abaci HE, Guo Z, Doucet Y, Jacków J, Christiano A (2017) Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. Exp Biol Med (Maywood) 242(17):1657–1668. doi:10.1177/1535370217712690
2. Aksoy MA, Acikalin MF, Gurbuz MK, Ozudogru EN, Canaz F, Kaya E, Pinarbasli MO, Incesulu A, Cakli H, Cingi C (2018) Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Fat Grafts in the Repair of Tympanic Membrane Perforations: An Experimental Study. Int Adv Otol:58–62. doi:10.5152/iao.2017.3845
3. Allen Yu-Yu Wang Creating Chronic Tympanic Membrane Perforations in a Rat Model. The University of Western Australia
4. Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H, Kelly KE, Cao K (1992) An animal model of chronic tympanic membrane perforation. Otolaryngol Head Neck Surg 106(1):47–55. doi:10.1177/019459989210600127
5. Araújo MM de, Murashima AAB, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA (2014) Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. Braz J Otorhinolaryngol 80(4):330–338. doi:10.1016/j.bjorl.2014.05.014
6. Baltazar T, Merola J, Catarino C, Xie CB, Kirkiles-Smith NC, Lee V, Hotta S, Dai G, Xu X, Ferreira FC, Saltzman WM, Pober JS, Karande P (2020) Three Dimensional Bioprinting of a Vascularized and Perfusable Skin Graft Using Human Keratinocytes, Fibroblasts, Pericytes, and Endothelial Cells. Tissue Eng Part A 26(5-6):227–238. doi:10.1089/ten.TEA.2019.0201
7. Begall K, Dorschner M, Vorwerk W, Vorwerk U, Dietzmann K (1998) Histologische Untersuchungen des Trommelfelldefektrandes bei der chronischen Otitis media mesotympanalis. HNO 46(8):748–752. doi:10.1007/s001060050305
8. Berger G (1989) Nature of spontaneous tympanic membrane perforation in acute otitis media in children. J Laryngol Otol 103(12):1150–1153. doi:10.1017/s0022215100111247
9. Berger G, Finkelstein Y, Harell M (1994) Non-explosive blast injury of the ear. J Laryngol Otol 108(5):395–398. doi:10.1017/s002221510012688x
10. Berger G, Finkelstein Y, Avraham S, Himmelfarb M (1997) Patterns of hearing loss in non-explosive blast injury of the ear. J Laryngol Otol 111(12):1137–1141. doi:10.1017/s0022215100139544
11. Berman S (1995) Otitis media in developing countries. Pediatrics 96(1 Pt 1):126–131
12. Bhutta MF, Thornton RB, Kirkham L-AS, Kerschner JE, Cheeseman MT (2017) Understanding the aetiology and resolution of chronic otitis media from animal and human studies. Dis Model Mech 10(11):1289–1300. doi:10.1242/dmm.029983

13. Biel NM, Lee JA, Sorg BS, Siemann DW (2014) Limitations of the dorsal skinfold window chamber model in evaluating anti-angiogenic therapy during early phase of angiogenesis. Vasc Cell 6:17. doi:10.1186/2045-824X-6-17
14. Biglari S, Le TYL, Tan RP, Wise SG, Zambon A, Codolo G, Bernard M de, Warkiani M, Schindeler A, Naficy S, Valtchev P, Khademhosseini A, Dehghani F (2019) Simulating Inflammation in a Wound Microenvironment Using a Dermal Wound-on-a-Chip Model. Adv Healthc Mater 8(1):e1801307. doi:10.1002/adhm.201801307
15. Branica S, Dawidowsky K, Kovač-Bilić L, Bilić M (2019) Silicon foil patching for blast tympanic membrane perforation: a retrospective study. Croat Med J 60(6):503–507. doi:10.3325/cmj.2019.60.503
16. Buganza Tepole A, Kuhl E (2013) Systems-based approaches toward wound healing. Pediatr Res 73(4 Pt 2):553–563. doi:10.1038/pr.2013.3
17. Camnitz PS, Bost WS (1985) Traumatic Perforations of the Tympanic Membrane: Early Closure with Paper Tape Patching. Otolaryngol Head Neck Surg 93(2):220–223. doi:10.1177/019459988509300217
18. Chung JH, Lee SH, Woo S-Y, Kim SW, Cho Y-S (2016) Prevalence and associated factors of chronic suppurative otitis media: Data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2009-2012. Laryngoscope 126(10):2351–2357. doi:10.1002/lary.25981
19. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. (2020) Chronisch mesotympanale Otitis media (CMOM). S2K-Leitlinie. https://register.awmf.org/assets/guidelines/017-074l_S2k_Chronisch-mesotympanale-Otitis-media_2020-11_01.pdf
20. Dirain CO, Kosko B, Antonelli PJ (2018) Effects of Common Ear Drops on Tympanic Membrane Healing in Rats. Otolaryngol Head Neck Surg 158(5):917–922. doi:10.1177/0194599818757972
21. Dubey SP, Larawin V (2007) Complications of Chronic Suppurative Otitis Media and Their Management. Laryngoscope 117(2):264–267. doi:10.1097/01.mlg.0000249728.48588.22
22. Effat KG (2005) Results of inlay cartilage myringoplasty in terms of closure of central tympanic membrane perforations. J Laryngol Otol 119(8):611–613. doi:10.1258/0022215054516188
23. Ehrmantraut S, Naumann A, Willnecker V, Akinyemi S, Körbel C, Scheuer C, Meyer-Lindenberg A, Menger MD, Laschke MW (2012) Vitalization of porous polyethylene (Medpor®) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. Tissue Eng Part A 18(15-16):1562–1572. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0340

24. Emami N, Schloss MD, Daniel SJ (2014) Chronic tympanic membrane perforation in an animal model. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 78(8):1250–1252. doi:10.1016/j.ijporl.2014.04.042
25. Esteban T, Atucha NM, Moraleda JM, García-Estañ J, Insausti CL, Moraleda-Deleyto J (2019) Chronic model of tympanic perforation in rats with mitomycin C and dexamethasone. J Otol 14(1):12–16. doi:10.1016/j.joto.2018.11.002
26. Flecknell PA (2009) Chapter 2 - Anaesthesia. In: Flecknell PA (Hrsg) Laboratory Animal Anaesthesia (Third Edition). Academic Press, San Diego, S 19–78
27. Frumm SM, Yu SK, Chang J, Artichoker JA, Scaria SM, Lee KP, Byrnes LE, Sneddon JB, Tward AD (2021) A Hierarchy of Proliferative and Migratory Keratinocytes Maintains the Tympanic Membrane. Cell Stem Cell 28(2):315-330.e5. doi:10.1016/j.stem.2020.10.006
28. Galiano RD, Michaels J, 5th., Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC (2004) Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. Wound Repair Regen 12(4):485–492. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
29. Gao T, Li X, Hu J, Ma W, Li J, Shao N, Wang Z (2017) Management of traumatic tympanic membrane perforation: a comparative study. Ther Clin Risk Manag 13:927–931. doi:10.2147/TCRM.S139631
30. Golz A (2003) Paper patching for chronic tympanic membrane perforations. Otolaryngol Head Neck Surg 128(4):565–570. doi:10.1016/S0194-5998(03)00124-4
31. Grambow E, Sorg H, Sorg CGG, Strüder D (2021) Experimental Models to Study Skin Wound Healing with a Focus on Angiogenesis. Med Sci (Basel) 9(3). doi:10.3390/medsci9030055
32. Gray RF, Sharma A, Vowler SL (2005) Relative humidity of the external auditory canal in normal and abnormal ears, and its pathogenic effect. Clin Otolaryngol 30(2):105–111. doi:10.1111/j.1365-2273.2004.00950.x
33. Groeber F, Engelhardt L, Lange J, Kurdyn S, Schmid FF, Rücker C, Mielke S, Walles H, Hansmann J (2016) A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation. ALTEX 33(4):415–422. doi:10.14573/altex.1604041
34. Guerra A, Belinha J, Jorge RN (2018) Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. J Theor Biol 459:1–17. doi:10.1016/j.jtbi.2018.09.020
35. Günday C, Anand S, Gencer HB, Munafò S, Moroni L, Fusco A, Donnarumma G, Ricci C, Hatir PC, Türeli NG, Türeli AE, Mota C, Danti S (2020) Ciprofloxacin-loaded polymeric nanoparticles incorporated electrospun fibers for drug delivery in tissue engineering applications. Drug Deliv Transl Res 10(3):706–720. doi:10.1007/s13346-020-00736-1
36. Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, Okanoue Y, Hiwatashi N, Wada T (2010) Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen

for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. Otol Neurotol 31(1):118–121. doi:10.1097/MAO.0b013e3181c34f01

37. Hempel JM, Becker A, Müller J, Krause E, Berghaus A, Braun T (2012) Traumatic tympanic membrane perforations: clinical and audiometric findings in 198 patients. Otol Neurotol 33(8):1357–1362. doi:10.1097/MAO.0b013e31826939b5
38. Hong P, Bance M, Gratzer PF (2013) Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of experimental and tissue engineering studies. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 77(1):3–12. doi:10.1016/j.ijporl.2012.09.022
39. Hüttenbrink KB (2005) Treatment of an acute tympanic membrane perforation with EGF releasing film. HNO 53(6):515–516. doi:10.1007/s00106-005-1274-6
40. Ibekwe TS, Ijaduola GTA, Nwaorgu OGB (2007) Tympanic membrane perforation among adults in West Africa. Otol Neurotol 28(3):348–352. doi:10.1097/MAO.0b013e3180311605
41. Jang CH, Cho YB, Yeo M, Lee H, Min EJ, Lee BH, Kim GH (2013) Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using 3D collagen with topical umbilical cord serum. Int J Biol Macromol 62:232–240. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.08.049
42. Jassir D (2003) Dose-response relationship of topically applied mitomycin C for the prevention of laser myringotomy closure. Otolaryngology - Head and Neck Surgery 129(5):471–474. doi:10.1016/S0194-5998(03)01394-9
43. Jung JY, Yun H-C, Kim T-M, Joo JW, Song IS, Rah YC, Chang J, Im GJ, Choi J (2017) Analysis of Effect of Eggshell Membrane Patching for Moderate-to-Large Traumatic Tympanic Membrane Perforation. J Audiol Otol 21(1):39–43. doi:10.7874/jao.2017.21.1.39
44. Kaftan H, Hosemann W, Junghans D, Göpferich A, Schindler E, Beule A (2005) Traumatic tympanic membrane perforactions. Local application of an alginate matrix loaded with epidermal growth factor in an animal model. HNO 53(6):539-42, 544-5. doi:10.1007/s00106-004-1126-9
45. Kaftan H, Noack M, Friedrich N, Völzke H, Hosemann W (2008) Prävalenz chronischer Trommelfellperforationen in der erwachsenen Bevölkerung. HNO 56(2):145–150. doi:10.1007/s00106-007-1574-0
46. Kaftan H, Reuther L, Miehe B, Hosemann W, Beule A (2012) Inhibition of fibroblast growth factor receptor 1: influence on tympanic membrane wound healing in rats. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 269(1):87–92. doi:10.1007/s00405-011-1627-6
47. Khiao In M, Wallmeyer L, Hedtrich S, Richardson KC, Plendl J, Kaessmeyer S (2015) The effect of endothelialization on the epidermal differentiation in human three-

dimensional skin constructs - A morphological study. Clin Hemorheol Microcirc 61(2):157–174. doi:10.3233/CH-151988

48. Klein M, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD, Garcia P (2017) Mechanical and biological characterization of alkaline substituted orthophosphate bone substitutes containing meta- and diphosphates. Biomed Mater 12(5):55007. doi:10.1088/1748-605X/aa7e80
49. Koba R (1995) Epidermal cell migration and healing of the tympanic membrane: an immunohistochemical study of cell proliferation using bromodeoxyuridine labeling. Ann Otol Rhinol Laryngol 104(3):218–225. doi:10.1177/000348949510400307
50. Kowalski PS, Bhattacharya C, Afewerki S, Langer R (2018) Smart Biomaterials: Recent Advances and Future Directions. ACS Biomater Sci Eng 4(11):3809–3817. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00889
51. Kozin ED, Black NL, Cheng JT, Cotler MJ, McKenna MJ, Lee DJ, Lewis JA, Rosowski JJ, Remenschneider AK (2016) Design, fabrication, and in vitro testing of novel three-dimensionally printed tympanic membrane grafts. Hear Res 340:191–203. doi:10.1016/j.heares.2016.03.005
52. Kraus F, Hagen R (2015) The Traumatic Tympanic Membrane Perforation - Aetiology and Therapy. Laryngorhinootologie 94(9):596–600. doi:10.1055/s-0034-1395522
53. Kuo C-Y, Wilson E, Fuson A, Gandhi N, Monfaredi R, Jenkins A, Romero M, Santoro M, Fisher JP, Cleary K, Reilly B (2018) Repair of Tympanic Membrane Perforations with Customized Bioprinted Ear Grafts Using Chinchilla Models. Tissue Eng Part A 24(5-6):527–535. doi:10.1089/ten.TEA.2017.0246
54. Kwak BS, Jin S-P, Kim SJ, Kim EJ, Chung JH, Sung JH (2020) Microfluidic skin chip with vasculature for recapitulating the immune response of the skin tissue. Biotechnol Bioeng 117(6):1853–1863. doi:10.1002/bit.27320
55. Kwong KM, Smith MM, Coticchia JM (2012) Fat graft myringoplasty using umbilical fat. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 76(8):1098–1101. doi:10.1016/j.ijporl.2012.04.007
56. Landén NX, Li D, Ståhle M (2016) Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cell Mol Life Sci 73(20):3861–3885. doi:10.1007/s00018-016-2268-0
57. Langston M, Grobman A, Goncalves S, Angeli SI (2020) Animal Model of Chronic Tympanic Membrane Perforation. Anat Rec (Hoboken) 303(3):619–625. doi:10.1002/ar.24220
58. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD (2007) Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 82(2):494–505. doi:10.1002/jbm.b.30755

59. Laschke MW, Menger MD (2016) The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. Eur Cell Mater 32:202–215. doi:10.22203/eCM.v032a13
60. Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D (2010) In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. Acta Biomater 6(6):2020–2027. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.004
61. Laschke MW, Vollmar, Menger MD (2011) The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. eCM 22:147–167. doi:10.22203/eCM.v022a12
62. Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD (2012) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. Eur Cell Mater 24:266–277. doi:10.22203/ecm.v024a19
63. Laschke MW, Schank TE, Scheuer C, Kleer S, Schuler S, Metzger W, Eglin D, Alini M, Menger MD (2013) Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. Acta Biomater 9(6):6876–6884. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.013
64. Laschke MW, Augustin VA, Sahin F, Anschütz D, Metzger W, Scheuer C, Bischoff M, Aktas C, Menger MD (2016) Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor(®)) implants. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 104(8):1738–1748. doi:10.1002/jbm.b.33528
65. Lee MC, Seonwoo H, Garg P, Jang KJ, Pandey S, Park SB, Kim HB, Lim J, Choung YH, Chung JH (2018) Chitosan/PEI patch releasing EGF and the EGFR gene for the regeneration of the tympanic membrane after perforation. Biomater Sci 6(2):364–371. doi:10.1039/c7bm01061c
66. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. Am J Pathol 143(4):1055–1062
67. Lenarz T, Boenninghaus H-G (Hrsg) (2012) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
68. Lindeman P, Edström S, Granström G, Jacobsson S, Sydow C von, Westin T, Åberg B (1987) Acute Traumatic Tympanic Membrane Perforations: Cover or Observe? Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113(12):1285–1287. doi:10.1001/archotol.1987.01860120031002
69. Lindhorst D, Tavassol F, See C von, Schumann P, Laschke MW, Harder Y, Bormann K-H, Essig H, Kokemüller H, Kampmann A, Voss A, Mülhaupt R, Menger MD, Gellrich N-C,

Rücker M (2010) Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization. J Biomed Mater Res A 95(3):783–792. doi:10.1002/jbm.a.32902

70. Lothar Koch, Stefanie Kuhn, Heiko Sorg, Martin Gruene, Sabrina Schlie, Ralf Gaebel, Bianca Polchow, Kerstin Reimers, Stephanie Stoelting, Nan Ma, Peter M. Vogt, Gustav Steinhoff, and Boris Chichkov untitled
71. Lou Z-C, He J-G (2011) A randomised controlled trial comparing spontaneous healing, gelfoam patching and edge-approximation plus gelfoam patching in traumatic tympanic membrane perforation with inverted or everted edges. Clinical Otolaryngology 36(3):221–226. doi:10.1111/j.1749-4486.2011.02319.x
72. Lou Z-C, Lou Z-H, Zhang Q-P (2012) Traumatic tympanic membrane perforations: a study of etiology and factors affecting outcome. Am J Otolaryngol 33(5):549–555. doi:10.1016/j.amjoto.2012.01.010
73. Lou ZC, Lou ZH (2017) A moist edge environment aids the regeneration of traumatic tympanic membrane perforations. J Laryngol Otol 131(7):564–571. doi:10.1017/S0022215117001001
74. Lou ZC (2019) Dose- and starting time-dependent effect of the application of EGF to the regeneration of traumatic eardrum. Acta Otolaryngol 139(12):1083–1089. doi:10.1080/00016489.2019.1667533
75. Maharajan N, Cho GW, Jang CH (2020) Application of mesenchymal stem cell for tympanic membrane regeneration by tissue engineering approach. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 133:109969. doi:10.1016/j.ijporl.2020.109969
76. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT (2020) Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. Biomaterials 226:119536. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119536
77. Matsuya K, Yura F, Mada J, Kurihara H, Tokihiro T (2016) A Discrete Mathematical Model for Angiogenesis. SIAM Journal on Applied Mathematics 76(6):2243–2259. doi:10.1137/15M1038773
78. McFeely WJ, Bojrab DI, Kartush JM (2000) Tympanic membrane perforation repair using AlloDerm. Otolaryngol Head Neck Surg 123(1 Pt 1):17–21. doi:10.1067/mhn.2000.105920
79. Michael S, Sorg H, Peck C-T, Reimers K, Vogt PM (2013) The mouse dorsal skin fold chamber as a means for the analysis of tissue engineered skin. Burns 39(1):82–88. doi:10.1016/j.burns.2012.05.010
80. Michael S, Sorg H, Peck C-T, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, Vogt PM, Reimers K (2013) Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. PLoS ONE 8(3):e57741. doi:10.1371/journal.pone.0057741

81. Mohammadi-Samani S, Kouroshfard S, Azarpira N (2016) Effects of phosphate supplementation on Pseudomonas aeruginosa invasive behavior in burn wound infections: A simple approach to a big problem. Burns 42(2):428–433. doi:10.1016/j.burns.2015.09.003
82. Monasta L, Ronfani L, Marchetti F, Montico M, Vecchi Brumatti L, Bavcar A, Grasso D, Barbiero C, Tamburlini G (2012) Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. PLoS ONE 7(4):e36226. doi:10.1371/journal.pone.0036226
83. Nahata V, Patil C, Gattani G, Disawal A, Patil R, Roy A (2014) Tympanic membrane perforation: Its correlation with hearing loss and frequency affected - An analytical study. Indian J Otol 20(1):10. doi:10.4103/0971-7749.129796
84. O'Connor KN, Tam M, Blevins NH, Puria S (2008) Tympanic membrane collagen fibers: A key to high-frequency sound conduction. Laryngoscope 118(3):483–490. doi:10.1097/MLG.0b013e31815b0d9f
85. Olsen L, Sherratt JA, Maini PK, Arnold F (1997) A mathematical model for the capillary endothelial cell-extracellular matrix interactions in wound-healing angiogenesis. IMA J Math Appl Med Biol 14(4):261–281
86. O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP (2001) Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. Otolaryngol Head Neck Surg 124(1):40–45. doi:10.1067/mhn.2001.112199
87. Orji FT, Agu CC (2008) Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. Clin Otolaryngol 33(5):420–426. doi:10.1111/j.1749-4486.2008.01764.x
88. Orji FT, Agu CC (2008) Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. Clin Otolaryngol 33(5):420–426. doi:10.1111/j.1749-4486.2008.01764.x
89. Park MK, Kim KH, Lee JD, Lee BD (2011) Repair of large traumatic tympanic membrane perforation with a Steri-Strips patch. Otolaryngol Head Neck Surg 145(4):581–585. doi:10.1177/0194599811409836
90. Pfister M, Schützenberger K, Schäfer BJ, Puchner S, Stegmann H, Hohenadl C, Mildner M, Garhöfer G, Schmetterer L, Werkmeister RM (2021) Optical Coherence Tomography Angiography Monitors Cutaneous Wound Healing under Angiogenesis-Promoting Treatment in Diabetic and Non-Diabetic Mice. Applied Sciences 11(5):2447. doi:10.3390/app11052447
91. Ponmozhi J, Dhinakaran S, Varga-Medveczky Z, Fónagy K, Bors LA, Iván K, Erdő F (2021) Development of Skin-On-A-Chip Platforms for Different Utilizations: Factors to Be Considered. Micromachines (Basel) 12(3). doi:10.3390/mi12030294

92. Remenschneider AK, Lookabaugh S, Aliphas A, Brodsky JR, Devaiah AK, Dagher W, Grundfast KM, Heman-Ackah SE, Rubin S, Sillman J, Tsai AC, Vecchiotti M, Kujawa SG, Lee DJ, Quesnel AM (2014) Otologic outcomes after blast injury: the Boston Marathon experience. Otol Neurotol 35(10):1825–1834. doi:10.1097/MAO.0000000000000616
93. Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich N-C, Menger MD (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. Biomaterials 27(29):5027–5038. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.033
94. Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mülhaupt R, Gellrich N-C, Menger MD (2008) Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. J Biomed Mater Res A 86(4):1002–1011. doi:10.1002/jbm.a.31722
95. Saeedi M, Ajalloueian M, Zare E, Taheri A, Yousefi J, Mirlohi SMJ, Aref NM, Saeedi MJ, Khosravi MH (2017) The Effect of PRP-enriched Gelfoam on Chronic Tympanic Membrane Perforation: A Double-blind Randomized Clinical Trial. Int Tinnitus J 21(2):108–111. doi:10.5935/0946-5448.20170021
96. Saito H, Kazama Y, Yazawa Y (1990) Simple maneuver for closing traumatic eardrum perforation by micropore strip tape patching. Am J Otol 11(6):427–430
97. Santos JAA, Da Silva JW, Dos Santos SM, Rodrigues MdF, Silva CJA, Da Silva MV, Correia MTS, Albuquerque JFC, Melo CML, Silva TG, Martins RD, Aguiar Júnior FCA, Ximenes RM (2020) In Vitro and In Vivo Wound Healing and Anti-Inflammatory Activities of Babassu Oil (Attalea speciosa Mart. Ex Spreng., Arecaceae). Evid Based Complement Alternat Med 2020:8858291. doi:10.1155/2020/8858291
98. Scianna M, Bassino E, Munaron L (2015) A cellular Potts model analyzing differentiated cell behavior during in vivo vascularization of a hypoxic tissue. Comput Biol Med 63:143–156. doi:10.1016/j.compbiomed.2015.05.020
99. Seonwoo H, Shin B, Jang K-J, Lee M, Choo O-S, Park S-B, Kim YC, Choi M-J, Kim J, Garg P, Jang JH, Choung Y-H, Chung JH (2019) Epidermal Growth Factor-Releasing Radially Aligned Electrospun Nanofibrous Patches for the Regeneration of Chronic Tympanic Membrane Perforations. Adv Healthc Mater 8(2):e1801160. doi:10.1002/adhm.201801160
100. Seonwoo H, Kim SW, Shin B, Jang K-J, Lee M, Choo O-S, Choi M-J, Kim J, Lim K-T, Jang JH, Chung JH, Choung Y-H (2019) Latent stem cell-stimulating therapy for regeneration of chronic tympanic membrane perforations using IGFBP2-releasing chitosan patch scaffolds. J Biomater Appl 34(2):198–207. doi:10.1177/0885328219845082

101. Shafiee A, Cavalcanti AS, Saidy NT, Schneidereit D, Friedrich O, Ravichandran A, De-Juan-Pardo EM, Hutmacher DW (2021) Convergence of 3D printed biomimetic wound dressings and adult stem cell therapy. Biomaterials 268:120558. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120558
102. Shaheen MM, Raquib A, Ahmad SM (2012) Prevalence and associated socio-demographic factors of chronic suppurative otitis media among rural primary school children of Bangladesh. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 76(8):1201–1204. doi:10.1016/j.ijporl.2012.05.006
103. Shen Y, Redmond SL, Teh BM, Yan S, Wang Y, Zhou L, Budgeon CA, Eikelboom RH, Atlas MD, Dilley RJ, Zheng M, Marano RJ (2013) Scaffolds for tympanic membrane regeneration in rats. Tissue Eng Part A 19(5-6):657–668. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0053
104. Shen Y, Redmond SL, Teh BM, Yan S, Wang Y, Atlas MD, Dilley RJ, Zheng M, Marano RJ (2013) Tympanic membrane repair using silk fibroin and acellular collagen scaffolds. Laryngoscope 123(8):1976–1982. doi:10.1002/lary.23940
105. Sherratt JA, Dallon JC (2002) Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. Comptes Rendus Biologies 325(5):557–564. doi:10.1016/S1631-0691(02)01464-6
106. Siegert R, Klingmann C, Di Martino E, Leuwer R, Schwager K, Reiß M, Keck T, Issing PR (2021) Erkrankungen des Mittelohrs. In: Reiß M (Hrsg) Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 331–365
107. Sorg H, Krueger C, Vollmar B (2007) Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. J Anat 211(6):810–818. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00822.x
108. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U (2017) Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. Eur Surg Res 58(1-2):81–94. doi:10.1159/000454919
109. Später T, Frueh FS, Metzger W, Menger MD, Laschke MW (2018) In vivo biocompatibility, vascularization, and incorporation of Integra® dermal regenerative template and flowable wound matrix. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 106(1):52–60. doi:10.1002/jbm.b.33813
110. Tavassol F, Schumann P, Lindhorst D, Sinikovic B, Voss A, See C von, Kampmann A, Bormann K-H, Carvalho C, Mülhaupt R, Harder Y, Laschke MW, Menger MD, Gellrich N-C, Rücker M (2010) Accelerated angiogenic host tissue response to poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds by vitalization with osteoblast-like cells. Tissue Eng Part A 16(7):2265–2279. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0457

111. Teh BM, Marano RJ, Shen Y, Friedland PL, Dilley RJ, Atlas MD (2013) Tissue engineering of the tympanic membrane. Tissue Eng Part B Rev 19(2):116–132. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0389
112. Truy E, Disant F, Morgon A (1995) Chronic tympanic membrane perforation: An animal model. American Journal of Otology 16(2):222–225
113. Ud-Din S, Bayat A (2017) Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. Wound Repair Regen 25(2):164–176. doi:10.1111/wrr.12513
114. Understanding the aetiology and resolution of chronic otitis media from animal and human studies
115. Ushiyama A, Yamada S, Ohkubo C (2004) Microcirculatory parameters measured in subcutaneous tissue of the mouse using a novel dorsal skinfold chamber. Microvasc Res 68(2):147–152. doi:10.1016/j.mvr.2004.05.004
116. Valero C, Javierre E, García-Aznar JM, Gómez-Benito MJ (2013) Numerical modelling of the angiogenesis process in wound contraction. Biomech Model Mechanobiol 12(2):349–360. doi:10.1007/s10237-012-0403-x
117. van der Jeught S, Dirckx JJJ, Aerts JRM, Bradu A, Podoleanu AGH, Buytaert JAN (2013) Full-field thickness distribution of human tympanic membrane obtained with optical coherence tomography. J Assoc Res Otolaryngol 14(4):483–494. doi:10.1007/s10162-013-0394-z
118. Villar-Fernandez MA, Lopez-Escamez JA (2015) Outlook for Tissue Engineering of the Tympanic Membrane. Audiol Res 5(1):117. doi:10.4081/audiores.2015.117
119. Wang AY, Shen Y, Wang JT, Friedland PL, Atlas MD, Dilley RJ (2014) Animal models of chronic tympanic membrane perforation: a 'time-out' to review evidence and standardize design. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 78(12):2048–2055. doi:10.1016/j.ijporl.2014.10.007
120. Wang AY, Shen Y, Liew LJ, Wang JT, Unge M von, Atlas MD, Dilley RJ (2016) Rat model of chronic tympanic membrane perforation: Ventilation tube with mitomycin C and dexamethasone. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 80:61–68. doi:10.1016/j.ijporl.2015.11.010
121. World Health Organization (2004) Chronic suppurative otitis media : burden of illness and management options. World Health Organization
122. Wullstein HL, Wullstein S, Wullstein SR (1986) Tympanoplastik : osteoplastische Epitympanotomie. Thieme, Stuttgart
123. Xie W, Lorenz M, Poosch F, Palme R, Zechner D, Vollmar B, Grambow E, Strüder D (2022) 3D-printed lightweight dorsal skin fold chambers from PEEK reduce chamber-related animal distress. Sci Rep 12(1):11599. doi:10.1038/s41598-022-13924-5

124.Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y (2017) Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. Acc Chem Res 50(8):1976–1987. doi:10.1021/acs.accounts.7b00218

125.Yan K, Lv M, Xu E, Fan F, Lei Y, Liu W, Yu X, Li N, Shi L (2017) Effectiveness of patching traumatic eardrum perforations with lens cleaning paper via an otoscope. J Laryngol Otol 131(9):805–808. doi:10.1017/S0022215117001426

126.Yaşar M, Kaya A, Karaman H, Kavugudurmaz M, Polat H, Sağıt M, Özcan İ (2016) Potential Curative Role of Hypericum Perforatum in an Experimental Rat Model of Tympanic Membrane Perforation. J Int Adv Otol 12(3):252–256. doi:10.5152/iao.2016.1612

127.Yellowley CE, Toupadakis CA, Vapniarsky N, Wong A (2019) Circulating progenitor cells and the expression of Cxcl12, Cxcr4 and angiopoietin-like 4 during wound healing in the murine ear. PLoS ONE 14(9):e0222462. doi:10.1371/journal.pone.0222462

128.Zhuravleva K, Goertz O, Wölkart G, Guillemot L, Petzelbauer P, Lehnhardt M, Schmidt K, Citi S, Schossleitner K (2020) The tight junction protein cingulin regulates the vascular response to burn injury in a mouse model. Microvasc Res 132:104067. doi:10.1016/j.mvr.2020.104067

XI. DANKSAGUNG

Mein aufrichtigster Dank gilt Herrn Dr. med. Daniel Strüder. Seine kreative Idee eines neuen Modells für die Trommelfellperforation legte den Grundstein für diese Arbeit. In jeder Phase meiner Dissertation wurde ich von ihm außerordentlich freundlich und professionell unterstütz. Danke für diesen unschätzbaren Beitrag.

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar danke ich für die Möglichkeit, die Versuche unter Ihrer Leitung am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie durchzuführen. Nur durch Ihre Förderung wurde diese Arbeit möglich.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. med. Robert Mlynski für das Überlassen der intraoperativen Bilder und sein kritisches Auge bei der Durchsicht der Dissertation. Insbesondere möchte ich mich herzlich für die langjährige Zusammenarbeit bedanken. Sie hat mich auch weit über meine Zeit an der „Otto-Körner“ Klinik positiv geprägt.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Sebastian P. Schraven für seine unerlässliche Motivation.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, für die technische Unterstützung und die jederzeit sehr angenehme Zusammenarbeit. Frau Dorothea Frenz danke ich für die histologische Aufarbeitung der Präparate.

Meinen Freunden danke ich für ihre moralische Unterstützung und die manchmal auch nötige Ablenkung. Besonders danke ich Ulrike Raschke für das Korrekturlesen und Pia Brecht für den immerwährenden emotionalen Beistand.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie Christiane, Gudrun und Bernd Lachmann, die mir mit ihrer uneingeschränkten Unterstützung und ihren liebevollen Rückhalt erst das Studium und die Promotion ermöglichten und die mir trotz der oft großen Entfernung immer nah waren.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock _____ _____

(Abgabedatum) (Vollständige Unterschrift)