

Akustomechanische Eigenschaften xenogenetischer Collagenscaffolds als künstliche Trommelfelle

David Pazen, Kamill Gosz, David Schwarz, Maike Nünning und Dirk Beutner

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Uniklinik Köln, 50937 Köln, Deutschland

Email: david.pazen@uk-koeln.de

Einleitung

Das menschliche Trommelfell ist in der Lage, kleine Perforationen und Rupturen selbst zu heilen. Bei größeren Verletzungen oder chronischen Defekten kann eine Rekonstruktion durch eine Myringoplastik erforderlich werden. Hierzu werden häufig autologe Materialien wie beispielsweise Faszie, Knorpel oder Knorpelhaut (Perichondrium) verwendet. Um insbesondere bei Revisionseingriffen deren Entnahme zu vermeiden, kann auf allogene biokompatible Materialien für die Trommelfellrekonstruktion zurückgegriffen werden, welche bei der Ausheilung als Trägerstruktur dienen. Dazu haben sich beispielsweise Scaffolds aus dezellularisiertem Knorpel aus der Nasenscheidewand von Schweinen hinsichtlich der Biokompatibilität als prinzipiell geeignet erwiesen [1, 2, 3].

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach den akustomechanischen Eigenschaften solcher Scaffolds und ob diese auch bei quasistatischen atmosphärischen Druckänderungen eine ausreichende Schwingungsübertragung gewährleisten. In dieser Studie werden die schallinduzierten Volumenschnellen als Maß für die Schwingungsfähigkeit der Scaffolds sowohl bei atmosphärischem Druck als auch bei statischen Unterdrücken gemessen und mit denen von Scheiben aus Knorpel und Knorpelhaut und humanen Trommelfellen verglichen. Zusätzlich wird die Auslenkung der Scaffolds bei quasistatischen Luftdruckänderungen gemessen.

Methoden

Die untersuchten Scaffolds bestehen aus Knorpel der Nasenscheidewand des weiblichen Deutschen Edelschweins (*sus scrofa domestica*) und wurden am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg hergestellt. Aus dem Knorpel wurden zunächst zylindrische Scheiben gestanzt und in etwa 0,4 – 0,6 mm dicke Scheiben geschnitten. Wie in [1, 2] beschrieben wurden die Knorpelscheiben vollständig dezellularisiert, sterilisiert und die fertigen Scaffolds anschließend in steriler Kochsalzlösung gelagert.

Die untersuchten Trommelfelle wurden aus nicht fixierten humanen Felsenbeinpräparaten entnommen, wobei ein schmaler knöcherner Ring um das Trommelfell belassen wurde. Die Ossikelkette wurde entfernt und der Hammergriff ausgedünnt ohne das Trommelfell zu beschädigen. Die Knorpel- und Perichondriumscheiben wurden aus unbehandelten Schweineohren gewonnen. Der Knorpel wurde mit einem Knorpelschneider in „dicke“ (0,8 – 1 mm) und „dünne“ (0,3 – 0,5 mm) Scheiben geschnitten.

Die zu untersuchenden Membranen wurden zur Verbesserung der optischen Rückstreuungseigenschaften mit Glaskügelchen be-

deckt und wie in Abb. 1 dargestellt auf ein 3 cm langes Silikonröhrchen mit einem Innendurchmesser von 7 mm geklebt, welches einen vereinfachten Gehörgang nachbilden soll. In diesen künstlichen Gehörgang wurden etwa 2 mm vor der aufgeklebten Membran und im Abstand von weiteren etwa 2 cm Bohrungen eingebracht, durch welche eine Schallquelle und ein Mikrofon über kleine Silikonschläuche mit dem künstlichen Gehörgang verbunden wurden. Am anderen Ende des künstlichen Gehörgangs, gegenüber der aufgeklebten Membran, wurde über ein T-Stück ein Baro-/Vakuum-Meter und eine 10 ml Spitze angeschlossen. Die Spritze wurde auf einem motorgetriebenem Verschiebetisch montiert. Durch deren langsames Aufziehen konnten sowohl eine quasistatische Verringerung des Luftdrucks als auch die Einstellung des gewünschten statischen Unterdrucks (–100, –200 und –300 daPa) im künstlichen Gehörgang realisiert werden.

Über der Membran und teilweise darüber hinaus wurde ein rechteckiges Messpunktgitter aus 121 gleichmäßig verteilten Messpunkten definiert, auf welchen mit einem Scanning Laser Vibrometer die schallinduzierten Schnellen gemessen wurden. Die Schnellen auf den Messpunkten wurden mit ihrer entsprechenden Teilfläche gewichtet und zur Volumenschnelle auf der gesamten Membran aufsummiert.

Zunächst wurde für jede Membran (Scaffolds ($n = 5$), humane Trommelfelle ($n = 2$), Perichondrium ($n = 3$), „dünner“ Knorpel ($n = 3$) und „dicker“ Knorpel ($n = 3$)) die schalldruckbezogene Volumenschnelle H_{pQ} bei atmosphärischem Druck (im Folgenden als 0 daPa bezeichnet) und anschließend bei den statischen Unterdrücken von –100, –200 und –300 daPa gemessen. Als nächstes wurde in der Mitte der Membran, bzw. auf dem Umbo der Trommelfelle mit dem Wegdecoder des

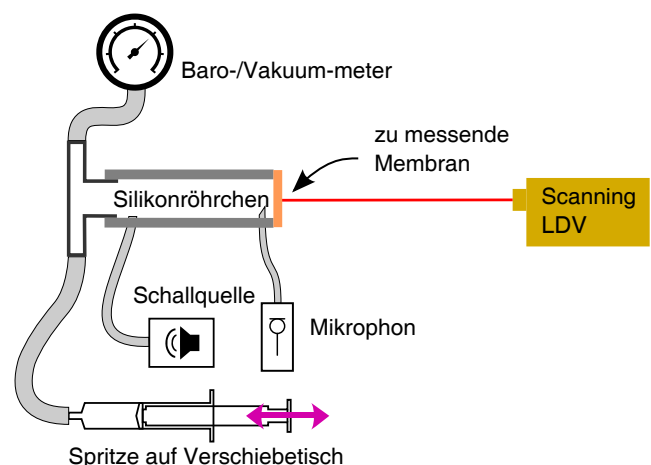


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Messaufbaus.

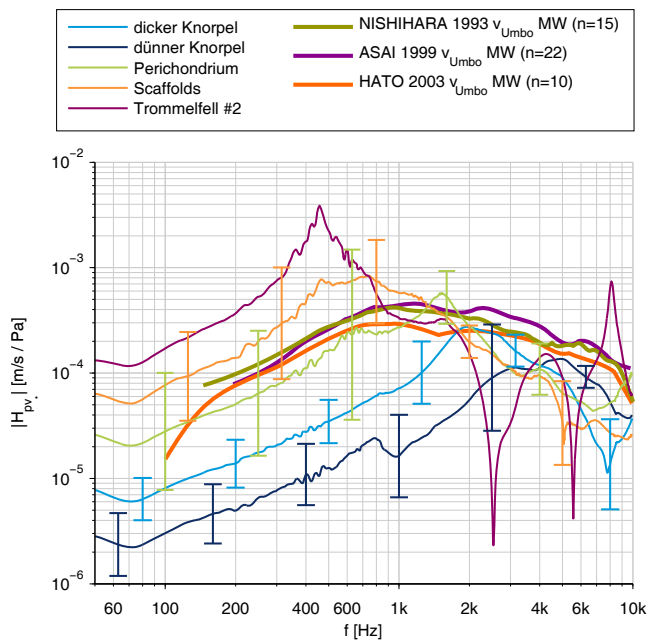


Abbildung 2: Schnellen im Mittelpunkt der untersuchten Membranen und Vergleich mit Messungen an humanen Trommelfellen aus der Literatur.

Vibrometers die Auslenkung ξ bei quasistatischer Luftdruckänderung im künstlichen Gehörgang gemessen. Dabei wurde der Druck, ausgehend vom atmosphärischen Druck, langsam mit etwa 7 – 8 daPa/s um etwa 300 daPa reduziert und dann wieder langsam auf den atmosphärischen Druck erhöht.

Ergebnisse

Zur Datenvalidierung werden die Beträge der Schnellen im Mittelpunkt (bzw. auf dem Umbo der Trommelfelle) der Membranen mit Daten von Messungen an humanen Trommelfellen in der Literatur [4, 5, 6] verglichen. Abb. 2 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der schallinduzierten Schnellen H_{pQ} dieser Studie, die Mittelwerte aus der Literatur liegen dabei im Bereich der hier gemessenen Daten.

Die Volumenschnellen bei den untersuchten Bedingungen sind in Abb. 3 beispielhaft für Scaffold SF #5 gezeigt und weisen die für derartige Membranen typische Bandpasscharakteristik auf. Der Betrag nimmt bei statischen Unterdrücken im künstlichen Gehörgang ab und gleichzeitig erhöht sich dabei die Resonanzfrequenz, wie es bei einer druckbedingten Erhöhung der Vorspannung zu erwarten ist.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Volumenschnellen aller Materialien bei verschiedenen statischen Drücken im künstlichen Gehörgang sind in Abb. 4 dargestellt. Das humane Trommelfell weist generell die größten Beträge auf, gefolgt vom Mittelwert der Scaffolds und den Perichondriumscheiben. Die Volumenschnellen der Knorpelmembranen liegen darunter, wobei dünner Knorpel günstigere Schwingungseigenschaften aufweist als dicker Knorpel. Bei einer Abnahme des statischen Drucks (Abb. 4b bis 4d) bleibt die Gestalt der Frequenzabhängigkeit der Beträge generell ähnlich. Die Resonanzfrequenzen verschieben sich bei dem humanen Trommelfell, den Scaffolds und den Perichondriummembranen etwas nach oben, während sie bei den Knorpelscheiben

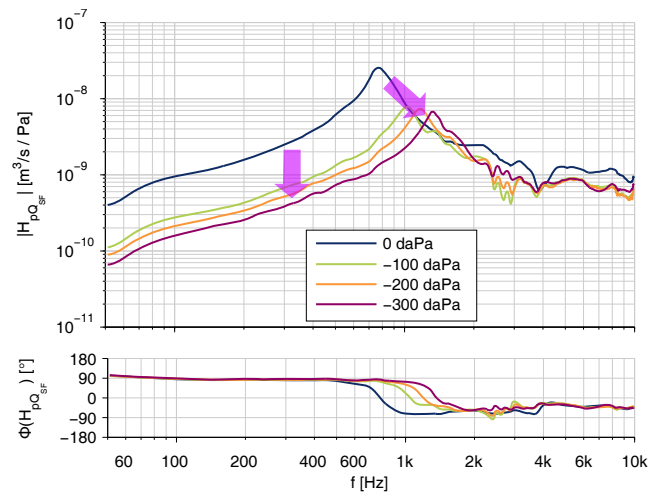


Abbildung 3: Volumenschnellen eines exemplarischen Datensatzes (SF #5) bei allen untersuchten Bedingungen.

eher konstant bleiben. Des Weiteren sinken die Beträge mit steigendem statischem Druck.

Die Änderungen der Beträge bei einer Druckänderung um –300 daPa sind in Abb. 5 zusammengefasst. Die größte Abnahme zeigt sich unter 1 kHz während die Beträge bei höheren Frequenzen keine deutlich sichtbare systematische Änderung aufweisen. Die größte Abnahme des Betrags ist beim humanen Trommelfell zu verzeichnen, gefolgt von den Perichondriumscheiben und den Scaffolds. Am geringsten ist die Auswirkung der Druckänderung auf die Volumenschnelle der Knorpelscheiben, wobei die hier untersuchten Dicken der Knorpelscheiben keinen auffälligen Einfluss haben.

Die Auslenkungen in der Mitte der Membranen bei einer quasistatischen Druckänderung sind in Abb. 6 für jede einzelne gemessene Membran zusammengefasst. In diesem Versuch wurde der statische Luftdruck ausgehend vom atmosphärischen Druck um 300 daPa verringert und dann wieder auf atmosphärischen Druck erhöht. Daher weist der Verlauf der Auslenkung über die Druckänderung bei allen Membranen eine Hysteresekurve auf. Unter den „natürlichen“ Materialien sind die Auslenkungen der dicken Knorpelscheiben am geringsten, gefolgt von den Perichondriummembranen und den humanen Trommelfellen. Die dünnen Knorpelscheiben und die Scaffolds zeigen eine größere Auslenkung, wobei die Scaffolds eine erhebliche Streuung aufweisen, die auf individuell Unterschiede von deren Dicke zurückzuführen sein könnte. Die in früheren Untersuchungen an humanen Trommelfellen [7, 8] gemessenen Auslenkungen liegen im Bereich hier gemessenen Auslenkungen der Scaffolds.

Diskussion

Gegenwärtig werden Trommelfellrekonstruktionen üblicherweise mit autologen Materialien wie Knorpel oder Perichondrium durchgeführt, die in experimentellen und klinischen Untersuchungen eine ausreichende Schallübertragung ermöglichen [9, 10, 11]. Bei pathologischen Drücken in der Paukenhöhle erweist sich Knorpel als stabiler, wohingegen Perichondrium eine bessere Schwingungsübertragung gewährleistet [12]. Auf der Suche nach allogenen Materialien, welche eine hohe Insensiti-

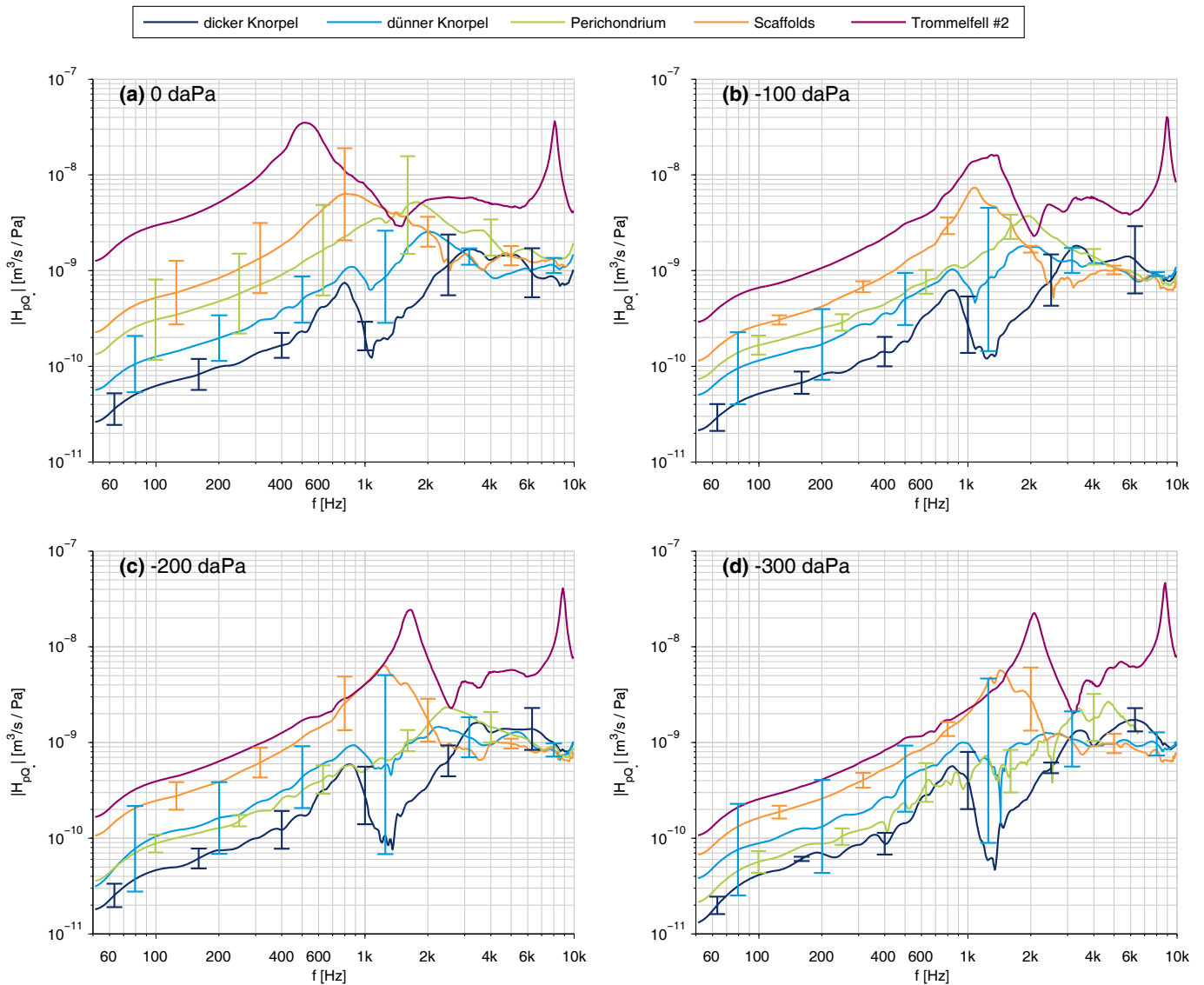


Abbildung 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Volumenschnellen aller Materialien bei verschiedenen statischen Drücken im künstlichen Gehörgang.

vität gegenüber pathologischen Drücken und gleichzeitig eine gute Schwingungsübertragung vereinen, wurden im Bereich des *tissue engineering* einige Materialien getestet [13, 14], wobei diese Untersuchungen hauptsächlich auf den Heilungsprozess fokussiert waren [15]. Diese Studie untersucht die akustomechanischen Eigenschaften einiger Materialien, die sich zu Trommelfellrekonstruktionen eignen.

Bislang haben sich 5 mm dicke Knorpelscheiben als optimaler Kompromiss zwischen mechanischer Stabilität und guter Schallübertragung erwiesen [10], was die Ergebnisse dieser Studie bestätigen (Abb. 4 und 5). Die Volumenschnellen dicker Knorpelscheiben sind zwar weniger abhängig vom statischen Druckunterschied zwischen Gehörgang und Paukenhöhle, aber niedriger als bei den anderen Membranen. Perichondrium ermöglicht bei atmosphärischem Druck eine gute Schallübertragung, die bei statischer Druckbelastung stark abnimmt, was den Ausheilprozess möglicherweise beeinträchtigen könnte. Neben dünnen Knorpelscheiben stellen die Scaffolds diesbezüglich ebenfalls einen guten Kompromiss dar.

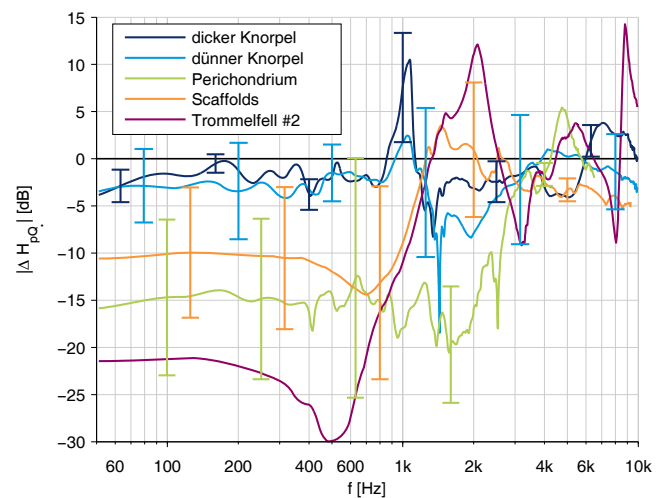


Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Änderungen der Volumenschnellen aller Materialien bei -300 daPa im künstlichen Gehörgang.

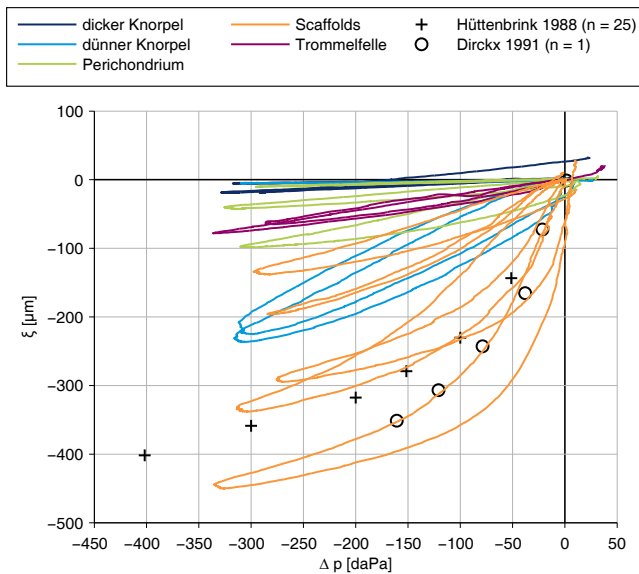


Abbildung 6: Auslenkungen in der Mitte der Membranen bei quasi-statischer Druckänderung.

Auch in bisherigen Untersuchungen allogener Typ-1 Scaffolds und humaner Trommelfelle konnten vergleichbare Schwingungseigenschaften festgestellt werden [16]. Dabei sind lediglich Einpunktschnellen gemessen worden, welche bei hohen Frequenzen und komplexeren Schwingungsmustern der Membranen von eingeschränkter Aussagekraft sind. Daher wurde in dieser Studie die vollständige Bewegung der Membranen erfasst, woraus die Volumenschnellen berechnet worden sind. Neben den offenbar günstigen akustomechanischen Eigenschaften der Scaffolds ist ein potentielles Übertragungsrisiko von Infektionen gegeben, was weitere Untersuchungen diesbezüglich erfordert [14]. Obwohl noch unklar ist, welches Material die besten Eigenschaften hinsichtlich einer Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung aufweist, um einen optimalen Heilungsprozess *in vivo* zu ermöglichen, scheinen dezellularisierte Gewebe wie die hier untersuchten Scaffolds prinzipiell dazu geeignet [16].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die akustomechanischen Eigenschaften von Scaffolds aus dezellularisiertem Schweineknorpel mit denen humaner Trommelfelle vergleichbar sind und sich somit für Trommelfellrekonstruktionen eignen. Ähnlich wie dünne Knorpelscheiben stellen sie einen guten Kompromiss zwischen guter Schwingungsübertragung und Stabilität bei pathologischen statischen Drücken in der Paukenhöhle dar. Daher können die Knorpelscaffolds als eine vielversprechende potentielle Alternative bei Myringoplastiken und ein Grundlage für weitere *in vivo* Untersuchungen angesehen werden.

Literatur

- [1] Badylak, S. F.: The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13 (2002), Nr. 5, 377–383
- [2] Badylak, S. F.: Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* 12 (2004), Nr. 3-4, 367–377
- [3] Badylak, S. F.; Weiss, D. J.; Caplan, A.; Macchiarini, P.: Engineered whole organs and complex tissues. *The Lancet* 379 (2012), Nr. 9819, 943–952
- [4] Nishihara, S.; Aritomo, H.; Goode, R. L.: Effect of Changes in Mass on Middle Ear Function. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 109 (1993), Nr. 5, S. 899–910
- [5] Asai, M.; Huber, A. M.; Goode, R. L.: Analysis of the best site on the stapes footplate for ossicular chain reconstruction. *Acta Oto-Laryngologica* 119 (1999), Nr. 3, 356–361
- [6] Hato, N.; Stenfelt, S.; Goode, R. L.: Three-Dimensional Stapes Footplate Motion in Human Temporal Bones. *Audiology and Neuro-Otology* 8 (2003), Nr. 3, 140–152
- [7] Hüttenbrink, K. B.: Die Mechanik der Gehörknöchelchenkette bei statischen Drücken. I. Normales Mittelohr. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie* 67 (1988), Nr. 2, 45–52
- [8] Dirckx, J. J.; Decraemer, W. F.: Human tympanic membrane deformation under static pressure. *Hearing Research* 51 (1991), Nr. 1, 93–105
- [9] Hildmann, H.; Luckhaupt, H.; Schmelzer, A.: Die Verwendung von Knorpel in der Mittelohrchirurgie. *HNO* 44 (1996), Nr. 10, 597–603
- [10] Zahnert, T.; Hüttenbrink, K. B.; Mürbe, D.; Bornitz, M.: Experimental investigations of the use of cartilage in tympanic membrane reconstruction. *The American Journal of Otolaryngology* 21 (2000), Nr. 3, 322–328
- [11] Mürbe, D.; Zahnert, T.; Bornitz, M.; Hüttenbrink, K.-B.: Acoustic Properties of Different Cartilage Reconstruction Techniques of the Tympanic Membrane. *The Laryngoscope* 112 (2002), Nr. 10, 1769–1776
- [12] Hüttenbrink, K. B.: Die operative Behandlung der chronischen Otitis media. I: Indikationen, Vorbereitung zur Operation und Grundlagen der Operationstechniken. *HNO* 42 (1994), Nr. 9, 582–593
- [13] Teh, B. M.; Marano, R. J.; Shen, Y.; Friedland, P. L.; Dilley, R. J.; Atlas, M. D.: Tissue Engineering of the Tympanic Membrane. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 19 (2013), Nr. 2, 116–132
- [14] Levin, B.; Rajkhowa, R.; Redmond, S. L.; Atlas, M. D.: Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Review of Medical Devices* 6 (2009), Nr. 6, 653–664
- [15] Shen, Y.; Redmond, S. L.; Teh, B. M.; Yan, S.; Wang, Y.; Zhou, L.; Budgeon, C. A.; Eikelboom, R. H.; Atlas, M. D.; Dilley, R. J.; Zheng, M.; Marano, R. J.: Scaffolds for Tympanic Membrane Regeneration in Rats. *Tissue Engineering Part A* 19 (2013), Nr. 5-6, 657–668
- [16] Jang, C. H.; Cho, Y. B.; Yeo, M.; Lee, H.; Min, E. J.; Lee, B. H.; Kim, G. H.: Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using 3D collagen with topical umbilical cord serum. *International Journal of Biological Macromolecules* 62 (2013), 232–240