

Textile Trägerstrukturen für das Tissue Engineering eines bioartifiziellen Trommelfells

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität
Bonn

Christoph Claus Moritz Klemm

aus Bonn

2009

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr PD Dr. M. Bücheler
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Götz

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.09.2009

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Universitätsklinik Bonn
Direktor Prof. Dr. F. Bootz

Meinen lieben Eltern

Dr. Hans Hubertus Klemm

und

Dipl. Ing. Luise Klemm

Inhaltsverzeichnis	Seite
1.0 Einleitung	7
1.1 Grundlagen	7
1.1.1 Embryogenese des Trommelfells	7
1.1.2 Anatomie des Trommelfells	7
1.1.3 Akustische Funktion des gesunden Trommelfells	8
1.1.4 Pathophysiologie der Trommelfellperforation	9
1.1.5 Indikationen zum Trommelfellersatz	9
1.2 Tissue Engineering	11
1.2.1 Sticktechnologie für medizinische und Textilien und Tissue Engineering	12
1.2.2 Gesticktechnik für Scaffolds im Tissue Engineering	13
1.2.3 Strukturelle und mechanische Aspekte	14
1.2.4 Warum Tissue Engineering für den Trommelfellersatz?	16
2.0 Material und Methoden	21
2.1 Untersuchungsmaterial: Gewebeentnahme und Präparation	21
2.2 Anfertigung der Zellkulturansätze	21
2.3 Spezielle Geräte	23
2.4 Trägerstrukturen/Scaffolds (Herstellung und Eigenschaften)	25
2.5 Medien, Zusätze und Seren	26
2.6 Zellkultur	26
2.7 Nachweisverfahren und Präparateaufbereitung	29
2.7.1 Histologie (HE-Färbung und initiale Auswertung)	30
2.7.2 Rasterelektronenmikroskopie	31
3.0 Ergebnisse	33
3.1 Scaffold I	33
3.1.1 In vitro	33
3.1.2 Histologie	34
3.2 Scaffold II	36
3.2.1 In vitro	36
3.2.2 Histologie	38
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie	42
3.3 Scaffold III	45

3.3.1	In vitro	45
3.3.2	Histologie	48
3.3.3	Rasterelektronenmikroskopie	53
3.4	Scaffold IV (Komposit-Graft)	57
3.4.1	In vitro	57
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	59
4.0	Diskussion	63
4.1	Bewertungen der Materialeigenschaften	63
4.2	Bewertung von Scaffold I	64
4.3	Bewertung von Scaffold II	65
4.4	Bewertung von Scaffold III	67
4.5	Bewertung von Scaffold IV (Komposit-Graft)	68
4.6	Fazit	69
5.0	Zusammenfassung	72
6.0	Literaturverzeichnis	74
7.0	Danksagung	85
8.0	Lebenslauf	86

1. Einleitung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Embryogenese des Trommelfells

Das Trommelfell entsteht aus dem Mesenchym zwischen der 1. Kiemenfurche und der 1. Schlundtasche, in dem auch die Anlagen des Stieles und des Processus lateralis des Hammers liegen. Das äußere Epithel entwickelt sich bei der Bildung der Lichtung der Gehörgangsplatte, das innere Epithel stammt vom Endoderm der 1. Schlundtasche (Schmidt, 1994).

Die weiteren wesentlichen Entwicklungsschritte bestehen in der Größenzunahme, der Differenzierung der drei Schichten, der Verminderung der Dicke und der Befestigung am Hammer und am Anulus tympanicus. In der 8. Woche sind die drei Schichten differenziert und die Befestigung am Hammer ist abgeschlossen (Graham et al., 1978). Im Fetalalter von 6-7 Monaten hat das Trommelfell die Dicke wie bei der Geburt und die Befestigung am Anulus tympanicus ist vollständig. Die Pars flaccida wird im 5. Monat angelegt; ihre Entwicklung wird nach Ausbildung des Prussakschen Raums gegen Ende der Fetalzeit abgeschlossen. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Trommelfell vollständig gebildet, aber bis zum Alter von 8 Wochen noch relativ dick (70- 100 µm (Beck, 1969)). Nach der Geburt führt weiteres Wachstum der Pars tympanica des Schläfenbeins zu einer Verlagerung des Anulus tympanicus nach innen, was geringe Änderungen der Lage des Trommelfells zur Folge hat (Ars und Ars-Piret; 1986; Huangfu M et al., 1983). Bei der Geburt steht das Trommelfell fast horizontal; beim älteren Kind hat es die Stellung des erwachsenen Zustandes angenommen (Beck, 1969).

1.1.2 Anatomie des Trommelfells

Das schwach elliptische Trommelfell hat die Form eines ganz flachen Trichters. Die Spitze erscheint von außen als Einziehung (Umbo membranae tympanicae). Das etwa 0,08 - 1 mm dicke Trommelfell ist durchscheinend, so daß es möglich ist, Gebilde

im Inneren der Paukenhöhle zu erkennen. Der vertikale Durchmesser beträgt 8,5 - 10 mm, der horizontale 8 - 9 mm (Lim, 1995). Der größte Teil des Trommelfells, die Pars tensa, ist mittels des Anulus fibrocartilagineus in den Sulcus tympanicus der Pars tympanica ossis temporalis eingefalzt (Frick et al, 1992). Die vorn oben gelegene kleine Pars flaccida (Shrapnell'sche Membran) haftet an der Incisura tympanica der Schläfenbeinschuppe. Die Grenze zwischen Pars tensa und Pars flaccida bilden die Prominentia mallearis und die Striae membranae tympanicae anterior und posterior (Fibras, 1994).

Die äußere Fläche des Trommelfells steht nach vorn unten lateral. Der nach oben offene Winkel, den die Ebene des Trommelfells mit der Gehörgangssachse bildet, beträgt beim Erwachsenen 40 - 50° Grad, bei Neugeborenen 30 - 35° Grad. Zur Unterteilung des Trommelfells in 4 Quadranten werden 2 Linien verwendet: Eine verläuft entlang der Stria mallearis, die andere senkrecht zu dieser durch den Umbo (Boenninghaus und Lenarz, 2007).

Mikroskopisch ist das Trommelfell teils zwei-, teils dreischichtig aufgebaut. Die epitheliale oder Kutisschicht (Stratum cutaneum) entspricht in ihrem Aufbau grundsätzlich der Haut des äußeren Gehörganges mit einem mehrschichtigen, an der Oberfläche glatten Plattenepithel (Michaels, 1988). Hieran schließt sich die Lamina propria (Membrana fibrosa) an, die eine äußere Radiärfaserschicht sowie eine innere zirkuläre Schicht bestehend aus kollagenen Fasern aufweist. Der Anulus fibrosus stellt eine Verdickung des Trommelfellrandes dar und wird von beiden Faserschichten gebildet. Zur Paukenhöhle findet sich ein einschichtiges Plattenepithel (Stratum mucosum) (Ruah und Ars, 1995).

Auch in der Pars flaccida kann eine Lamina propria nachgewiesen werden, ihr fehlt jedoch die oben beschriebene charakteristische radiär-zirkuläre Struktur, welche der Pars tensa die funktionell notwendige Spannung vermittelt (Kubik, 1965).

1.1.3 Akustische Funktion des gesunden Trommelfells

Unter den Bedingungen des intakten Trommelfells und der Schallanregung im Gehörgang wird der Luftschall des Gehörganges in mechanische Schwingungen des

Trommelfelles umgewandelt. Ein Optimum der Schallabsorption besteht zwischen 2 und 5 kHz. Unterhalb von 1 kHz wird nur 1/100 der Energie vom Trommelfell aufgenommen, der Rest wird reflektiert. Zwischen 1 und 10 kHz werden mehr als 1/10 der Energie aufgenommen, wobei ein Optimum bei 3 und 7 kHz besteht (Rosowski, 1991).

1.1.4 Pathophysiologie der Trommelfellperforation

Trommelfellperforationen sind in aller Regel entzündlich oder traumatisch bedingt. So besteht bei einer persistierenden traumatischen Trommelfellperforation (z.B. verursacht durch den Gebrauch von Wattestäbchen oder einen Schlag auf das Ohr, Explosionstrauma, iatrogen) ebenso die Indikation zum Trommelfellersatz wie z.B. bei einer unfallbedingten Unterbrechung der Gehörknöchelchenkette im Sinne einer Luxation oder Fraktur (z. Bsp. Felsenbeinfraktur). In diesem Zusammenhang entsteht oft eine Ruptur des Trommelfelles (Tringali et al., 2008).

Die chronische Schleimhauteiterung (chronische Otitis media mesotympanalis) ist meist verantwortlich für eine Atrophie der kollagenen Faserschichten des Trommelfells (Wullstein, 1968). Ebenso führen der Adhäsivprozeß, fibrotische oder sklerotische Veränderungen der Mittelohrräume, verursacht durch eine chronische Belüftungsstörung mit Unterdruck in der Paukenhöhle, zu der oben beschriebenen Atrophie.

1.1.5 Indikationen zum Trommelfellersatz

Die Indikation zur Operation wird wesentlich bestimmt durch die Aggressivität und Progression des jeweiligen Krankheitsprozesses.

So ist beim Cholesteatom stets die operative Entfernung des Plattenepithels und des Granulationsgewebes angezeigt, da bislang kein anderes Behandlungsprinzip den destruierenden, komplikationsträchtigen Verlauf aufhalten kann. Eine vergleichbare Situation besteht bei malignen Raumforderungen im Bereich der pneumatisierten Mittelohrräume (Boenninghaus und Lenarz, 2007).

Bei einer reizlosen zentralen Trommelfellperforation mit oder ohne Kettenunterbrechung steht hingegen die rekonstruktive Zielrichtung im Vordergrund. Eine wichtige Rolle spielt der Wunsch des Patienten, besser zu hören und ggf. auf ein Hörgerät zu verzichten oder wieder schwimmen zu können. Es zeigt sich eine Korrelation zwischen der Größe, sowie der Lokalisation des Trommelfelldefektes. So ist die Schalldruckübertragung bei zentralen, zirkulären Perforationen im geringeren Maße gestört als bei spindelförmigen, ausgedehnteren Perforationen im antero-caudalen Quadranten oder im Bereich des Malleolus (Matsuda et al., 2009).

Ein Trommelfellverschluss oder –ersatz verhindert Wassereintritt und somit die rezidivierenden Otitiden mit der Gefahr der Ossikeldestruktion. Besonders bei Kindern sollte daher die Indikation zum Trommelfellverschluss großzügig gestellt werden (Smyth, 1980). Als akustische Indikation ist der Verlust des sozialen Gehörs, d.h. eine Schalleitungskomponente über 35 dB im Hauptsprachbereich anzusehen (Strauss, 1979). Bei einer eindeutigen Tubenfunktionsstörung (z. B. beim Adhäsivprozeß) hat jedoch eine gehörverbessernde Operation wenige Erfolgsaussichten. Bei Kindern mit Gaumenspalte sollte daher eine Trommelfellrekonstruktion auf das 20. Lebensjahr verschoben werden (Plester, 1984; Hildmann, 1989). Eine funktionell ausgerichtete Operation wird ebenfalls eine ungünstige Prognose haben bei einer Paukenfibrose oder einer alten massiven Tympanosklerose des Mittelohrs (Plester und Hildmann, 1989; Gourmley, 1987).

Auch bei angeborenen Mißbildungen (z.B. Cockayne-Syndrom, Escher- Hirt- Syndrom, Thalidomid-Mißbildungssyndrom) im Bereich des Mittelohres kann eine Tympanoplastik nach vorheriger ausführlicher Diagnostik sinnvoll sein. Seltene Indikationen für die Tympanoplastik sind spezifische Entzündungen, wie z. B. Tuberkulose (Mongkolrattanothai et al., 2003) oder eine benigne (z. B. Glomustumor (Sanna et al., 2007)) oder maligne Neubildungen (z.B. Plattenepithelkarzinom).

1.2 Tissue Engineering

Der Ersatz oder die Wiederherstellung von Zell-, Gewebe- und Organfunktionen gehört zu den bedeutendsten Herausforderungen der modernen Medizin. Durch neue Therapieverfahren wie die Organtransplantation oder die Versorgung mit Implantaten kann heute für viele Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität und oft auch die Verlängerung des Lebensalters erreicht werden (Bücheler, 2002).

Implantate erreichen bisher nicht die Qualität, Langlebigkeit oder Funktionalität natürlicher Körperteile. Sie sind Fremdkörper im Organismus, so dass materialspezifische Kompatibilitätsprobleme den klinischen Einsatz eines Implantates beeinträchtigen können (Berghaus und Stelter, 2006). Das Einbringen eines Implantates in einen Organismus löst immer eine Gewebereaktion aus. Idealerweise unterscheidet sie sich kaum von den Abläufen bei der normalen Wundheilung. Bei ungünstigem Verlauf kann sich eine derbe Bindegewebskapsel um das Implantat ausbilden oder eine chronische Entzündung entstehen. Ein eventueller Implantatverlust mit der nachfolgenden Notwendigkeit weiterer rekonstruktiver Maßnahmen wäre die Folge (Spano et al., 2008).

Das ideale Ersatzgewebe stammt aufgrund seiner immunologischen Unbedenklichkeit vom Patienten selbst. Es steht jedoch nur begrenzt zur Verfügung und reicht in der Regel nicht aus, größere Defekte zu verschließen. Die Vermehrung des patienteneigenen Gewebes bis zum Erreichen der therapeutisch benötigten Menge und Qualität würde die Lösung dieses Problems darstellen. Seit Jahrzehnten arbeiten Forscher daran, humane Zellen und Gewebe außerhalb des menschlichen Organismus zu kultivieren und zu vermehren (Doyle et al., 1993). Seit Mitte der 80er Jahre ist Tissue Engineering ein eigenständiges Forschungsgebiet, in dem Kliniker, Zellbiologen und Werkstoffwissenschaftler interdisziplinär zusammenarbeiten (Bücheler und Haisch, 2003).

Tissue Engineering ist die Verbindung im Labor erzeugter Gewebe, Zellen und Moleküle mit einem oder verschiedenen Biomaterialien (Ju et al., 2009), um einen Defekt oder einen Funktionsverlust in einem Organismus auszugleichen (Langer und Vacanti, 1993). In vitro hergestellte Ersatzgewebe stellen eine günstige Alternative zu ausgedehnten

chirurgischen Eingriffen dar (Patel und Fisher, 2008). In der Regel sind proliferationsfähige humane Zellen erforderlich, die nach Isolierung durch geeignete Zellkulturtechniken vermehrt werden (Justice et al., 2009), bis eine ausreichende Zellzahl für die Besiedlung einer Matrixstruktur vorhanden ist.

1.2.1 Sticktechnologie für medizinische Textilien und Tissue Engineering

Textile Strukturen werden in großem Ausmaß als medizinische Implantate eingesetzt, um Weich- und Hartgewebe zu unterstützen oder zu ersetzen. Im Tissue Engineering gewinnen sie an Bedeutung als Trägerstrukturen (=Scaffolds), um biologische Gewebe in vitro zu züchten für anschließende Implantationen oder extrakorporale Anwendungen. Textilien sind in der Regel anisotrope zweidimensionale Strukturen mit hoher Steifigkeit in der Ebene und geringer Biegesteifigkeit. Durch eine Vielzahl textiler Prozesse und durch entsprechende Wahl des Fasermaterials ist es möglich, Oberfläche, Porosität und mechanische Anisotropie in hohem Maße zu variieren. Wegen ihrer einzigartigen strukturellen und mechanischen Eigenschaften können faserbasierte Materialien in weitem Maße biologischem Gewebe nachgeahmt werden (Wintermantel und Ha, 2002). Gestricke erweitern das Feld von technischen und besonders medizinischen Textilien, denn sie vereinen sehr hohe strukturelle Variabilität mit der Möglichkeit, mechanische Eigenschaften in einem großen Bereich einzustellen, um so die mechanischen Anforderungen des Empfängergewebes zu erfüllen (Abbildung 1).

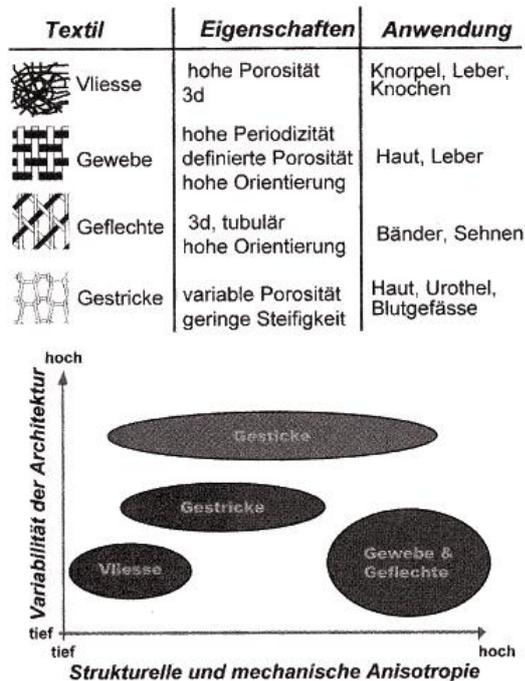


Abbildung 1:
Textile Strukturen werden als Zellträger (Scaffold) für
Anwendungen im
Tissue Engineering eingesetzt. Lokale Änderungen von
Material und Stichmuster bei Gesticken erlauben es, die
mechanischen und strukturellen Eigenschaften in weitem
Masse zu variieren. Das Vlies entspricht Scaffold 1, das
Geflecht Scaffold 3 und das Gestrick Scaffold 2.
Aus: Wintermatel E, Ha SW. Medizintechnik mit
biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Berlin
Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2002

1.2.2 Gestickechnik für Scaffolds im Tissue Engineering

Textile Strukturen als Scaffolds für das Tissue Engineering werden intensiv erforscht. Diese Strukturen beinhalten Vliess, gestricke und geflochtene Textilien aus synthetischen oder natürlichen Polymerfasern. Alle diese textilen Strukturen haben einzigartige strukturelle und mechanische Eigenschaften, die für bestimmte Anwendungen ideal sind: z. B. für die Züchtung von Knochen (Redlich et al., 1999), Haut (Naughton et al., 1997), Knorpel (Freed et al., 1994), Sehnen (Cao et al., 1995) oder Lebergewebe (Karamuk et al., 1999) in vitro. Struktur und Porosität sind Schlüsselemente, welche die Bildung von neuem Gewebe in vitro und die Vaskularisation nach der Implantation in vivo bestimmen (Reece und Patrick, 1998). Textile Trägerstoffe bieten durch die Verteilung struktureller Elemente wie Poren und Fasern ein breites Spektrum an räumlicher Organisation. Vom Gesichtspunkt der Strukturbiokompatibilität aus betrachtet ist es entscheidend, die mechanischen Eigenschaften der Trägerstruktur denen des Empfängergewebes anzupassen (Place et al., 2009). Die Gestickechnik erlaubt es, die Dichte, Verteilung und Orientierung der

Fasern lokal zu kontrollieren und ist ein effektives Mittel, um Strukturen zu gestalten, welche das mechanische Verhalten und das Einwachsen der Zellen steuerbar machen. Gestickte Zellträger dienen als Testsysteme zur Untersuchung der Wechselwirkung von Zellen und textilen Strukturen in vitro (Vasita et al., 2008).

1.2.3 Strukturelle und mechanische Aspekte

Um den Anforderungen der Strukturkompatibilität Rechnung zu tragen, müssen die strukturellen und mechanischen Eigenschaften von textilen Biomaterialien für Implantate und Tissue Engineering auf drei Ebenen untersucht werden: die makroskopische Ebene ($< 10^{-1}$ mm) beschreibt die Nachgiebigkeit (compliance) des Materials und seine mechanische Adaptation an das Zielgewebe (Wintermantel und Ha, 2002). Auf der mesoskopischen Ebene (1mm- 100 μ m) werden die Interaktionen zwischen den strukturellen Elementen des Textils (Poren, Knoten, Bindungen) mit dem einwachsenden Gewebe untersucht (z.B. die Vaskularisierung) (Jones et al., 2009). Die mikroskopische Ebene (100- 10 μ m) beschreibt das strukturelle Interface zwischen den einzelnen Fasern des Textils und den einwachsenden Zellen (Nair et al., 2004). Die mechanischen Eigenschaften von medizinischen Textilien ändern sich nach der Implantation oder nach in vitro Besiedlung mit Zellen. In Geweben und Gesticken tritt eine mechanische Verformung erst durch Verschiebung des Garns in der Bindung auf. Danach verformt sich das Garn direkt durch Biegung und Streckung. Verformungen führen zu Beschädigungen des eingewachsenen Gewebes und können Entzündungsreaktionen und Wundheilungsstörungen hervorrufen. Für verschiedene Anwendungen ist es wünschenswert, ein textiles Material zur Verfügung zu haben, das sein mechanisches Verhalten nicht oder nur sehr wenig ändert, während Gewebe einwächst (Vital-Avital Komposit).

Im Gegensatz zu anderen Textilien nimmt man von Gesticken größere Vorteile an: Die Struktur des Gestickes mit lokalen Knoten sollte eine Verschiebung des Garns nach Einwachsen von Gewebe weitestgehend verhindern. In einem mechanischen Modell kann man sich diese Struktur als Stabelemente mit Knoten vorstellen. Daher hängt eine Verformung von den Eigenschaften der Garne ab und das mechanische Verhalten kann

maßgeschneidert werden durch lokale Integration steifer Elemente, wie z.B. Monofilamente oder durch Erhöhung der Anzahl und Ausrichtung der Stiche pro Flächeneinheit. Durch die Variation des Stickmusters im Zentrum einer gestickten Zugprobe und durch die Verwendung verschiedener Kombinationen von Stick- und Bobbinengarn kann die Steifigkeit innerhalb einer Größenordnung variiert werden. Durch die unidirektionale Anordnung entstehen steife, hochanisotrope Strukturen während die Anordnung von Stichen in einer dichten, fachwerkartigen Struktur zu einem beinahe isotropen Verhalten führt. Daraus folgt, daß die lokale Anordnung von verschiedenen Garnen und Stichmustern, wie sie nur in der Sticktechnik gegeben ist, die Möglichkeit bietet mechanische Eigenschaften in weitem Maße für medizinische Textilien mit hoher Strukturkompatibilität maßzuschneidern (Wintermantel und Ha, 2002).

In unserem Fall müssen anatomische und funktionelle Vorüberlegungen über das Trommelfell getroffen werden. Die Aufgabe des Schalldrucktransformators erfüllt zusammen mit den Ossikula die Pars tensa des Trommelfelles. Zu diesem Zweck ist sie durch das eingelagerte Stützsystem der vorwiegend kollagenen Fasern versteift und nicht dehnbar (Kobrak, 1956). Die Schwingungen ihrer wirksamen Fläche erfolgt – besonders bei den unteren und mittleren Frequenzen – mit der größten Amplitude in der Randzone, entlang der unteren Hälfte der Zirkumferenz, nahe dem Anulus fibrosus (Abbildung 2).

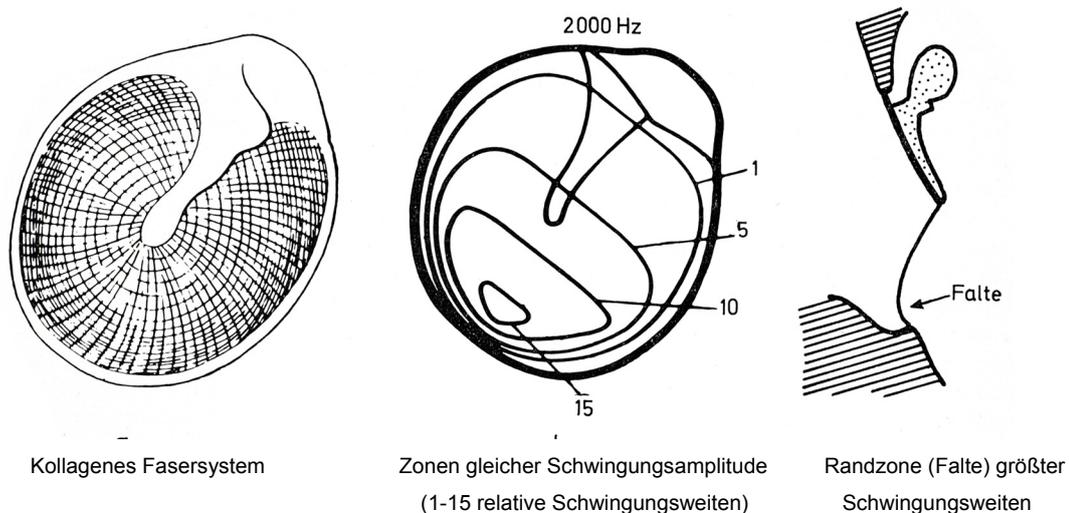


Abbildung 2 aus: Ranke OF, Lullies H. Gehör, Stimme, Sprache. Berlin: Springer-Verlag 1953

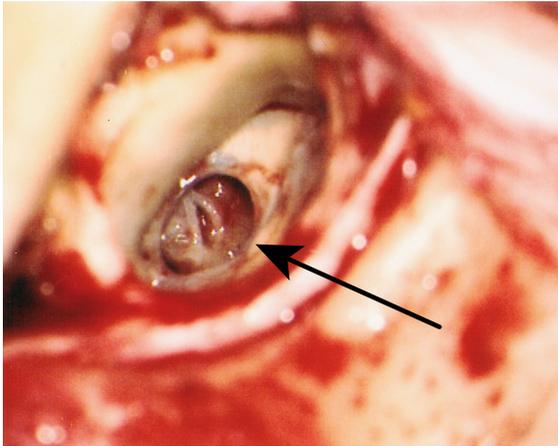
1.2.4. Warum Tissue Engineering für den Trommelfellersatz?

In vielen medizinischen Fachdisziplinen werden die Methoden des Tissue Engineering zur Entwicklung künstlicher Ersatzgewebe eingesetzt. In der Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde besteht trotz einer Vielzahl etablierter Gewebeersatzverfahren die Notwendigkeit, neue Konzepte basierend auf den Methoden des Tissue Engineering zu entwickeln. Als Beispiele finden sich Gewebeersatzverfahren für Knorpel und Knochen (Rotter et al., 2005), für respiratorisches Epithel (Bücheler et al., 2008) und Speicheldrüsengewebe (Rotter et al., 2008). Mittels Tissue Engineering gewonnener Knochenersatz stellt jedoch das einzige Gewebe dar, welches im klinischen Alltag routinemäßig verwendet wird (Nussenbaum et al., 2004).

Mit mehr als 2 Millionen Paukenröhrcheneinlagen pro Jahr ist dies der meist frequentierte chirurgische Eingriff in den USA. Bis zu 16% der operierten Patienten erleiden je nach Typ und Größe der Parazentese und der Verweildauer des Paukenröhrchens eine chronische Trommelfellperforation (Kay et al., 2001; Levine et al., 1994; Nichols et al., 1998).

Seit Einführung der modernen Tympanoplastik zur Sanierung des Mittelohres durch Wullstein und Zöllner (Plester und Zöllner, 1980) wurden verschiedene Techniken und auch Materialien zum Verschluss eines Trommelfelldefektes beschrieben. Heute gebräuchliche Methoden sind die *underlay*-Technik mit Verschluss des Defektes mit Temporalisfaszie, Perichondrium von Tragus oder Concha oder Knorpel-Perichondrium composite-grafts (Borkowski et al., 1999). (Abbildung 3)

a)



b)

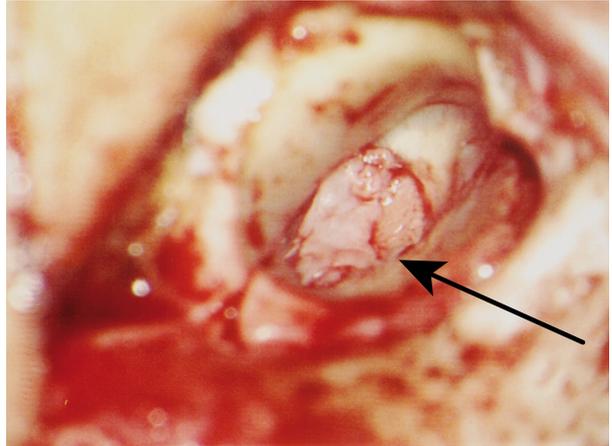


Abbildung 3: Die Abbildung 3 zeigt die operative Aufsicht des äußeren Gehörganges eines linken Ohres. Dabei kommt der ventrale Anteil (vom Patienten) im oberen Bildabschnitt, cranial im Bild rechts, dorsal im Bild unten und caudal im Bild links zur Darstellung. In a) zeigt sich der operative situs einer traumatischen, subtotalen Trommelfellperforation (Pfeilmarkierung). In b) postoperativer Verschluss des Defektes (Pfeilmarkierung) mittels Knorpel-Perichondrium-Transplantaten.

Unabhängig vom Material und der benutzten Technik stellt die Rezidivperforation in unterschiedlicher Ausprägung jedoch weiterhin eine für den Patienten und auch den Operateur unangenehme Komplikation dar. Für das reine Faszientransplantat werden unabhängig vom Ausmaß der Perforation Rezidive bis zu 28% (Baumann et al., 1997) angegeben, wobei bei Kindern offensichtlich die Rezidivneigung mit zunehmendem Alter abnimmt (Hildmann, 1989). Deutlich bessere Ergebnisse, insbesondere unter ungünstigen Bedingungen wie den totalen Trommelfellperforationen oder persistierenden Belüftungsstörungen, verspricht ein Knorpel-Perichondrium-Transplantat (Milewski, 1991), das aus dem Tragus oder auch aus der Concha gewonnen werden kann. Bei Menschen bildet sich nach einer traumatischen Trommelfellperforation fast immer eine dünne atrophische Membran in dem vorherigen Defektbereich aus (Hüttenbrink, 2005). Daher haben sich Knorpel-Perichondrium-Transplantate bis dato zur Trommelfellrekonstruktion bei schwierigen Indikationen bewährt. Es stehen zahlreiche Techniken und Modifikationen der Knorpelverarbeitung und –positionierung zur Verfügung, von denen die Palisadentechnik sowie die Knorpelinseltechnik die wichtigsten sind (Neumann und Jahnke, 2005). Obgleich beide Techniken in der Lage sind, einen sicheren und dauerhaften Trommelfellverschluss zu erreichen, liegen ihnen dennoch einige Kritikpunkte zu Grunde: Dislokationen, Krümmung des ausgedünnten

Knorpeltransplantates, eine vermeintlich schlechtere Schallübertragung und ein erhöhter Zeitfaktor.

Ebenso als funktionelle Gründe für den vollständigen Trommelfellersatz erscheinen Störungen der physiologischen Trommelfellschwingung durch Transplantate und Narben (Abbildung 4). Nach Trommelfellunterfütterungen mit Knorpel-Perichondrium-Transplantaten kam es zu einem Anstieg des Gehörgangsschallpegels von bis zu 7dB bei 3 kHz als Zeichen der erhöhten Trommelfellimpedanz (Schöttke et al., 1992). Untersuchungen an einem Gehörgangs-Trommelfellmodell ergaben für dünne Knorpelplatten mit einem Schichtdurchmesser von 200 – 300 µm ähnliche Übertragungseigenschaften wie im gesunden Trommelfell. Gegenüber atmosphärischen Druckschwankungen war der ausgedünnte Knorpel jedoch nicht gleichwertig stabil (Zahnert et al., 1997).

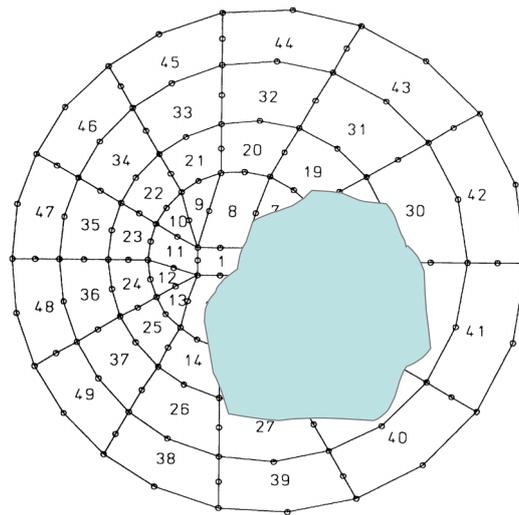


Abbildung 4: Die Blaue Fläche symbolisiert ein schwingungsbeeinträchtigendes Transplantat bzw. Narbe im Trommelfell.

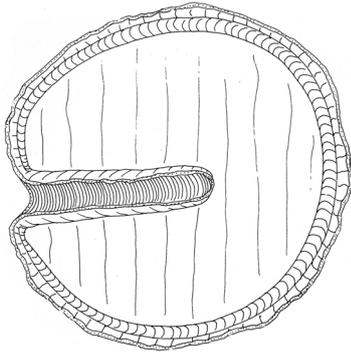
Modifiziert nach Williams K R et al. Middle Ear Mechanics as examined by the Finite Element Method. In: Hüttenbrink K B, ed. Middle Ear Mechanics in Research in Otosurgery. Dresden: Die Deutsche Bibliothek, 1997: 67-75

Im Gegensatz zu den traumatischen Trommelfellperforationen, die nicht nur bei der Ratte, sondern auch beim Menschen fast immer vollständig ausheilen (Kaftan et al., 2004), ist der Verschluss einer Perforation bei chronischen Schleimhauteiterungen ohne operative Maßnahmen fast nie zu erreichen.

Die schon seit Jahrzehnten bekannte allogene Trommelfelltransplantation (Abbildung 5) hat das Ziel, mit defektorientierten, maßgeschneiderten Transplantaten das Trauma

chirurgisch zu beheben. Allerdings birgt diese Technik das Risiko, stärkere immunologisch bedingte Entzündungen hervorzurufen. Diese Reaktionen, auf Grund von einer vermehrten Mitübertragung von spendereigenen Plasmaproteinen, kann für ein chirurgisches Misslingen verantwortlich sein (Kastenbauer und Prechtel, 1972).

a)



b)

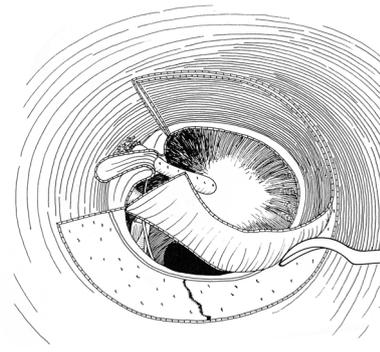


Abbildung 5: Allogene Trommelfelltransplantation nach Brandon. In a) eine Skizze des excidierten Transplantat. In b) eine Skizze der Transplantation

Aus: Tos M.: Manual of Middle ear Surgery. Stuttgart New York, Thieme-Verlag 1993

Zusammenfassend bieten die heute gebräuchlichen Trommelfellersatzmethoden (Temporalisfaszie, Perichondrium von Tragus oder Concha oder Knorpel-Perchondrium composite-grafts) zufriedenstellende OP-Ergebnisse. Mit der steigenden Defektgröße limitieren sich hingegen die Auswahl an OP-Techniken und ihre Erfolgsaussichten. Zudem bedeutet dies immer ein invasives Vorgehen mit einer Inzision am Tragus und einer chirurgischen Vorbereitung des Gewebetransplantates (Eavey RD, 1998; Couloigner et al., 2005)

Das Ziel des Tissue Engineerings ist es, körpereigenes Gewebe minimal invasiv zu entnehmen, es zu vermehren, ggf. es zu modifizieren und einen bestehenden Defekt mit dem äquivalenten Endprodukt zu versorgen (Bücheler und Haisch, 2003). Jedoch wurde für die Wiederherstellung des Trommelfelles bis dato noch keine standardisierte Tissue Engineering-Strategie entwickelt.

Die operative Versorgung von Trommelfellperforationen könnte unabhängig von der Größe und Topographie des Defektes durch gezüchtete Membranen in soweit verändert werden, dass es zu intraoperativen Zeitersparnissen sowie geringeren Belastungen für

den Patienten kommt. Der Trommelfellersatz durch histologisch und strukturell gleichwertiges Gewebe verfolgt als Ziel, einen Zustand der Restitutio ad integrum zu erreichen, so dass vor allem die Rezidivneigung minimiert wird, und die Funktionalität auf das Ausgangsniveau angepasst wird. Die resultierende Verbesserung der Lebensqualität des Patienten wird dadurch langfristig gesichert.

Tissue Engineering besitzt das Potential funktionelle Ersatzgewebe hervorzubringen (Goessler et al., 2007), um so auch schwierigste Trommelfelldefekte unterschiedlicher Ätiologie suffizient zu beheben.

Nach diesen Vorüberlegungen wurde in dieser Arbeit versucht, ein bioartifizielles Trommelfell mit Hilfe des Tissue Engineering auf einer Matrixstruktur zu züchten. Die Größe der Trägerstrukturen wurde einer Standard-Zellkulturschale mit 6, 12 oder 24 Einzelzellen angepasst. Der reproduzierbare Resultate liefernde Herstellungsprozess des Scaffolds wird es erlauben, Motilität, Proliferation und Differenzierung von Zellen *in vitro* zu studieren, in Abhängigkeit von Garn-Eigenschaften wie Werkstoff, Oberflächenbehandlung, Texturierung und Garn-Titer sowie lokaler Faserkonzentration und Faserkreuzungswinkeln (Ma et al., 2007).

Dabei sollte die Trägerstruktur verschiedene technische Eigenschaften aufweisen. Die reproduzierbare Orientierung der Fäden wird durch die Nachahmung der Anatomie des physiologischen Trommelfelles gewährleistet. Maskroskopisch ist der Anulus fibrosus, sowie die Membrana fibrosa mit ihrer äußeren Radiärfaserschicht und ihrer inneren zirkulären Schicht zu erkennen. Eine definierbare mechanische Stabilität durch das gewählte Fadenmaterial garantiert eine einheitliche Schwingungsfähigkeit und vorhersagbare Retrahierbarkeit. Durch variable Oberflächenmodifikationen (Jiao und Cui, 2007) wird ein fester Vital-Avital-Verbund ermöglicht und immunologische Reaktionen *in vivo* können auf ein Minimum reduziert werden.

Im dieser Arbeit wurden Polyester-Garne (Polyethylenterephthalat, PET) verschiedener Texturen eingesetzt. PET ist ein alterprobter Werkstoff für Trägerstrukturen, welcher bioinert und biokompatibel ist (Puskas und Chen, 2004). Aus den Ergebnissen dieser Studie werden Angaben für die Optimierung von textilen Scaffolds erwartet, mit dem Ziel der Weiterentwicklung der hier verwendeten Trägerstrukturen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial: Gewebeentnahme und Präparation

Im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Tonsillektomien und Conchotomien wurde jeweils orale bzw. respiratorische Mucosa mit dokumentiertem Einverständnis der Patienten und schriftlicher Zustimmung der Ethikkommission der Universität Leipzig und Universität Bonn (Reg.-Nr.: 593) entnommen. Das gewonnene Material wurde innerhalb einer Stunde nach der Operation im Labor weiterverarbeitet. Die Verarbeitung erfolgte unter der sterilen Werkbank, wobei zusätzlich Mundschutz, OP-Haube und Handschuhe getragen wurden.

Die Mucosa wurde in toto unter dem Mikroskop mit Skalpell und Pinzette von bedeckendem Epithel befreit. Nekrotische Schleimhautbezirke, die intraoperativ z. B. durch Elektrokoagulation entstanden waren, wurden verworfen (Abbildung 6).

2.2 Anfertigung der Zellkulturansätze:

Die vorbereitete Gewebeprobe wurde in mehrere ca. 3x3 mm messende Stücke zerkleinert, und nach Abspülen mit sterilem NaCl in die verschiedenen Zellkulturansätze bzw. direkt auf das Scaffold gegeben (Abbildung 6).

Das Zellwachstum wurde makroskopisch mittels Inversionsmikroskop kontrolliert. Eine primäre, dominierende Aussprossung von Fibroblasten aus anhängendem Bindegewebe von Epithelexplantaten wurde von Bücheler (2002) gezeigt. So wurden die proliferierenden Zellen morphologisch als Fibroblasten charakterisiert (Abbildung 7).

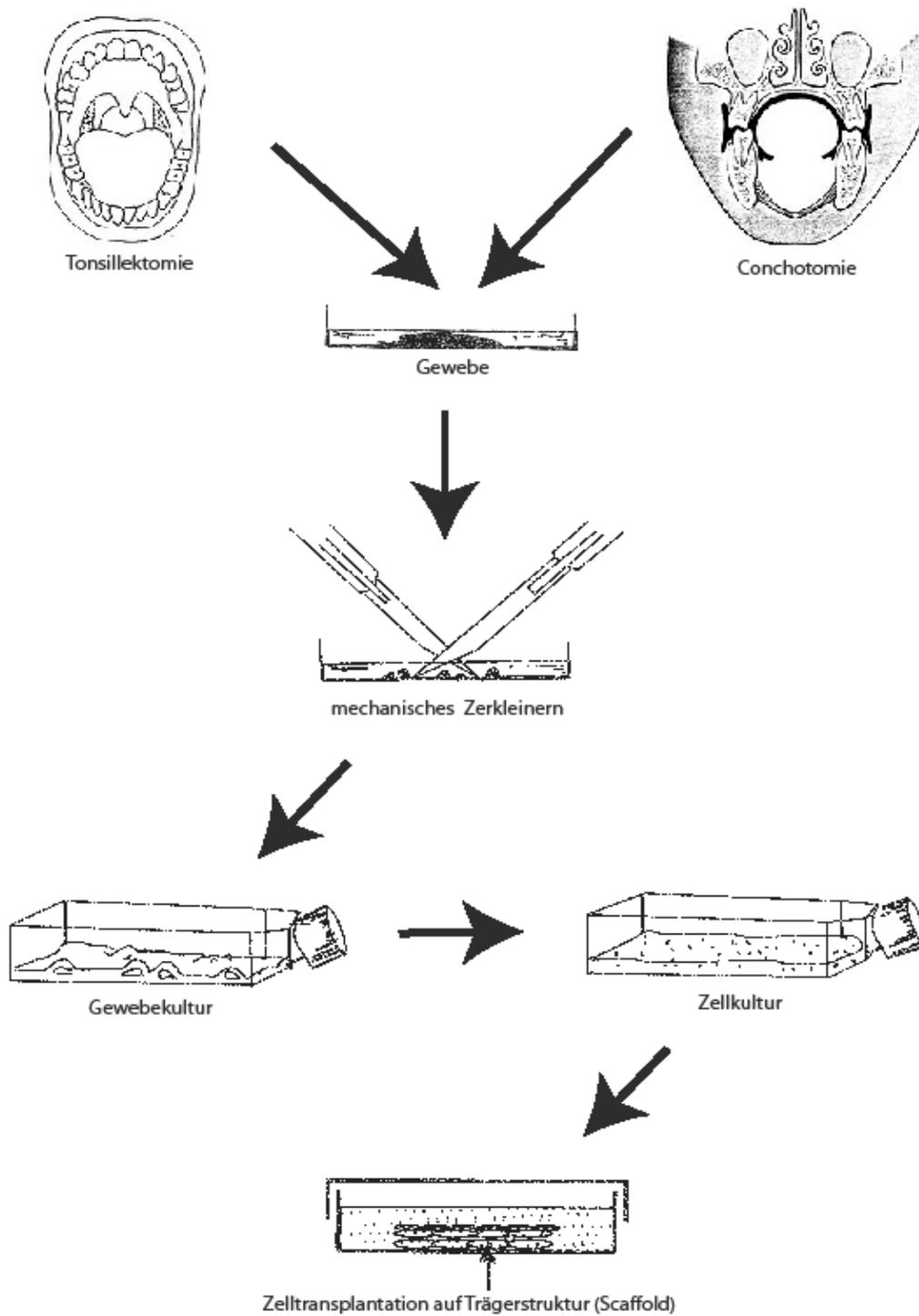


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Arbeitsschritte von der Gewebeentnahme bis hin zur Kultivierung der Zellen auf der Trägerstruktur.

Modifiziert aus: Freshney RI. Three-dimensional culture systems. In: Freshney RI, Alan R (eds.). Culture of animal cells. New York: Liss Inc., 1987

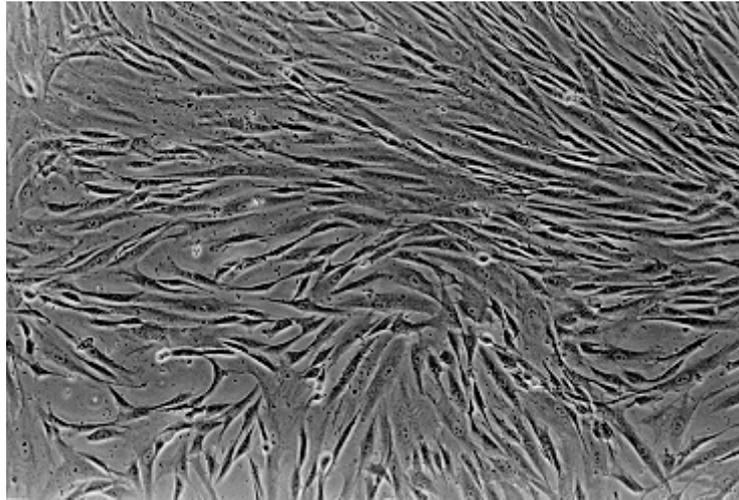


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt Fibroblasten aus dem Randschleier einer Gewebekultur. Die flächenhafte Ausbreitung der aus dem ausgesäten Mutterstück (nicht mit abgebildet) hervorwachsenden Zellen ermöglichen die mikroskopische Untersuchung. Die hier abgebildeten Zellen zeigten den für Fibroblasten typischen Phänotyp. Es finden sich langgestreckte, abgeflachte Zellen mit teils membranartigen, teils spießförmigen Fortsätzen. Die Zellen stehen durch verschiedene breite Zytoplasmafortsätze miteinander in Verbindung. (Vergrößerung: 100fach)

2.3 Spezielle Geräte

Für die Präparation:

Sterile Werkbank, HS18, Hera safe (Heraeus, Hanau)

Binokularauflichtmikroskop, Olympus IX50

Lichtquelle, Olympus U-LS30-3

Sterile Petrischalen 100x20 mm (TPP, Schweiz)

Skalpelle zum Einmalgebrauch, Stärke 10 und 15 (Feather Safety Razor CO., Japan)

Sterile Pinzetten

Sterile Einmalhandschuhe (Ansell GmbH, München)

OP – Mundschutz (3M Health Care, Borken)

OP – Haube (Dach, Deutschland)

Für die Kultivierung:

Sterile Zellkulturflaschen, 25 cm² (TPP® Schweiz)

Brutschrank Cytoperm 2 (Heraeus, Hanau)

Pipettierhilfe accu-jet® (Brand, Wertheim)

Sterile serologische Pipetten, 5, 10, 25, 50 ml (TPP®, Schweiz)

Chamberslide, Lab-Tek® II (Nalge Nunc International Corp./USA)

Sterile Petrischalen 36x12 mm kollagenbeschichtet (Heraeus, Hanau)

Sterile Petrischalen 100x20mm (TPP, Schweiz)

Formalin, Formaldehydlösung ca. 4 %, gepuffert pH 7,5 (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Für das Ernten und Aufbereiten der Zellen:

Zellschaber 24 cm (TPP®, Schweiz)

Eppendorf Probengefäße (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifugenröhrchen 50 ml, 114x28 mm (Sarstedt, Nürnberg)

Zentrifuge Megafuge 1.OR (Heraeus, Hanau)

Für die Kontrolle und Dokumentation des Zellwachstums:

Inversionsmikroskop (IX 50, Olympus) mit vorgeschaltetem Hoffmann –
Modulationskontrast EP 40 mm WD/ 0,5 na

Objekträger Superfrost® Plus (Menzel - Gläser®)

Mayer`s Hämalunlösung (Merk 9249, Merck, Darmstadt / Deutschland)

Eosinlösung gelblich (1%) (Merck 159335, Merck, Darmstadt / Deutschland)

Paraffineinbettkonsole mit Kühlstation (Sakura Tissue-Tek TEC, SYSMEX DIGITANA
AG, Horgen / Schweiz)

Mikrotom Micron Cool Cut HM 355 S (Micron International GmbH, Walldorf /
Deutschland)

Mikroskop (Axio Imager.A1, Carl Zeiss AG, Deutschland) mit Digitalkamera (AxioCam
MRc, Carl Zeiss AG, Deutschland)

Sputtermaschine (Edwards Scancoat Six, EDWARDS GmbH, Kirchheim /
Deutschland)

Rasterelektronenmikroskop / REM (Philips XL 30, Philips Medizin Systeme GmbH,
Hamburg / Deutschland)

2.4 Trägerstrukturen/Scaffolds (Herstellung und Eigenschaften)

Scaffold I. (Vlies), PET 150 µm Netz, PET Interlock (Bischoff Stickerei, Deutschland)

Gewaschen in PBS, Plasmaaktivierung, ausgelagert bei 60 °C 8 Tage, 60 RPM

Scaffold II. (Gestrick), PET 150 µm, kleiner Durchmesser 16 mm, großer Durchmesser 32 mm (Bischoff Stickerei, Deutschland), Gewaschen in PBS, Plasmaaktivierung, ausgelagert bei 60 °C 8 Tage, 60 RPM (Abbildung 8)

Scaffold III. (Geflecht), PET mesh 100 µm, Durchmesser 15 mm, med grade, steril und plasmaaktiviert (Bischoff Stickerei, Deutschland)

Tissue Vlies bestehend aus nativem bovinen Kollagen, steril, Typ 5,6mg Kollagen/cm³ (Immuno GmbH Heidelberg)

Plastik (sterile Zellkulturflaschen, sterile Petrischalen)

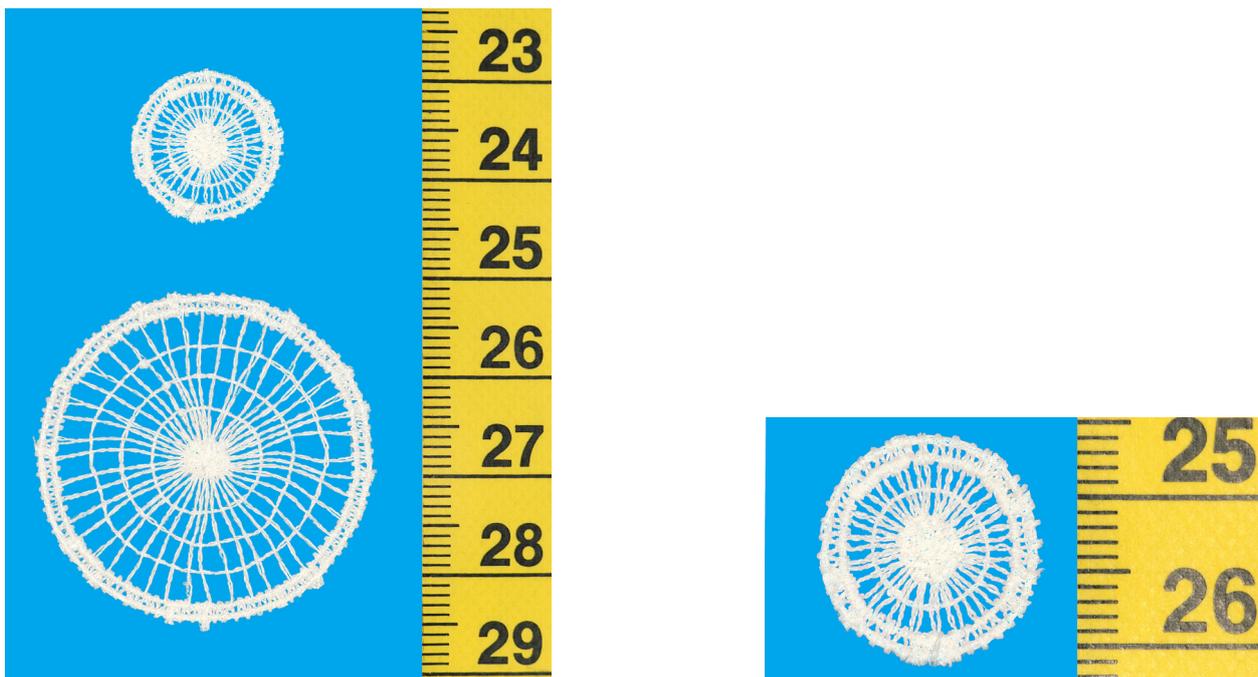


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt beide Varianten des Scaffold II, welche die anatomischen Merkmale eines Trommelfelles nachahmen.

2.5 Medien, Zusätze und Seren

Medium:

Dulbecco`s modifiziertes EAGLE Medium (DMEM) mit Natrium Pyruvat, 1000 MG/l (Biochrom AG, Berlin)

Zusätze zum Medium:

Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin)

Penicillin / Streptomycin, 10000 µg/ml (Biochrom AG, Berlin)

Gentamycin-ratiopharm, 80mg Gentamycin (2ml) (Ratiopharm GmbH, Deutschland)

HEPES Puffer 100ml Solution 1M (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Kulturmedium:

Dulbecco`s modifiziertes EAGLE Medium (DMEM) wurde mit Penicillin/Streptomycin und Gentamycin und HEPES Puffer versetzt, so dass jeweils eine 1%ige Anreicherung resultierte. Zusätzlich wurden 10% fetales Kälberserum zugesetzt.

2.6 Zellkultur

Die meisten Zellen müssen an einem Substrat haften, damit die Vitalfunktionen erhalten bleiben. In diesem Fall vermehren sie sich, bis sie den Boden des Kulturgefäßes mit einer Lage Zellen vollständig besiedelt haben (Monolayerkultur, Abbildung 9 links). Gewisse Zellen können sich im Nährmedium vermehren, ohne dass sie an einer Unterlage haften müssen. Diese Zellen bleiben in Suspension (Suspensionskultur, Abbildung 9 rechts). Beide Kulturen können aus einem einzigen Zelltyp oder aus einer Mischung verschiedener Zelltypen (co-culturing) bestehen. Unter co-culturing versteht man die Kultivierung von zwei oder mehreren Zelltypen die in einem gemeinsamen System überleben sollen.

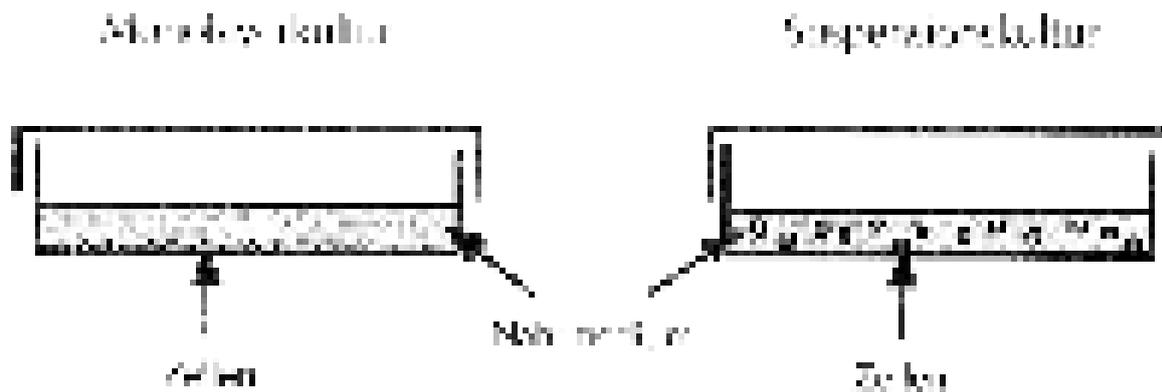


Abbildung 9. Aus: Wintermatel E, Ha SW. Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2002

In diesem Fall wurden Fibroblasten-Monolayerkulturen verwendet. Fibroblasten werden üblicherweise verwendet, wenn die Integrität von Zellmembranen, die Zelladhäsion an Oberflächen oder die Eigenschaften wie z.B. die mitochondriale oder lysosomale Zellaktivität untersucht werden sollen. Die in den Versuchen verwendeten Fibroblasten entstammen dem Bindegewebe oraler bzw. respiratorischer Mucosa (Primärzellkulturen). Die Primärzellkulturen wurden in einem CO²-Inkubator (37°C, 5% CO², 95% Luft, 100% Luftfeuchte) 6-8 Wochen (Abbildung 10) inkubiert und 2-3 mal geerntet. Das Kulturmedium wurde alle 5 Tage gewechselt (25 ml).

Die in den Primärzellkulturen gewonnenen Zellen wurden mechanisch vom Untergrund gelöst und in einem neuen Kulturgefäß auf das entsprechende Scaffold aufplattiert (Subkulturen).

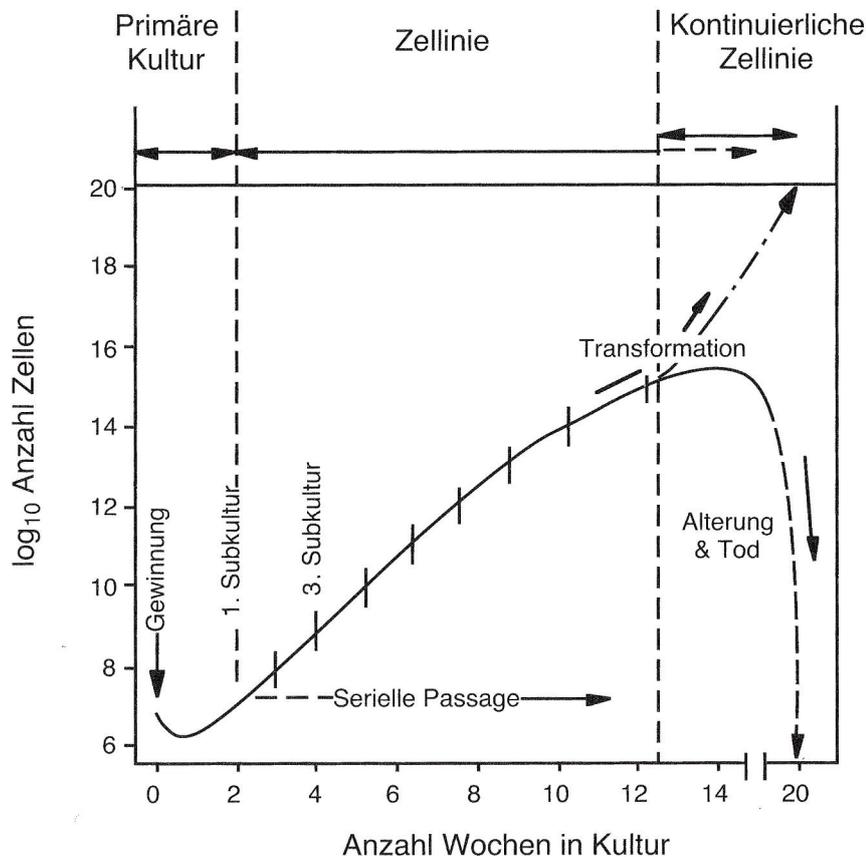


Abbildung 10: Die Entwicklung einer Zelllinie für einen hypothetischen Zelltyp. Der Zeitpunkt der Entstehung einer kontinuierlichen Zelllinie ist hier mit 12,5 Wochen angegeben. Bei menschlichen diploiden Fibroblasten ist dies nach etwa 30-60 Verdoppelungen der Zellzahl oder nach 20 Wochen in Kultur am wahrscheinlichsten.

Modifiziert aus: Freshney RI. Three-dimensional culture systems. In: Freshney RI, Alan R, eds.. Culture of animal cells. New York: Liss Inc., 1987

Entstandene Primärkulturen:

- Scaffold I: Vlies, Mundschleimhautexplantat nach Vorbereitung direkt aufgebracht

Es entstanden je nach verwendetem Scaffold verschiedenartige Subkulturen:

- Scaffold II: Gestrick, mit/ohne Kollagenfließ (ober- oder unterhalb), Zellen aus der Primärzellkultur vor/nach Zentrifugation aufplattiert
- Scaffold III: Geflecht, mit/ohne Kollagenfließ (ober- oder unterhalb), Zellen aus der Primärzellkultur vor/nach Zentrifugation aufplattiert

- Scaffold IV: Komposit-Graft (Kombination aus Geflecht und Gestrick), mit/ohne Kollagenfließ (ober- oder unterhalb), Zellen aus der Primärzellkultur vor/nach Zentrifugation aufplattiert

Als Trägermaterialien dienten die oben beschriebenen Scaffolds in unterschiedlichen Gestrickformen. Im ausgewogenen Verhältnis wurden jeweils mit bzw. ohne Kollagenfließ die Versuche durchgeführt. Das Kollagen, welches ursprünglich als Hämostyptikum entwickelt wurde, besitzt im trockenen Zustand eine glasartige, brüchige Struktur. Nach Benetzen dieser mit dem Kulturmedium wird das Kollagenfließ elastisch und erlangt eine eher gelatineartige Konsistenz.

Als Kulturmedium diente für alle Ansätze DMEM. Pro Chamberslide und kleiner Petrischale wurde jeweils 5 ml hinzu gegeben. Die Ansätze in den großen Petrischalen wurden mit 15 ml Kulturmedium bestückt. Das Medium in den kleinen Kulturgefäßen (Chamberslide und kleine Petrischale) wurde alle 2 Tage, das in den großen Petrischalen alle 4 Tage gewechselt, wobei das alte Medium ohne Beschädigung der Zell-Scaffold-Einheit abgesaugt und vorsichtig neues hinein pipettiert wurde. Gerade in den ersten Tagen musste vorsichtig hinzupipettiert werden, weil durch die Auftriebskraft sowohl das Kollagenfließ, als auch die Fibroblasten leicht ihre Anhaftung an das Scaffold verloren.

Die Subkulturen wurden in einem CO²-Inkubator (37°C, 5% CO², 95% Luft, 100% Luftfeuchte) 19-77 Tage (~3-11 Wochen) inkubiert. Das Wachstum wurde alle 2/3 Tage beim und zwischen dem Mediumwechsel unter dem Auflichtmikroskop kontrolliert.

Aus den Gewebepreparaten eines jeden Patienten wurde jeweils eine der oben genannten Subkulturen mit unterschiedlichen Ansätzen angelegt.

2.7 Nachweisverfahren und Präparateaufbereitung

Zur Kontrolle des Zellwachstums diente ein Inversionsmikroskop, so dass die Präparate in vitro alle 2/3 Tage dokumentiert werden konnten. Nach Kulturrende wurden die Präparate in 4 %iger Formalinlösung (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) fixiert.

Die Präparate wurden mit steriler Pinzette und Skalpell geteilt, sodass jeweils eine Präparatehälfte der histologischen Untersuchung und die andere der rasterelektronenmikroskopischen Aufarbeitung zugeführt werden konnte.

2.7.1 Histologie (HE-Färbung und initiale Auswertung)

Im Anschluss an die Fixierung wurde eine Dehydration, beginnend mit 50 % Ethanolalkohol (Merck EtOH, Darmstadt / Deutschland) über 60 %, 70 %, 2 mal 95 %, 2 mal 100% und endend mit 2 mal Xylol (Xylolersatz XEM-200, Vogel GmbH, Giessen / Deutschland) unterzogen.

Die Präparate wurden schließlich mit Hilfe der Einbettkonsole (Sakura Tissue-Tek TEC) in einem Paraffinblock eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Micron Cool Cut HM 355 S) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 10 µm.

Die HE-Färbung wird nach folgendem Protokoll vorgenommen:

Es ist Hämatoxilin (Mayer`s Hämalaunlösung Merck 9249), welche vor Gebrauch filtriert wurde, und 1 %ige wässrige Eosinlösung (Eosin gelblich Merck 15935) verwendet worden.

1. Deparaffinisierung

3 mal 5 Minuten in Dimethylbenzol (Xylol) tauchen

15 mal in 100 % EtOH tauchen

15 mal in 100 % EtOH tauchen

15 mal in 95 % EtOH tauchen

15 mal in 95 % EtOH tauchen

15 mal in 75 % EtOH tauchen

15 mal in diH²O tauchen

2. Baden der Präparate für 5 Minuten in Hämatoxilin

3. Präparate gründlich unter warmen Leitungswasser abspülen und 3 – 5 Minuten bläuen

4. Baden der Präparate für 5 Minuten in 1 %iger Eosinlösung

5. Abspülen der Präparate mit Aqua dest.

6. Präparate einmal kurz in 70 % EtOH tauchen
7. Präparate einmal kurz in 90 % EtOH tauchen
8. Präparate 2 Minuten in 100 % EtOH (vergällt) tauchen
9. Präparate 1 – 2 Minuten mit 100 % EtOH abspülen
10. Präparate 2 Minuten in Xylol tauchen
11. Präparate 2 Minuten in Xylol tauchen
12. Eindecken der Präparate mit De Pex (DePex-Eindeckmittel – SERVA, Heidelberg / Darmstadt)

Die initiale Auswertung geschah mit Hilfe der HE gefärbten Präparate. Das Bindegewebe / die interzelluläre Matrix färbte sich rot an. Die Zellkerne färbten sich blau. Diese Präparate geben einen Überblick über die Morphologie der Zellen, ihre räumliche Ausbreitung sowie über den Zell – Scaffold – Kontakt. Ebenso erkennt man den unterschiedlichen Aufbau der oben genannten Scaffolds. Begutachtet worden sind die Präparate unter dem Mikroskop (Axio Imager.A1) mit einer Vergrößerung von 10x, 20x, 40x und 50x. Durch eindeutige Nummerierung der Schnitte ließ sich ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Fibroblasten auf den Scaffolds erkennen und in fotografischer Form festhalten.

2.7.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die andere Hälfte der abzubildenden Präparate wurde zuerst auf spezielle Präparateträger geklebt, welcher eine selbsthaftende Oberfläche besitzt. Da die Präparate vor der Weiterverarbeitung trocken sein mussten, wurden ihnen in 48 Stunden mit Hilfe von Trockenperlen und einem Trockenschrank (Memmert Typ UE 200, Memmert GmbH, Schwabach / Deutschland) die Feuchtigkeit entzogen.

Nach dem Trocknen der Präparate folgte das Sputtern. Nichtleitende Proben müssen für das REM mit einer Schicht leitendem Metall (in diesem Fall Platin) überzogen werden, um Aufladungen bei der Bildakquirierung zu vermeiden und den Abtransport von Ladungen zu gewährleisten.

Um eine gleichmäßige Schicht zu erhalten werden im Sputtergerät (Edwards Scancoat Six) die Präparate im Vakuum unter Argondruck bedampft. Das Target besteht aus einer

Au-Pd-Legierung. Die Dicke der Schicht beträgt wenige nm, gerade so viel, dass ein zusammenhängender Film entsteht, der Abbildung und Spektroskopie nicht stört.

Arbeitsprotokoll:

1. Die Präparate gut trocknen und reinigen. Danach nur noch mit Pinzette und Handschuhen anfassen, um Verunreinigungen zu vermeiden!
2. Probenhalter mit Präparaten einlegen, Kammer gut verschließen und evakuieren
3. Über Nadelventil Kammer 3 mal evakuieren und mit Argon fluten
4. Gewünschte Sputterzeit (5 Minuten) einstellen
5. Präparate bedampfen
6. Kammer belüften , Präparate entnehmen und Kammer abpumpen

Anschließend wurden die Präparateträger im REM auf eine Platte gesteckt. Dadurch konnten die Träger in nahezu jede beliebige Stellung gedreht werden und verschiedenste Ansichten des zu photographierenden Objektes sind möglich. Die Kammer des REM (Abbildung 12) wurde verschlossen und ein Vakuum hergestellt. Das Vakuum ist nötig, damit die Kathode durch Überschläge nicht zerstört wird.



Abbildung 11: Innenansicht des REM

Die Bilder wurden digital aufgenommen und direkt an einen PC übertragen. Dort können die Bilder sofort auf ihre Qualität geprüft und falls nötig nachbearbeitet werden.

3.0 Ergebnisse

3.1 Scaffold I

3.1.1 In vitro

Die Grundstruktur von Scaffold I ähnelt dem eines Geflechtes. Die längs und quer miteinander verwebten Faserbündel bestehen aus einzelnen, verdrillten Fibrillen. Das Scaffold I wies vor Versuchsdurchführung auf Grund seiner Tiefe eine geringe Lichtdurchlässigkeit auf.

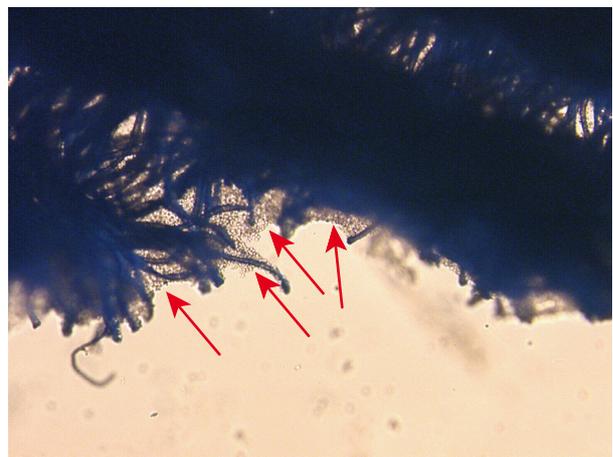
Insgesamt wurden zwei der Trägerstrukturen mit Gewebe der oralen Mucosa kultiviert. Die Kulturdauer betrug 56 Tage. Das Fibroblastenmuttergewebe wurde leicht exzentrisch aufplattiert. Die alle 3 Tage durchgeführte Auflichtmikroskopie konnte bis zum 21. Tag keinen Nachweis für sich ausbreitende Zellen erbringen. Danach ließen sich einzelne Zellverbände in einem diskontinuierlichen Radius um das Muttergewebe in den engen Interfibrillarräumen eruieren (Abbildung 13). Das Zellwachstum ragte teils bis an die Randstruktur des Scaffolds (Abbildung 12). Makroskopisch als auch Auflichtmikroskopisch waren größere Anteile der Faser-/Fibrillenzwischenräume nicht mit zellulärem Gewebe durchwachsen (Abbildung 13). An den Kontrolltagen 42, 45 und 48 zeigte sich mikroskopisch kein weiter fortschreitendes Wachstum, so dass die Kulturen anschließend fixiert wurden (Abbildung 14).

Abbildung 12:

Hier zeigt sich der Randbereich von Scaffold I. Ein girlandenförmiger Zellbewuchs (rote Pfeile) imponiert zwischen den aufgelockerten Fibrillen.

Kulturdauer: 33 Tage

Vergrößerung: 20fach



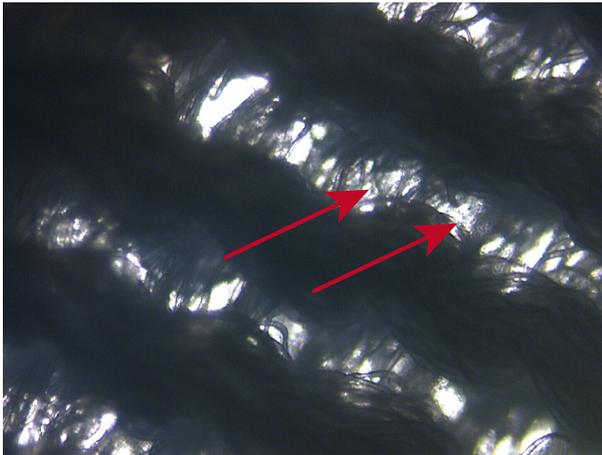
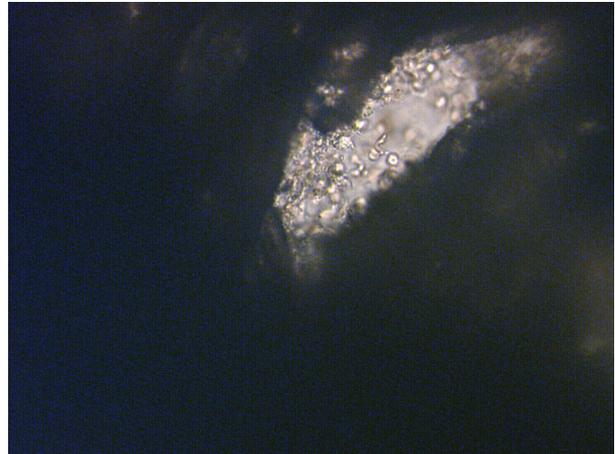


Abbildung 13:
Dicht gelagerte Fibrillen (Längsstrukturen) der querverlaufenden Faserbündel. An den Pfeilmarkierungen sichtbare Zellverbände zwischen den Fibrillen. Die Überbelichteten Areale sind nicht bewachsen.
Kulturdauer: 42 Tage
Vergrößerung: 20fach

Abbildung 14:
Ausschnittsvergrößerung (40fach) der vorgenannten Zellansammlung (Abbildung 13). Zellen teils apoptotisch abgerundet. Durch Mehrschichtigkeit des Zellverbandes keine eindeutige scharfe Darstellung möglich.
Kulturdauer: 42 Tage



3.1.2 Histologie

Die histologische Auswertung der fixierten Präparate zeigte hingegen einen nahezu durchgängigen Bewuchs der Trägerstruktur (Abbildung 15). Es fanden sich Areale mit stärkerer und schwächerer Anfärbung. Das Wachstum der Zellen orientierte sich an dem Fibrillenverlauf des Geflechtes (Abbildung 16). Die Zellausbreitung begann am Muttergewebe und schritt radiär entlang der Fibrillen fort (Abbildung 17 a und b). Die Oberfläche der Fibrillen erschien eben und unverändert. Die Fibrillen wurden von den Zellen und ihrer extrazellulären Matrix eingeschleitet (Abbildung 17 b).

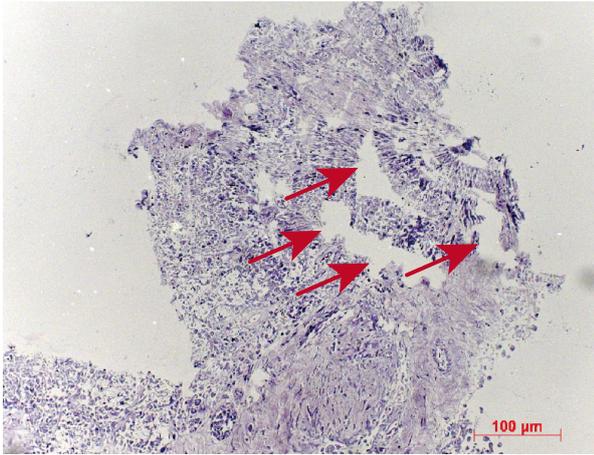


Abbildung 15:
Übersicht eines dichten Zellrasens. Vereinzelt zeigen sich diskontinuierliche Abschnitte (rote Pfeile) innerhalb des Zellrasens. Diese sind als färbe- und schnittbedingte Artefakte anzusehen. Es sind keine Anschnitte der Trägerstruktur zu erkennen. Die Ausrichtung des Zellwachstums variiert innerhalb dieses Präparates.
Kulturdauer: 56 Tage

Abbildung 16:
In der Ausschnittsvergrößerung zeigen sich ebenfalls unterschiedliche Wachstumsrichtungen einzelner Zellverbände. Maßgeblich sind die Gestikstruktur und die Gestikdicke dafür verantwortlich.
Kulturdauer: 56 Tage

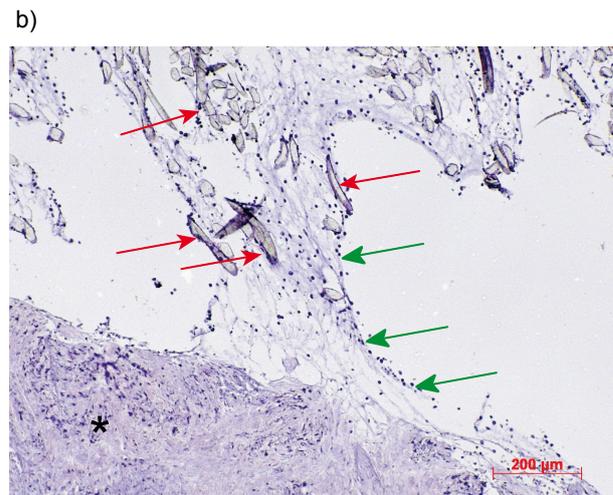
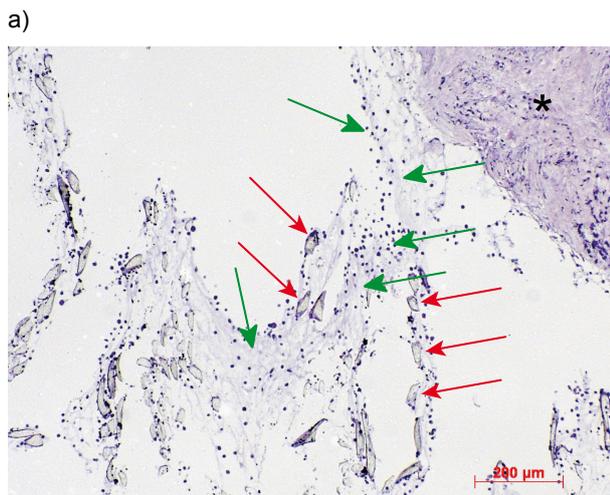
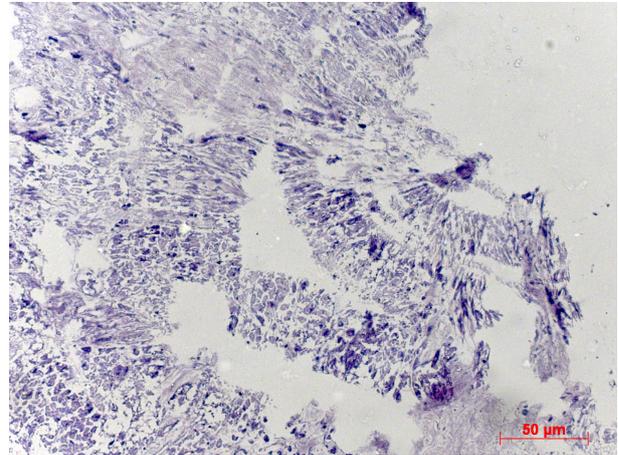


Abbildung 17 a und b:
Das dunkel gefärbte Gewebe stellt das aufplattierte Mutterstück dar (schwarzer Stern). Davon ausgehend wachsen Zellverbände (grüne Pfeile) entlang der Fibrillen (rote Pfeile) in die Peripherie.
Kulturdauer 56 Tage

3.2 Scaffold II

3.2.1 In Vitro

Die Grundstruktur von Scaffold II entspricht einem Gestrück. Die acht angefertigten Präparate wurden histologisch und mittels REM untersucht.

Das Zellwachstum ließ sich *in vitro* schneller und einfacher nachvollziehen, als bei Scaffold I. Ein ausbreitendes Wachstum der Fibroblasten konnte schon nach 12 Tagen im Auflichtmikroskop festgestellt werden (Abbildung 23). Primär wurden die Faserbündel besiedelt, so dass Zellverbände schon ab dem 22. Tag bis zum Randbereich vorgewachsen waren (Abbildung 22). Von den Faserbündeln ausgehend fand ein flächiger Bewuchs der Zwischenräume statt. Eine unvollständige Zellfläche innerhalb der Faserbündelzwischenräume wurde ab dem 25. Tag beobachtet (Abbildung 18). Eine durchgängige Fibroblastenschicht in den Zwischenräumen wurde am 29. Tag gefunden. Die im Zentrum der Trägerstruktur liegenden Zwischenräume wurden chronologisch früher durch eine Zellschicht verschlossen (Abbildung 19). Die peripheren Zwischenräume blieben teils unbewachsen oder unvollständig verschlossen. Als unterstützende Leitstruktur für den Bewuchs der Zwischenräume dienten einzelne Fibrillen, welche sich aus dem Verbund der Faserbündel gelöst hatten (Abbildung 19-21).

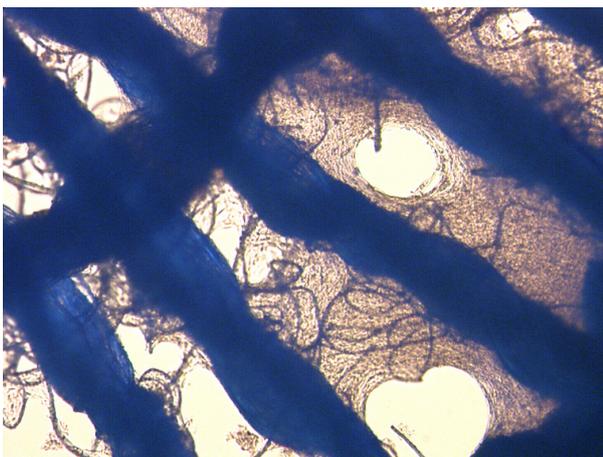
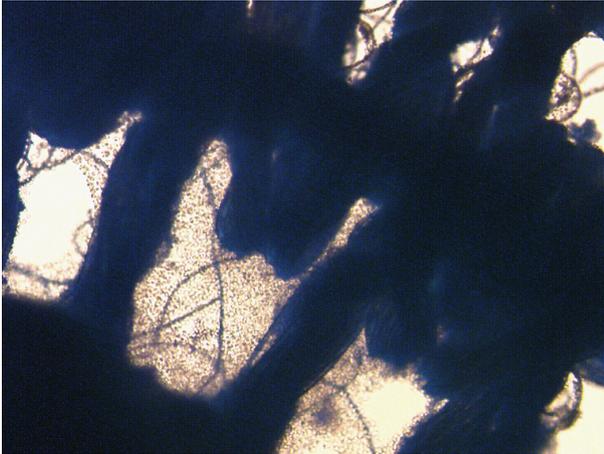


Abbildung 18:
Typisches Zellwachstum zwischen den Fasern des Gestrückes aus den Eckbereichen der Faserbündel radiär bis in das Zentrum.
Kulturdauer: 25 Tage
Vergrößerung: 10fach

19)



20)

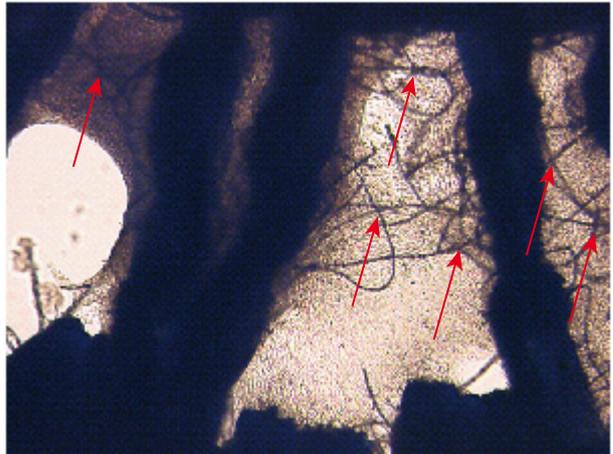


Abbildung 19 und 20:

Zugewachsenes Segment des Gestrückes mit partieller Besiedlung der Nachbarsegmente nach 29 Tagen Zwischen den Faserbündeln liegen herausgelöste Fibrillen (Pfeilmarkierung).

Vergrößerung: 20fach

Abbildung 21:

Detailvergrößerung des in Abbildung 20 beschriebenen Segmentes bei 40facher Vergrößerung.

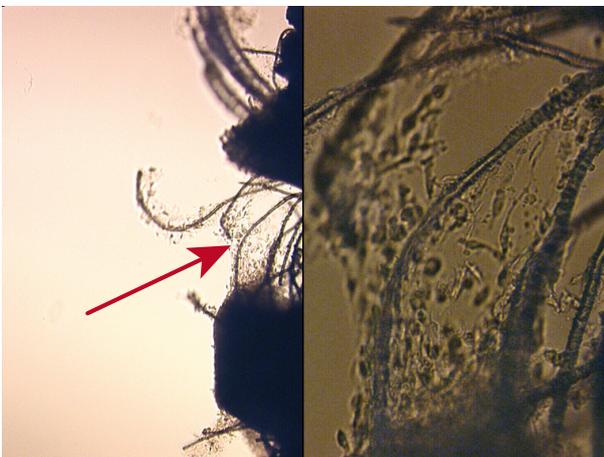
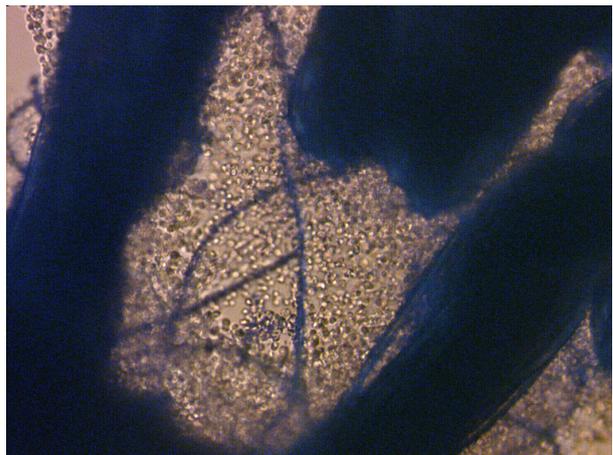
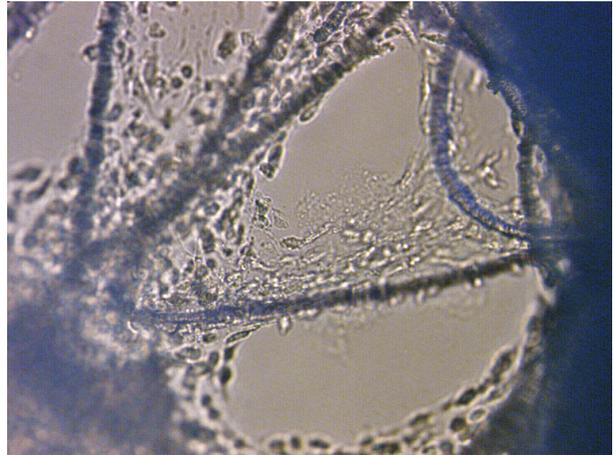


Abbildung 22:

Zelladhäsion auf den Einzelfilamenten der Peripherie (roter Pfeil) des Gestrückes nach 22 Tagen (links Übersichtsvergrößerung: 4fach ;rechts Ausschnittsvergrößerung der Pfeilmarkierung: 40fach)

Abbildung 23:
Aussprossende Fibroblasten auf den Einzelfilamenten im
Zentrum des Gestrückes. Kulturdauer 13 Tage
Vergrößerung: 40fach



3.2.2 Histologie

Die radiär und zirkulär zueinander ausgerichteten Faserbündel bestanden aus einzelnen Fibrillen unterschiedlicher Form und Durchmessers (Abbildung 26).

Eine unbehandelte Unterlage eines Tissue Vlies (Kollagen) bewirkte keinen Vorteil für das Zellwachstum auf dem Scaffold. Es zeigte sich keine Adhärenz zwischen Kollagen-Vlies und Scaffold bzw. Zellmaterial. Das Zellwachstum orientierte sich flächenhaft auf der Oberfläche des Scaffold (Abbildung 24). Nach Applikation des Nährmediums auf das Kollagen-Vlies und manueller Impression des Scaffold in selbiges, vermochte das Tissue Vlies allerdings doch als hilfreiche Leitstruktur für das Zellwachstum zu dienen. Es zeigte sich eine von der Scaffoldoberfläche über den Randbereich auf die Unterfläche durchgängig gewachsene Zellschicht (Abbildung 25). Das Zellwachstum beschränkte sich nicht nur auf die Oberfläche der Trägerstruktur. Auch kleinste Spalträume zwischen den Fibrillen wurden besiedelt (Abbildung 26 und 27). Dieses Ereignis wird im weiteren Verlauf als interfibrilläres Wachstum bzw. interfibrilläre Zellen beschrieben. Im Vergleich zu den aus dreieckigen Fibrillen bestehenden Faserbündeln, fand sich weniger zelluläres Material zwischen den aus kreisförmigen Fibrillen zusammengefügt Faserbündeln (Abbildung 28 und 29). Die Zwischenräume der Faserbündel in einer Spannweite von 100 – 150 μm wurden mühelos durch eine mehrschichtige Zellschicht überbrückt. Diese Gewebeschicht erreichte eine Höhe von ca. 180-200 μm (Abbildung 30). Das in vitro beobachtete Wachstum entlang der

Faserbündel und das Wachstumsverhalten an den Zwischenräumen konnte histologisch in der Abbildung 31 nachvollzogen werden.

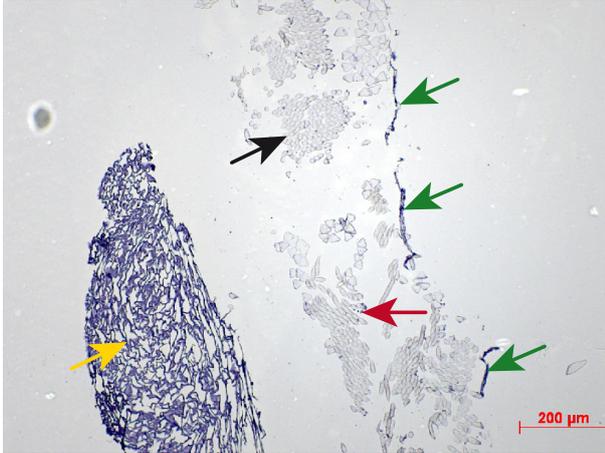


Abbildung 24:
Mittig sind Quer- (schwarzer Pfeil) und Längsanschnitte (roter Pfeil) eines Faserbündels des Gestricks zu erkennen. Rechts davon aufgelagert eine artifiziell diskontinuierliche Zellschicht (grüne Pfeile). Links unten im Bild findet sich der Anschnitt des Kollagenfließ (gelber Pfeil), welches durch Fixierung und Schnitt vom Trägermaterial abgelöst hat.
Kulturdauer: 66 Tage

Abbildung 25:
Histologie eines gesamten Querschnittes des Gestricks. Rechts im Bild ist der Randbereich des Trägermaterials zu erkennen (rote Pfeile). Im Zentrum ist das Trägermaterial herausgelöst. Es zeigt sich eine durchgängige, aus Kollagen und Zellen bestehende Schicht, welche über den Randbereich die Ober- und Unterfläche des Scaffold verbindet (grüne Pfeile).
Kulturdauer: 49 Tage

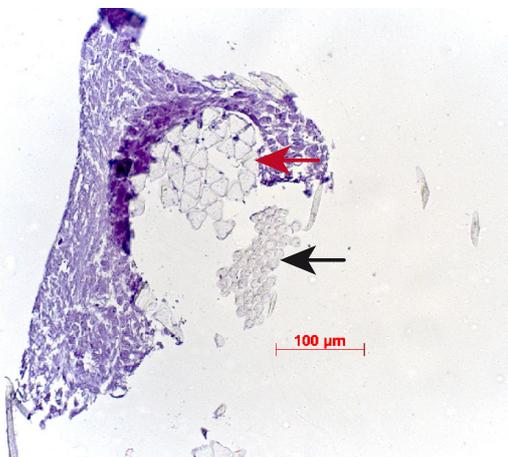
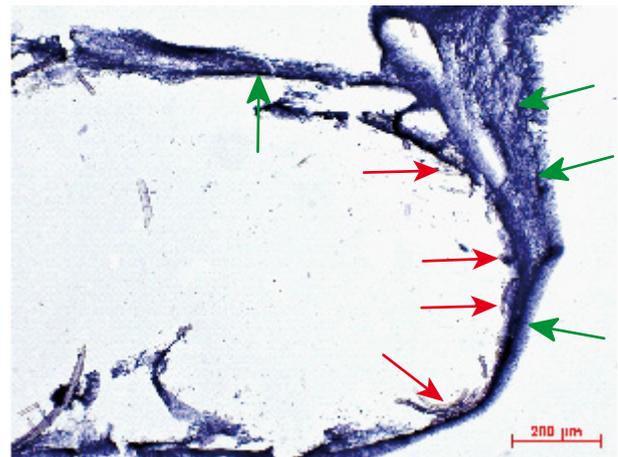


Abbildung 26:
Das Trägermaterial besteht aus unterschiedlichen Fibrillen (dreieckiger und runder Querschnitt; roter und schwarzer Pfeil), welche zu einzelnen Fasern gebündelt werden. Die Zellen wachsen nicht nur auf der Oberfläche der Fasern, sondern stabilisieren die gesamte Trägerstruktur durch interfibrilläres Wachstum.
Kulturdauer: 48 Tage

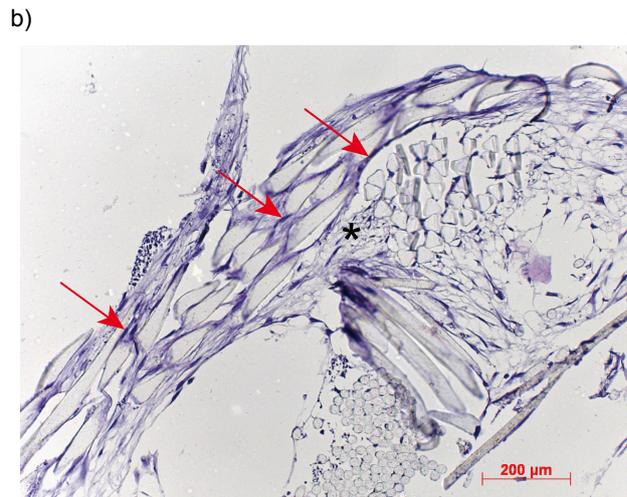
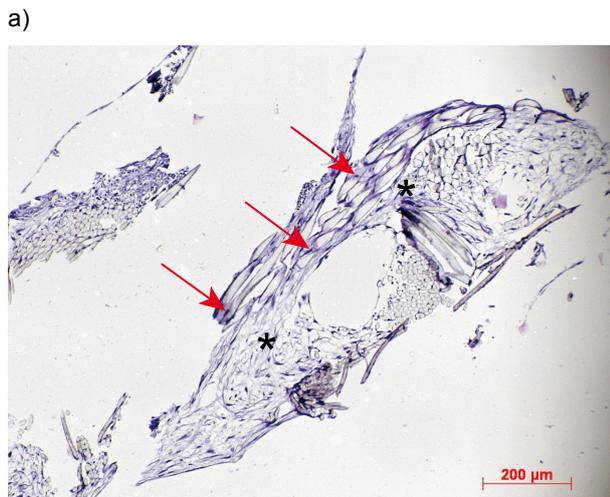


Abbildung 27 a und b:

Die interfibrillären Zellen legen sich dicht an die Oberfläche der Fibrillen an (rote Pfeile). Die Abschnitte zwischen den unterschiedlichen Faserbündeln werden durch die Fibroblasten und ihrer extrazellulären Matrix überbrückt (Sterne).

Kulturdauer: 47 Tage

Abbildung 28:

Die Fibrillen mit rundem Querschnitt sind dichter gelagert und werden weniger von zellulären Material durchbaut (schwarze Sterne), als die Fibrillen mit dreieckigem Querschnitt (roter Stern; siehe auch Abbildungen 26 und 27).

Kulturdauer: 47 Tage

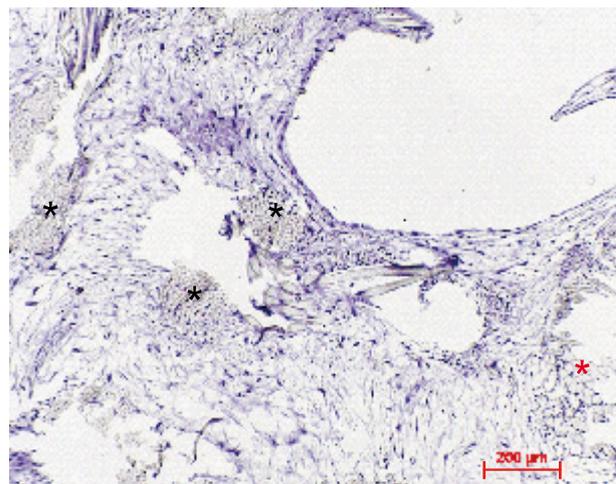
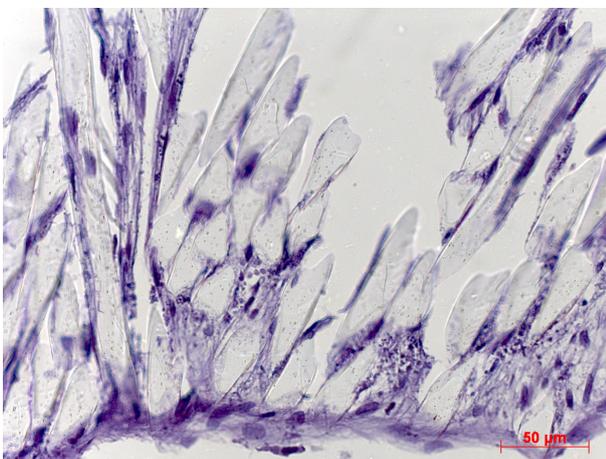


Abbildung 29:

Zwischen den Fibrillen zeigt sich ein um- und übergreifendes Zellwachstum.

Kulturdauer: 47 Tage



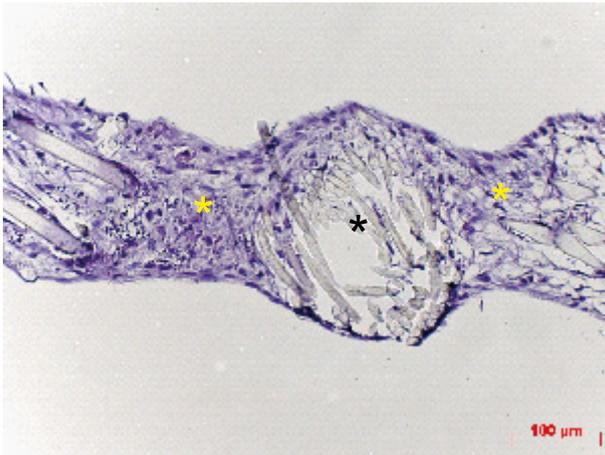
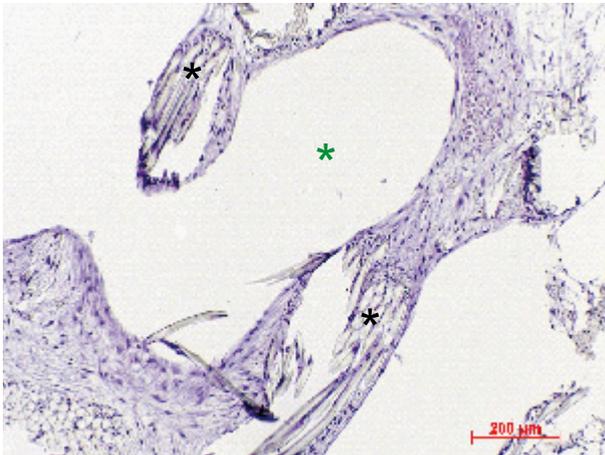


Abbildung 30:

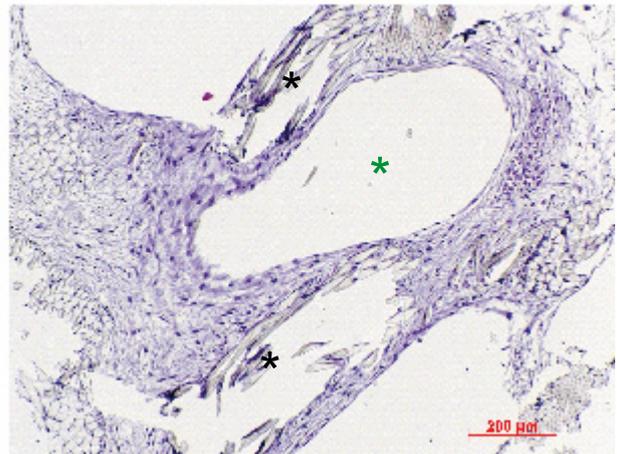
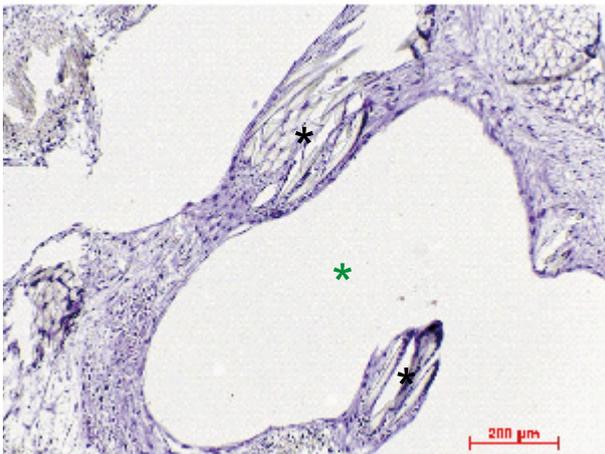
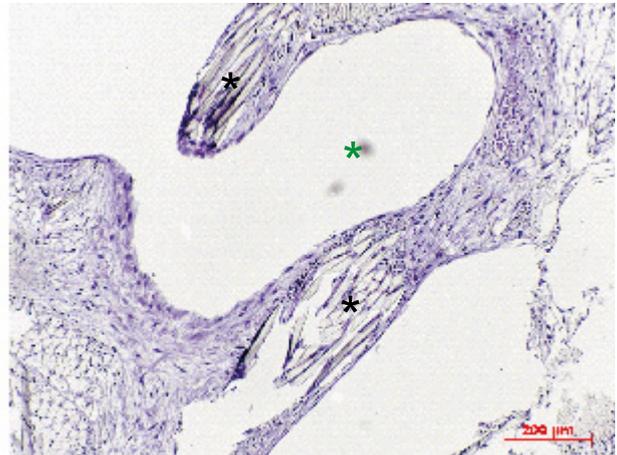
Querschnitt durch Scaffold II. In der Bildmitte befinden sich die runden Fibrillen, welche teils tangential angeschnitten wurden (schwarzer Stern). Auch hier sieht man nur vereinzelte Zellkerne in dem engen interfibrillären Raum. Der Kontakt zwischen den verschiedenen Faserbündeln nach links, wie auch nach rechts, ist durch einen starken Zellverbund sichergestellt (gelbe Sterne). Die Höhe der Gewebeschicht beträgt ca. 180-200µm (linker gelber Stern).

Kulturdauer: 47 Tage

a)



b)



c)

d)

Abbildung 31 a-d: Die Abbildungen a-d verdeutlichen histologisch die Ergebnisse der Abbildung 19. Die Zellen wachsen entlang der vorgegebenen Trägerstruktur (schwarze Sterne). Zusätzlich wird der Freiraum zwischen den Fasern radiär verschlossen (grüne Sterne). Die Mehrschichtigkeit des Zellrasens ist an den Randanschnitten zu erkennen. Kulturdauer: 47 Tage

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Der oben genannte Aufbau des Scaffold II ließ sich in den Abbildungen 32 und 33 deutlich erkennen. Durch die rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurde ein Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Zellbeschickung der Trägerstrukturen erkannt. Die aufplattierte Zellsuspension vermochte einen flächenmäßig größeren Bewuchs des Scaffold in kürzerer Zeit zu erreichen (Abbildung 32), als eine direktes Aufbringen eines Gewebeexplantates (Abbildung 33). Das Zellwachstum orientierte sich abermals entlang der Faserbündel (Abbildung 33). Die zentralen Faserbündelzwischenräume und diejenigen, in welche gelöste Einzelfilamente ragten, wurden von den Zellen bevorzugt besiedelt und früher verschlossen (Abbildung 34 und 35). Die Zellschichtoberfläche erschien in den Zwischenräumen homogen und eben. Vereinzelt zeichnete sich die darunter befindliche Oberfläche der Trägerstruktur ab. Risse in der Zellschicht fanden sich sowohl innerhalb der Gewebefläche, als auch an den Avital-Vital-Grenzen (Abbildung 35). Bei höherer Vergrößerung wurde ersichtlich, dass die einzelnen Fibrillen regelrecht in die zelluläre Matrix eingebettet waren (Abbildung 36). Die Zellen drangen über kleinste Spalte zwischen die Fibrillen und setzten dort ihr Wachstum fort (Abbildung 37).

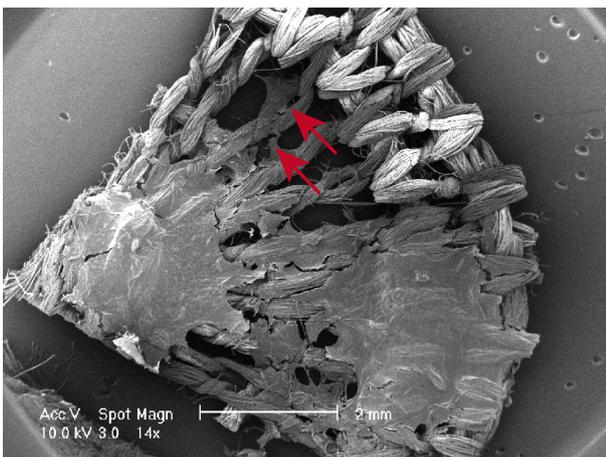


Abbildung 32:
Übersicht über ca. ein Viertel des Präparates. Von der nach links zeigenden Präparatspitze über den mittleren Abschnitt bis an den Präparatrand ist eine nahezu einheitliche Zellschicht gewachsen. Über die radiär verlaufenden Faserbündel zeigt sich ein fortgeleitetes Wachstum (rote Pfeile) fast bis an den oberen Abschnitt des Präparatrandes. Zelltransplantation nach Zellkultur.
Kulturdauer: 47 Tage

Abbildung 33:

Übersicht über die Hälfte eines gleichen Präparates. Hierbei wurde das Gewebe- explantat (roter Pfeil) direkt auf dem Scaffold positioniert. Es zeigt sich ein geringes, flächenhaft ausgeprägtes Zellwachstum.

Kulturdauer: 56 Tage

Es lässt sich der Aufbau der Faserbündel aus einzelnen Fibrillen erkennen. Die Bündel sind in radiärer und zirkulärer Orientierung durch Sticktechnologie miteinander verknüpft.

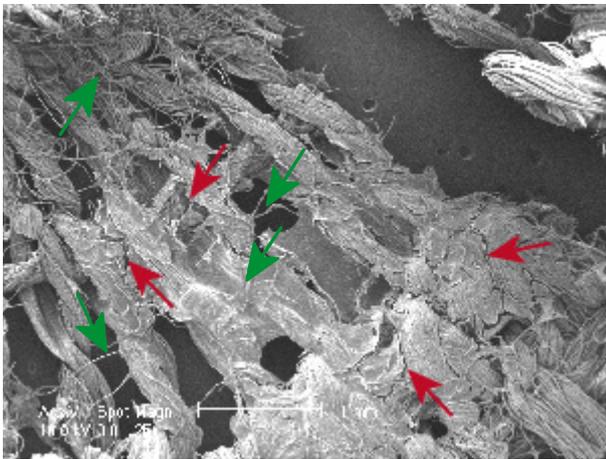
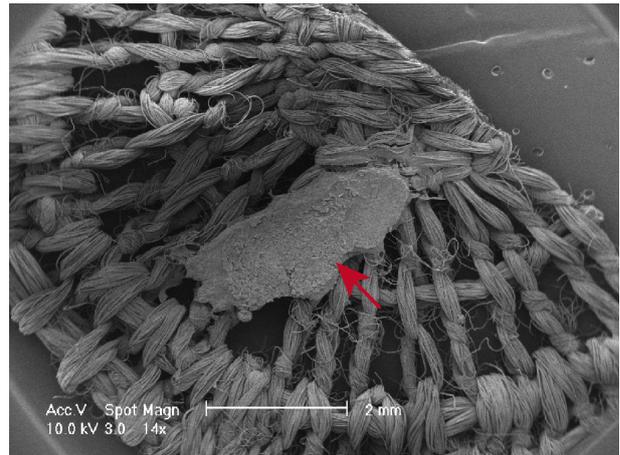
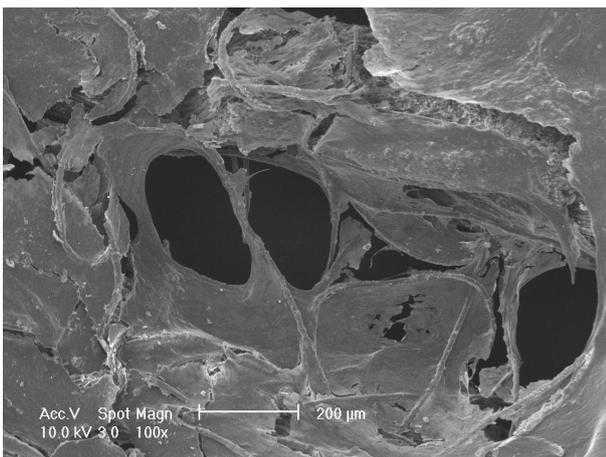


Abbildung 34:

Bei höherer Vergrößerung imponieren einzelne, aus den Faserbündeln herausgelöste Fibrillen (grüne Pfeile), die das Flächenwachstum in den Zwischenräumen begünstigen und die entstandene Zellmembran stabilisiert. Es entstanden beim Vorbereiten zur Rasterelektronenmikroskopie spannungsabhängige Risse (rote Pfeile) in der Zellmembran.

Kulturdauer: 47 Tage

a)



b)

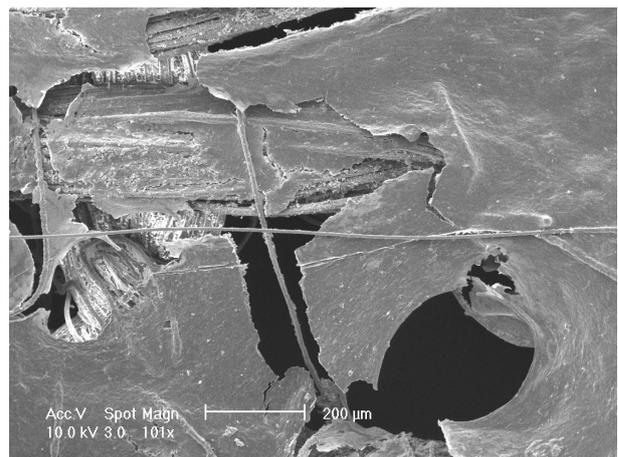


Abbildung 35 a und b:

Zwischen den Faserbündeln verlaufende Fibrillen, die als Leitstruktur für das Zellwachstum dienen. Die Zellschicht umhüllt einzelne Fibrillen, sowie die Faserbündel. Die Zellmembranoberfläche erscheint auf weiten Strecken gleichmäßig und eben.

Kulturdauer: 47 Tage

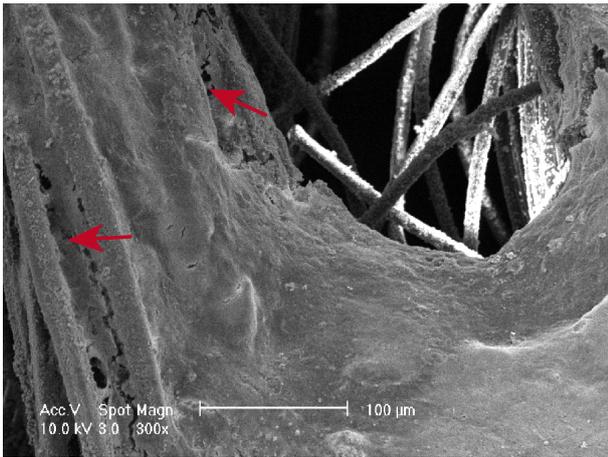
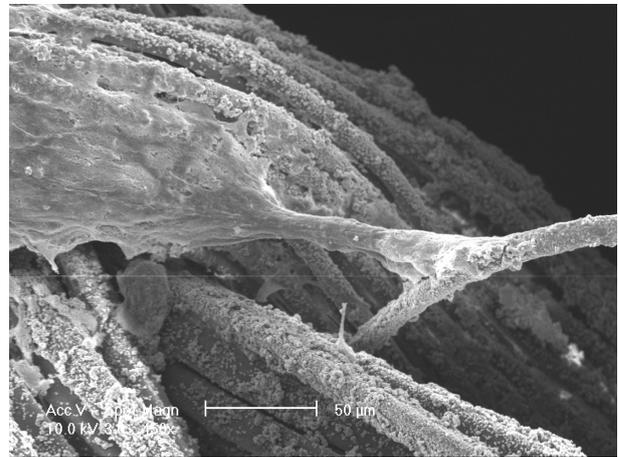


Abbildung 36:
Die Fibrillen werden komplett von den Fibroblasten umwachsen. Wie in Abbildung 27 a und b zieht die Zellschicht ebenfalls in den interfibrillären Raum (Pfeilmarkierungen).
Kulturdauer: 66 Tage

Abbildung 37:
Bei dieser Trägerstruktur manifestiert sich das Zellwachstum nicht ausnahmslos auf der Scaffoldoberfläche. Zellausläufer erstrecken sich bis in die schmalen Spalten zwischen den Fibrillen.
Kulturdauer: 66 Tage

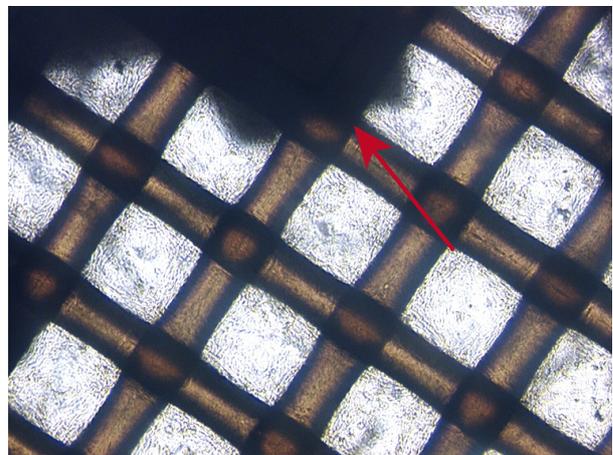


3.3 Scaffold III

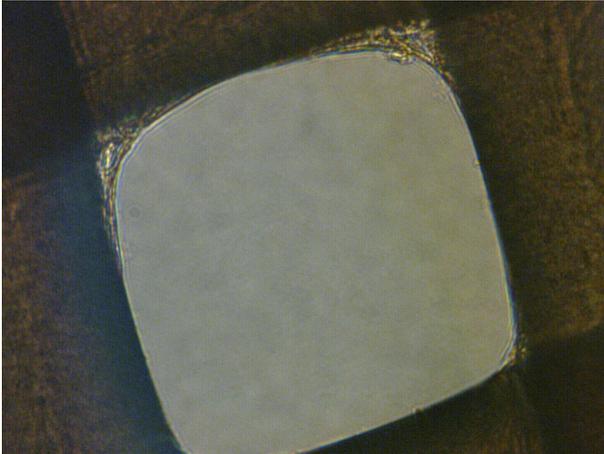
3.3.1 In vitro

Von den acht kultivierten, geflechtartigen Scaffolds wurden sieben komplett und nur eine Trägerstruktur partiell bewachsen. Die Position des aufplattierten Zellkonglomerates ließ sich durch seine geringere Transluzenz erörtern (Abbildung 38). Nach 23 Tagen wurde eine merkliche Dickenabnahme (= erhöhte Transluzenz) dessen beobachtet (Abbildung 42). Ausgehend hiervon, konnte ab dem zweiten Tag ein flächenhaftes Wachstum der Fibroblasten im Auflichtmikroskop beobachtet werden. Der zelluläre Verschluss der Faserzwischenräume begann an den Faserkreuzungsstellen. Die Zellen näherten sich konzentrisch an und überbrückten so die Maschen des Geflechtes. Nach 19 Tagen war eine Masche fast vollständig durch eine Zellschicht überwachsen (Abbildung 39). Die Abbildungen 40 und 41 zeigen das Zellwachstum nach 9 und 13 Tagen in der Aufsicht mit kleinerer Vergrößerung. Außer dem konzentrischen Wachstum ließ sich keine weitere Regelmäßigkeit oder Systematik erkennen, in welcher der zelluläre Verschluss innerhalb des Scaffold voranschritt (Abbildung 41). Der früheste vollständige Bewuchs des Scaffold konnte am 22. Tag festgestellt werden (Abbildung 42). Die Randbereiche des Scaffold wurden ebenfalls vollständig von dem Zellwachstum einbezogen. Es blieben kleine konkave Gewebeeinziehungen zwischen den Fasern im Randbereich übrig (Abbildung 43).

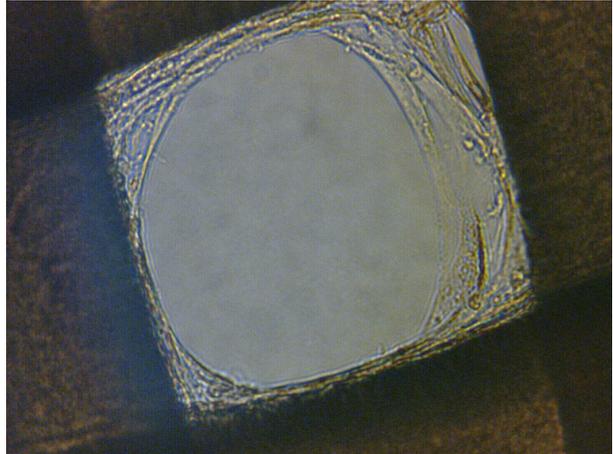
Abbildung 38:
Residuen des Gewebeexplantates (roter Pfeil) mit
vollständig zugewachsenen Maschen.
Kulturdauer: 22 Tage
Vergrößerung: 10fach



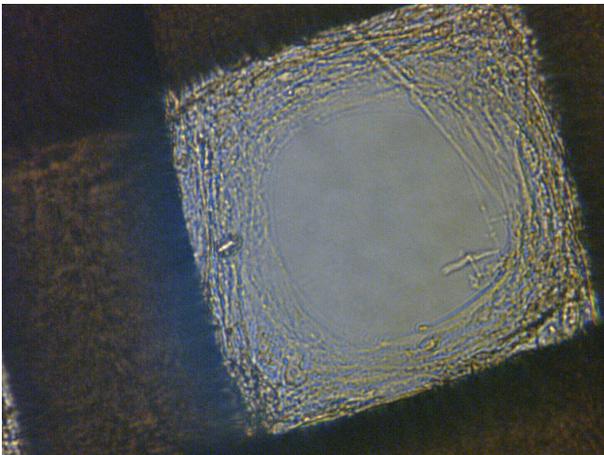
a)



b)



c)



d)

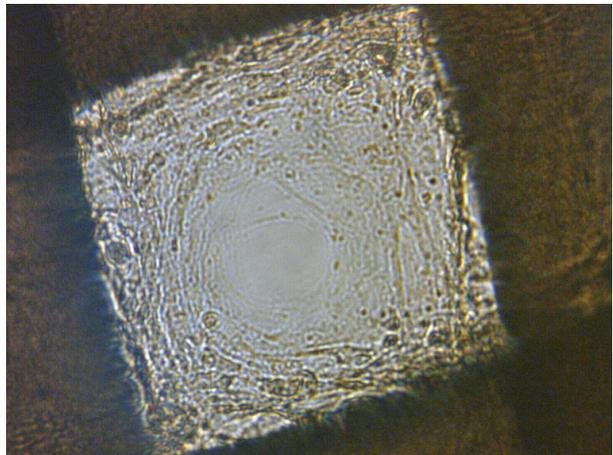
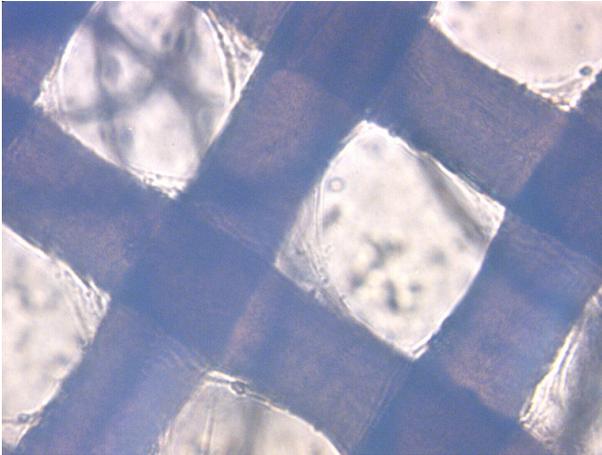


Abbildung 39 a-d:

Zeitliche Abfolge des radiär gerichteten Zellwachstums in den Scaffoldmaschen nach a) 3 Tagen , b) 8 Tagen, c) 13 Tagen und d) 19 Tagen.

Vergrößerung: 40fach

a)



b)

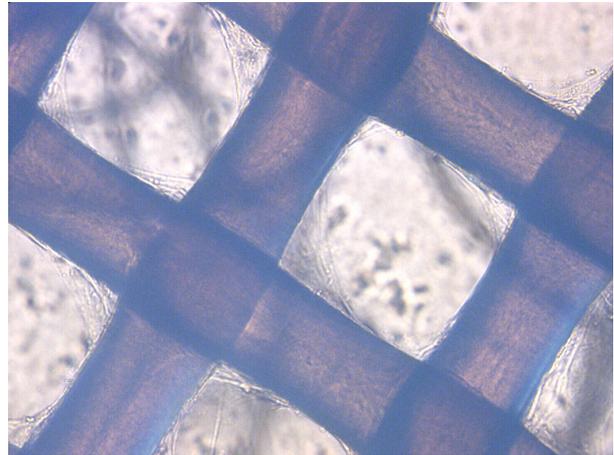


Abbildung 40 a und b:

Beginnender Bewuchs durch die Fibroblasten in den Eckbereichen der Maschen. Kulturdauer 9 Tage.

Vergrößerung: 20fach

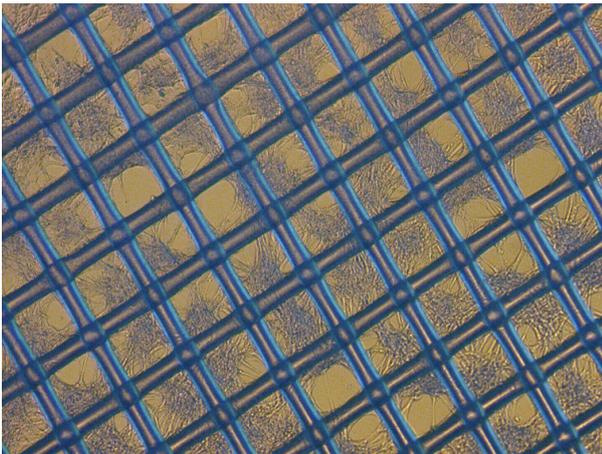


Abbildung 41:

Partieller Bewuchs des PET-Geflechtes
mit Fibroblasten.

Kulturdauer: 13 Tage

Vergrößerung: 4fach

Abbildung 42:

Vollständig durch flächiges Zellwachstum
geschlossene Maschen. Die Stellen
geringerer Transluzenz (rote Sterne)
werden durch die aufplattierten
Zellkonglomerate begründet.

Kulturdauer: 23 Tage

Vergrößerung: 2fach

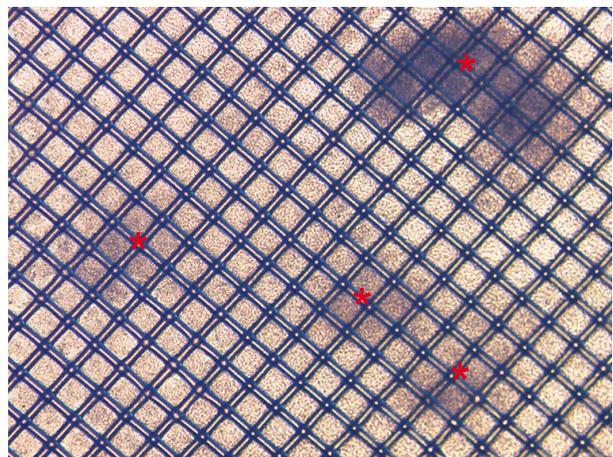
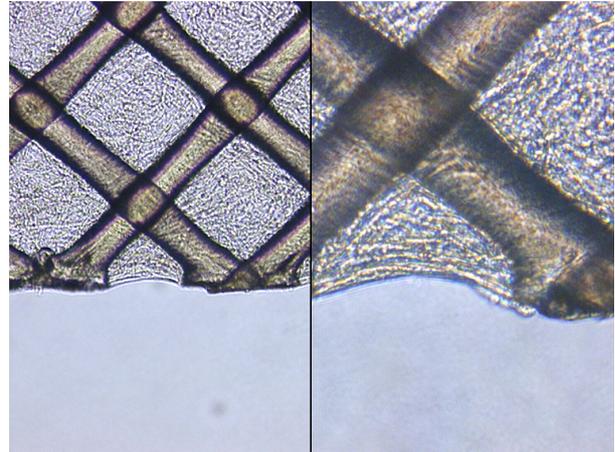


Abbildung 43:
Ausschnittsvergrößerung vom Rand des
oberhalb gezeigten Präparates. Es zeigt
sich ein deutliches Umwachsen des
Trägermaterials.
Vergrößerung links: 10fach
Vergrößerung rechts: 20fach



3.3.2 Histologie

Die Längsschnitte des Scaffold in unterschiedlichen Schnittdicken zeigten eine einheitliche Zellschicht (Abbildung 44 und 45). Die Ausrichtung der Zellen und deren extrazellulären Matrix war an den Faserkreuzungsstellen senkrecht zueinander (Abbildung 48 und 49), wohingegen sich in den Maschen eine ungeordnete Zellansiedlung erkennen ließ (Abbildung 50). Durch ein dreidimensionales Wachstum wurden die Maschen durch die Zellen verschlossen (Abbildung 45 und 46). Dadurch ergab sich eine mehrschichtige zelluläre Membran (Abbildung 44).

Die Zellen legten sich radiär an die Oberfläche der Trägerstruktur an. Dabei ordneten sich die Zellkerne palisadenartig aneinander. Auch hierbei zeigte sich eine glatte, unbeschädigte Scaffoldoberfläche (Abbildung 47). Der Zell-Scaffold-Kontakt (Avital-Vital-Kontakt) wurde schnitt- und färbebedingt aufgehoben, so dass die Anschnitte der Fasern aus dem Zellverband herausgelöst wurden (Abbildung 45, 46 und 51).

Der Durchmesser einer Faser beträgt in den Querschnitten ca. 75-100 μm (Abbildung 51 und 52). Die sich zwischen den einzelnen Fasern ausgebildete Zellmembran hatte eine Höhe von bis zu 100-150 μm erreicht (Abbildung 52). Auch nach Ausbildung eines mehrschichtigen, dichten Zellverbandes, kam es bei der histologischen Aufbereitung zu Rissen innerhalb dieser Membran (Abbildung 53) und Verlust der Trägerstruktur (Abbildung 54).

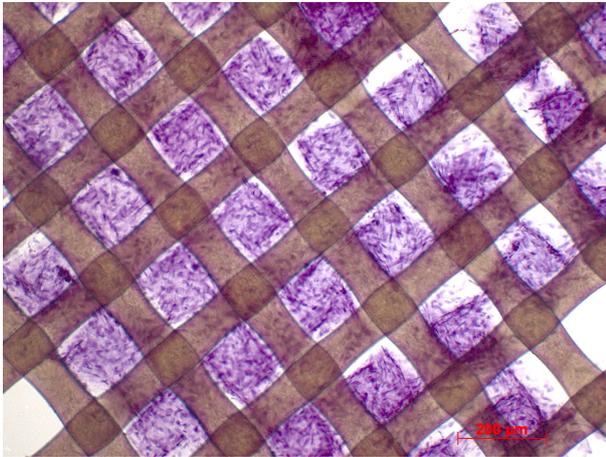


Abbildung 44:
Histologischer Nachweis des vollständigen
Zellbewuchses der Trägerstruktur. Die
Schnittdicke des Präparates beträgt
40µm. Der kräftig angefärbte Zellverband
lässt die Mehrschichtigkeit der binde-
gewebigen Membran erkennen.

Kulturdauer: 48 Tage

Abbildung 45:
Längsschnitt durch das Präparat bei einer Schnittdicke
von 10µm. Sowohl Faserzwischenräume als auch die
Oberflächen der Trägerstruktur sind zugewachsen.

Kulturdauer: 48 Tage

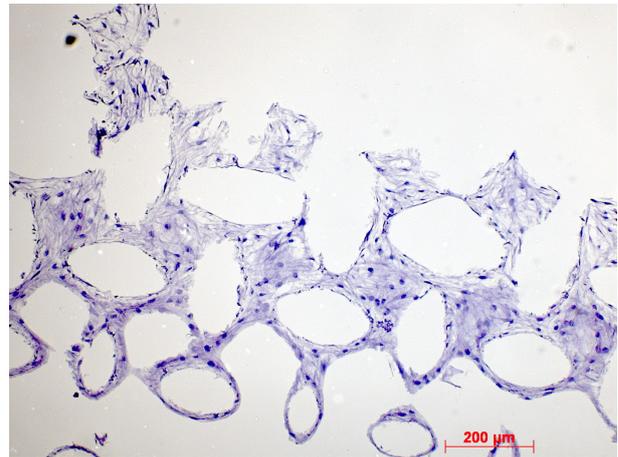


Abbildung 46:
Ausschnittsvergrößerung des oberen
Bildes. Die Bindegewebszellen und ihre
extrazelluläre Matrix sind dreidimensional
miteinander verwoben.

Kulturdauer: 48 Tage

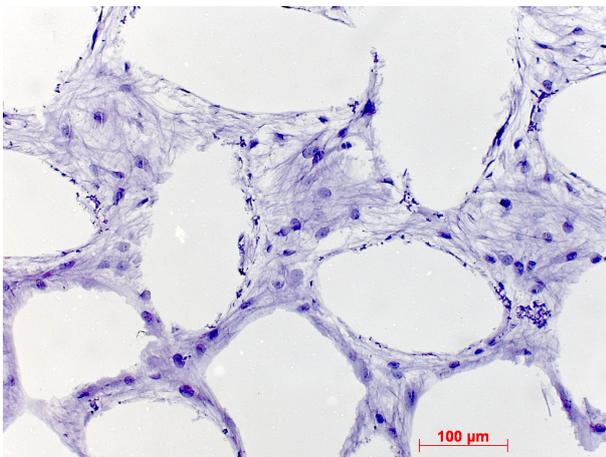
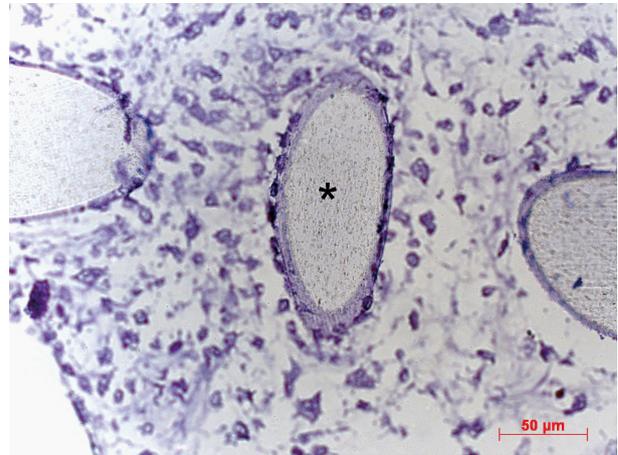
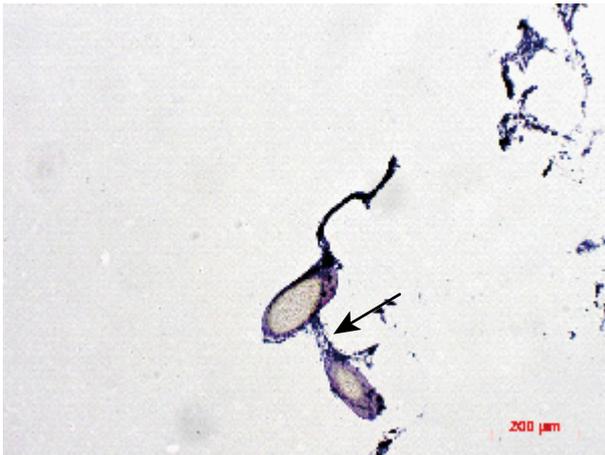


Abbildung 47:
Die Fibroblasten legen sich
palisadenartig um das Trägermaterial (schwarzer Stern)
und bilden einen festen Verbund mit selbigem.
Kulturdauer: 49 Tage



a)



b)



Abbildung 48 a und b:
Einzelzellen und Zellmatrix als Verbindung zwischen 2 Fasern des Trägermaterials (schwarzer Pfeil). Die Oberfläche des Scaffolds ist intakt. Das Trägermaterial wird komplett von zellulärer Matrix eingeschleitet. Die Abbildung 48 b stellt eine Ausschnittsvergrößerung von 48 a dar.
Kulturdauer: 49 Tage

Abbildung 49:
Nachweis eines zellulären Verbundes zwischen den
senkrecht zueinander Ausgerichteten Fasern des
Trägermaterials.
Kulturdauer: 35 Tage

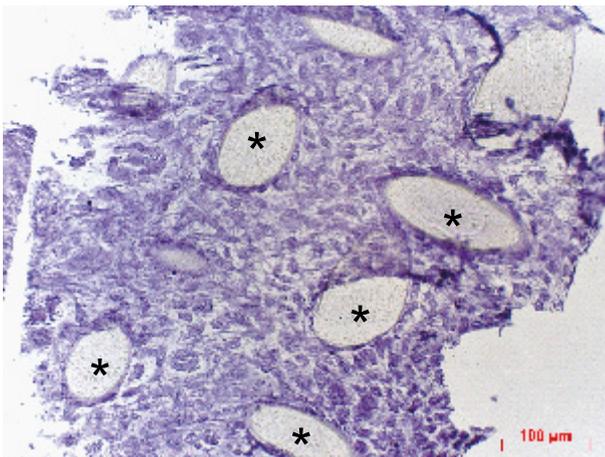
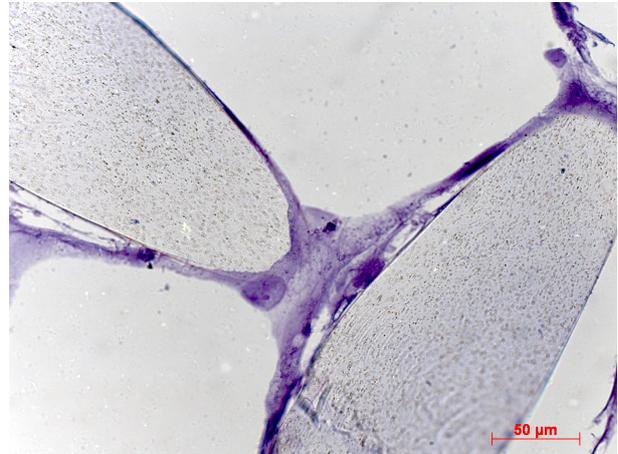


Abbildung 50:
Fest umwachsene Fasern der
Trägerstruktur (schwarze Sterne).
Kulturdauer: 49 Tage

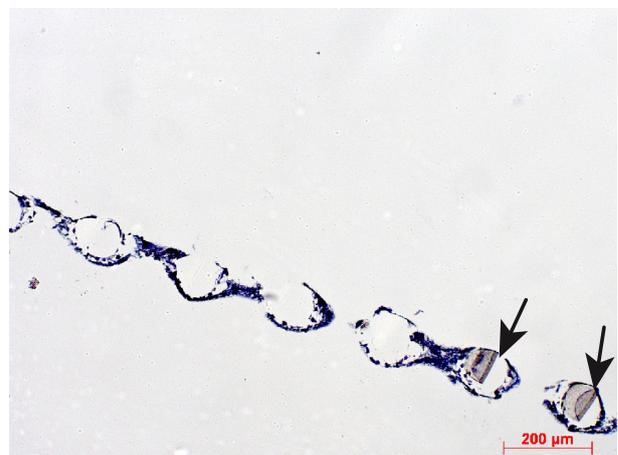


Abbildung 51:
Querschnitt durch das Trägermaterial.
Durch die histologische Aufbereitung abgelöste
Fasern des Scaffolds (Pfeilmarkierungen).
Kulturdauer: 49 Tage

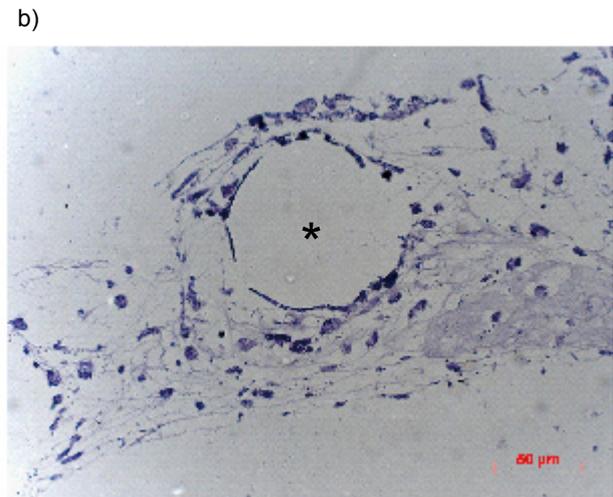


Abbildung 52 a und b:

Gegenübergestellte Übersicht a) und Vergrößerung b) des quer angeschnittenen Präparates. Die Zellen bilden eine ca. 100-150 μ m dicke Membran, welche die einzelnen Fasern des Scaffolds vollständig umgeben. Die Fasern wurden bei der Aufbereitung herausgelöst (schwarze Sterne).

Kulturdauer: 49 Tage

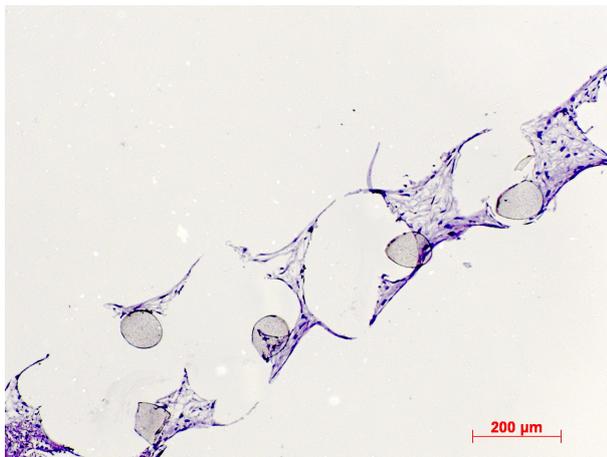
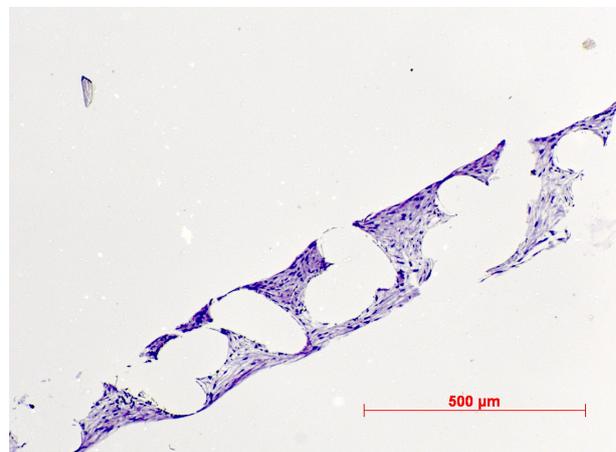


Abbildung 53:

Ein Querschnitt durch das Scaffold in Höhe der Kreuzungsstellen der einzelnen Fasern. Die Aussparungen in der Zellschicht sind deutlich größer. Die Gesamthöhe des Scaffolds ist durch schnittbedingte Artefakte vergrößert. Einzelne Faseranschnitte sind noch in situ. Kulturdauer: 48 Tage

Abbildung 54:

Querschnitt durch die Membran bei vollständig künstlich herausgelöstem Trägermaterial. Die Gesamthöhe ist nicht verändert; \sim 250 μ m. Es zeigt sich ein vollständiger Einschluss des herausgelösten Trägermaterials durch einen starken Zellverbund. Kulturdauer: 48 Tage

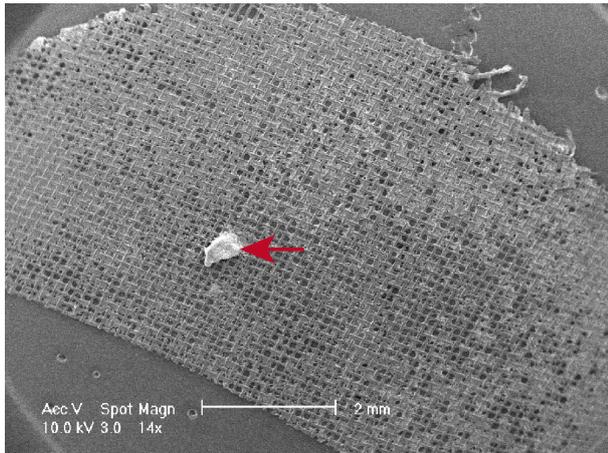


3.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

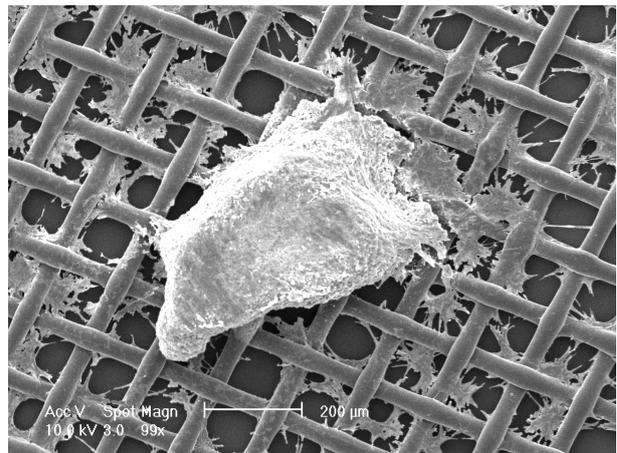
Die Fasern des Geflechtes sind senkrecht zueinander ausgerichtet und überlagern sich an den Kreuzungsstellen wechselseitig (Abbildung 55 b und c).

Das aufplattierte Zellkonglomerat stand im Zentrum des Wachstums. Hiervon ausgehend besiedelten die Zellen zentrifugal das Scaffold (Abbildung 55 b und 57 b). Der Wachstumsfortschritt lies sich gut im Verlauf erkennen. So fand sich nach 15 Tagen schon eine disseminierte Besiedlung des Scaffold, ohne vollständigen zellulären Verschluss der einzelnen Maschen (Abbildung 55 a). Nach 19 Tagen bereits war die Trägerstruktur fast komplett zugewachsen (Abbildung 57 a). Einzelne Maschen in unterschiedlicher Entfernung zu dem aufplattierten Zellkonglomerat waren nur partiell bewachsen (Abbildung 57 d). In den Abbildungen 55 c, 56 und 57 d lies sich das Wachstum der Zellen im Detail beobachten. Die Zellen agglomerierten sich in den Eckbereichen zwischen den Fasern. Sternförmige Zellausläufer verbanden sich untereinander und näherten sich den gegenüberliegenden Fasern an. Diese Zellfortsätze wuchsen aus ihrer Ebene heraus und umschiedeten durch über- und untergreifendes Wachstum die einzelnen Fasern. Dadurch ergab sich ein lückenloser Bewuchs des Scaffold nach 48 Kulturtagen (Abbildung 58 und 59 a-c). Die Faseroberfläche war mit einer einheitlichen Zellschicht bedeckt (Abbildung 59 a und b). Nach 48 Tagen war das vormals erhabene, aufplattierte Zellkonglomerat nahezu eingeebnet (Abbildung 58). Im Randbereich fanden sich zwischen den Fasern konkave Gewebeeinziehungen des zellulären Abschlusses (Abbildung 57 c). Diese wurden schon in vitro beobachtet (Abbildung 43). Am Ende der Kulturdauer waren die konkaven Bereiche immer noch zu erkennen, aber in ihrer Ausprägung deutlich reduziert (Abbildung 59 b und c).

a)



b)



c)

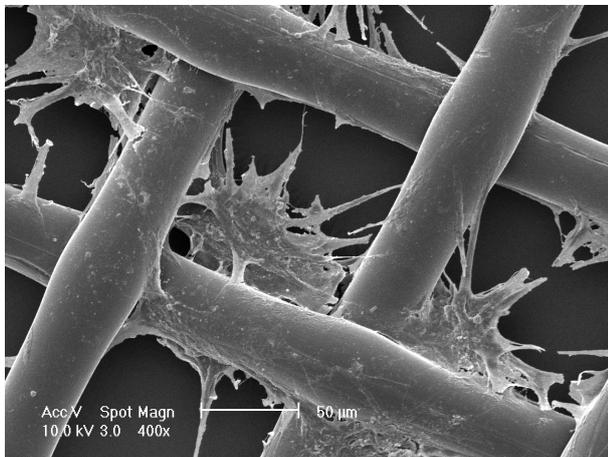


Abbildung 55 a-c:

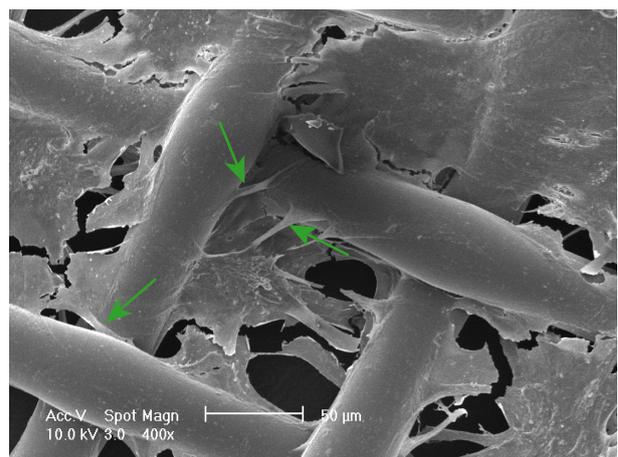
Die Hälfte eines Präparates in der Aufsicht. Nahezu Zentral bildet sich als erhabene Struktur ein Konglomerat des Zelltransplantates (roter Pfeil) ab (a). Von dem Zellkonglomerat ausgehend, vollzieht ein in die Peripherie erstreckendes Zellwachstum (b). Die Fibroblasten wachsen nicht nur zweidimensional in einer Ebene, sondern tendieren zur Bildung einer mehrschichtigen Membran in der Höhe des Scaffolds (c).

Kulturdauer: 15 Tage

Abbildung 56:

Zentral in der Abbildung erkennt man den mehrschichtigen Aufbau der Zellmembran. Zellfortsätze greifen von einer Faser über und unter die dazu quer verlaufende Faser (grüne Pfeile).

Kulturdauer: 15 Tage



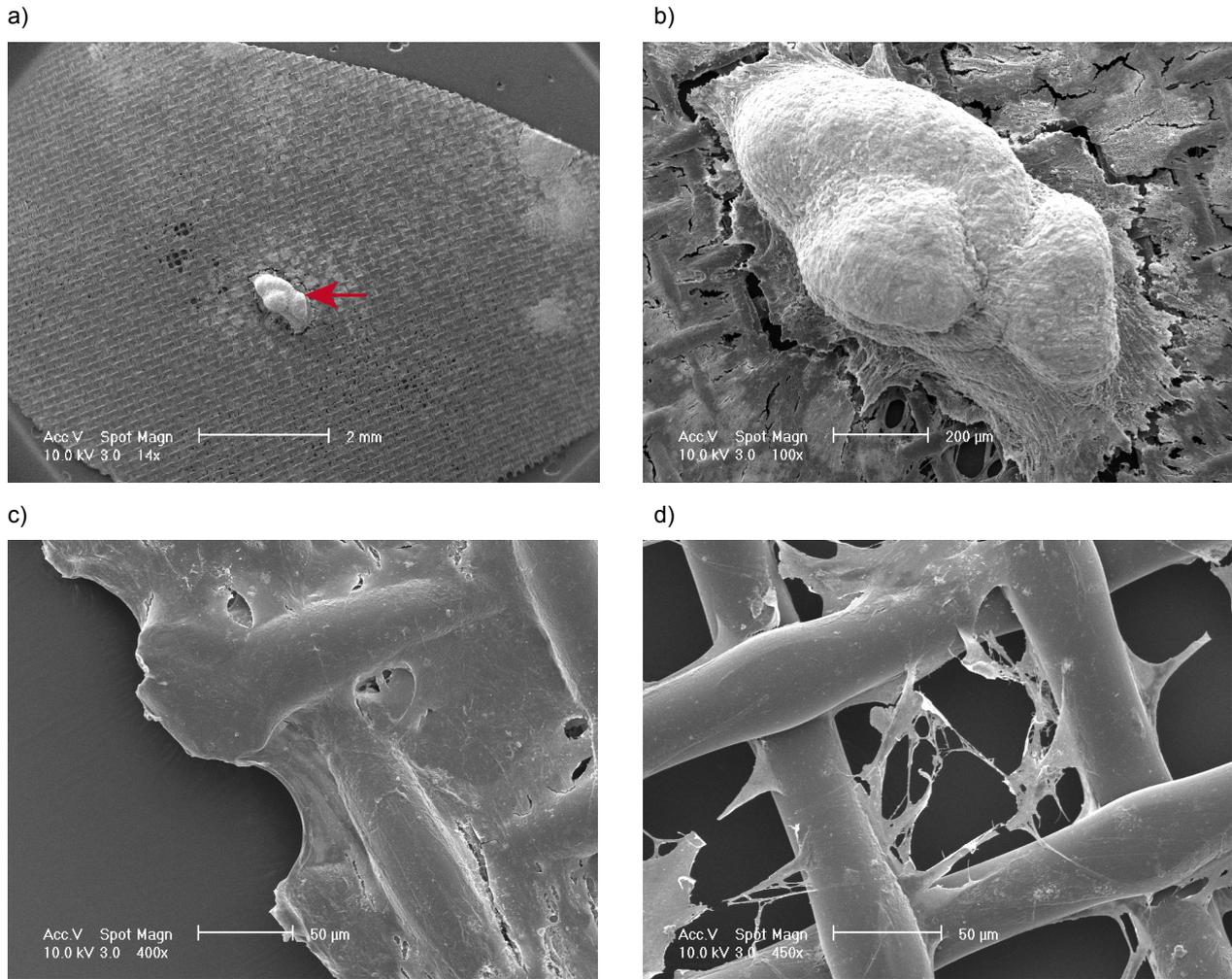


Abbildung 57 a-d:

Das flächenhafte Wachstum in diesem Präparat ist deutlich in der Aufsicht fortgeschritten. Ebenfalls zentral imponierend (roter Pfeil) ein erhabenes Zellkonglomerat (a). In der Ausschnittsvergrößerung von Abbildung a) verdeutlicht sich das vom Zelltransplantat initiierte zentrifugale Wachstum der Fibroblasten (b).

Das Wachstum der Zellschicht ist bis an den Rand der Trägerstruktur fortgeschritten. Das organische Material bedeckt vollständig die Fasern des Scaffolds (c). Eine weitere Ausschnittsvergrößerung von Abbildung a) zeigt, dass das Präparat allerdings noch nicht vollständig zellulär bewachsen ist (d).

Kulturdauer: 19 Tage

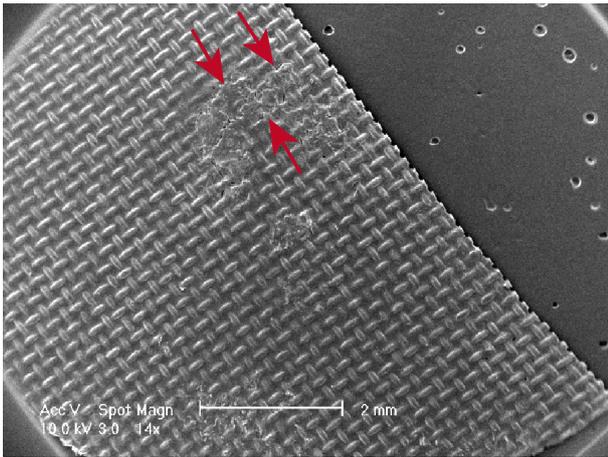
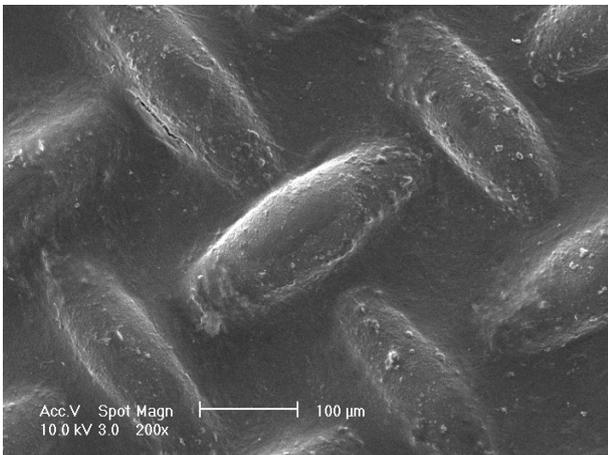
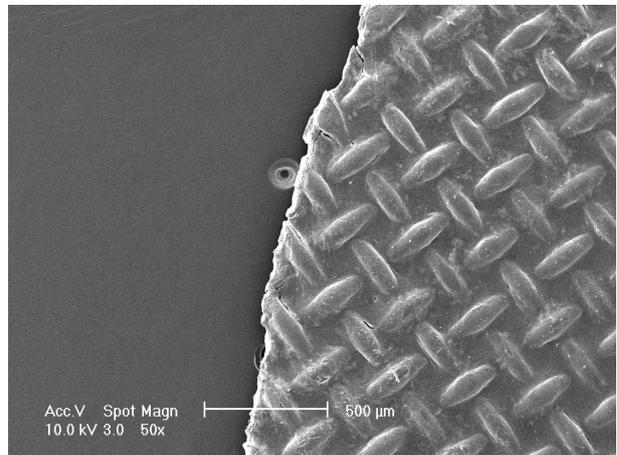


Abbildung 58:
Dieses Präparat zeigt in der Aufsicht eine über die gesamte Fläche erstreckte Zellschicht. Die Pfeilmarkierung zeigt den Ort, an dem sich die Hauptmasse des Zelltransplantates befand. Das vorherige, erhabene Zellkonglomerat ist beinahe auf Niveau der Scaffoldoberfläche reduziert.
Kulturdauer: 48 Tage

a)



b)



c)

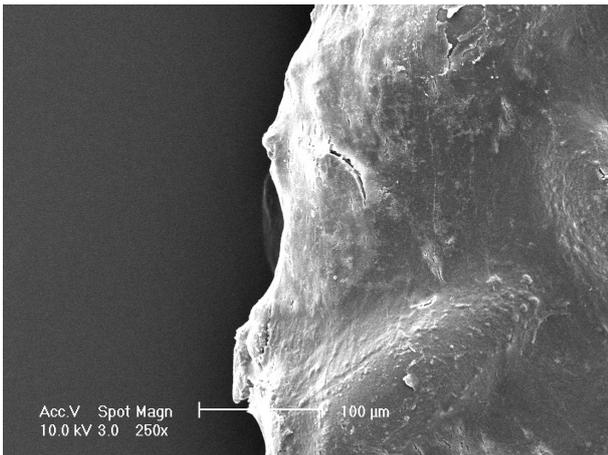


Abbildung 59 a-c:
Vergrößerungsausschnitte der vorherbeschriebenen Abbildung 58 belegen einen durchgehenden und gleichmäßigen Bewuchs der Trägerstruktur. Es liegt keine Faseroberfläche frei. Ebenso sind die Präparatränder vollständig umwachsen.
Kulturdauer: 48 Tage

3.4 Scaffold IV (Komposit-Graft)

3.4.1 In vitro

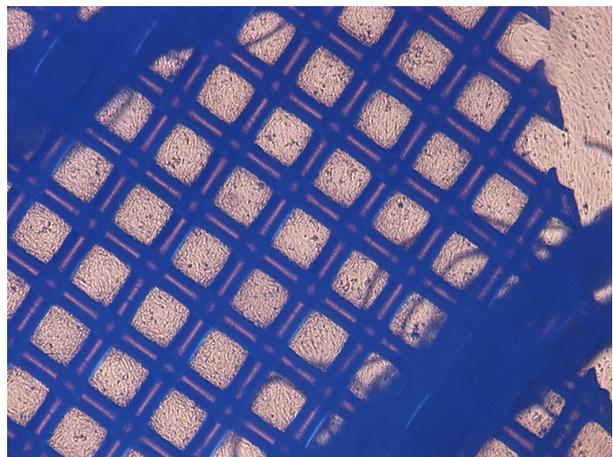
Bei den 4 angefertigten Scaffolds IV wurden ähnliche Ergebnisse gefunden im Vergleich zu Scaffold II und Scaffold III.

Das bei diesem Komposit-Graft dem Scaffold II unterliegende Scaffold III wurde frühzeitig flächig durch die Zellen besiedelt. Schon nach 17 Tagen fanden sich Areale mit zugewachsenen Maschen des Scaffold III (Abbildung 60). Ein zellulärer Bewuchs des oberhalb platzierten Scaffold II zeigte sich auf den Faserbündeln, sowie in dessen Faserbündelzwischenräumen (Abbildung 61). Wiederum aus den Faserbündeln heraus gelöste Fibrillen unterstützten und verstärkten das zelluläre Wachstum in den Faserbündelzwischenräumen (Abbildung 61). Aber auch Scaffold III diente als hilfreiche Leitstruktur für das Zellwachstum. Durch die unterstützende Unterlage der Anteile des Scaffold III wurden Faserbündelabstände von Scaffold II bereits nach 26 Tagen zellulär überbrückt (Abbildung 62). Von diesen Zellbrücken bildeten sich kleinere Gewebeinseln, welche sich flächig ausbreiten (Abbildung 63). In den Bereichen, in welchen die Faserbündelzwischenräume besiedelt waren, wurde beim Durchfokussieren auf das Scaffold III ein qualitativ und quantitativ vermehrtes Zellwachstum gefunden (Abbildung 62, 63 und 64).

Abbildung 60:

Kompletter Verschluss der Maschen des unten liegenden Scaffold III nach 17 Tagen. Mutmaßlich ebenso Zellkontakt zu dem darüberliegenden Scaffold II.

Vergrößerung: 4fach



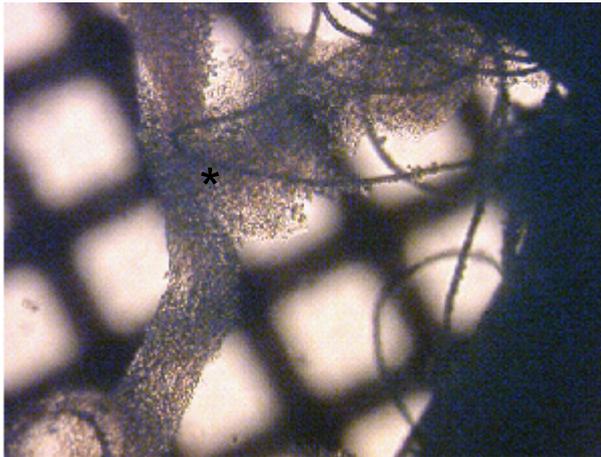


Abbildung 61:

Im Vordergrund adhären-te
Bindegewebszellen (schwarzer Stern) an
freien Fäden des gestickten Träger-
materials. Im Hintergrund schimmert die
Geflechtstruktur des Komposit-Grafts
durch.

Kulturdauer: 31 Tage

Vergrößerung: 10fach

Abbildung 62:

Der Fokus im linken Bildabschnitt liegt auf dem oberhalb
platzierten Scaffold II. Mittig zieht ein Zellstrang (roter Pfeil)
zwischen 2 Faserbündeln des Scaffold II (grüne Pfeile).

Rechter Bildabschnitt zeigt den selben Bildausschnitt
durchfokussiert auf das Scaffold III. Ausgehend von dem
transluzenten Zellstrang zeigt sich ein nach oben und
unten gerichtetes Zellwachstum innerhalb der Maschen
von Scaffold III.

Kulturdauer: 33 Tage

Vergrößerung: 4fach

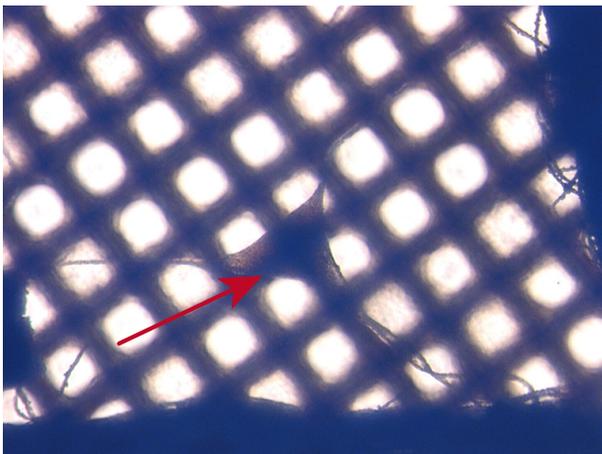
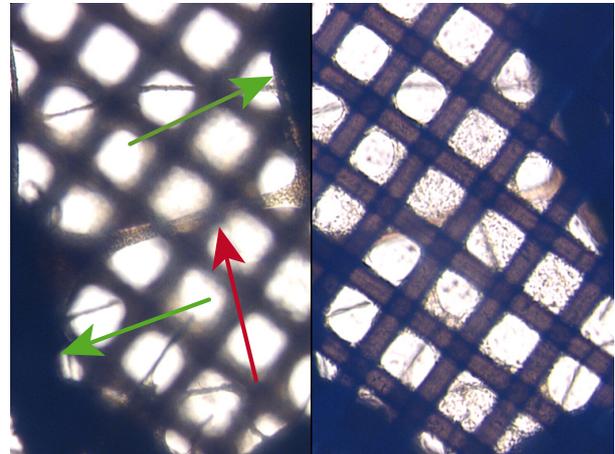


Abbildung 63:

Im Vordergrund eine dreieckig sich ausgebildete Zellfläche
(roter Pfeil), welche adhären-t an Fibrillen des
Scaffolds II fixiert ist. Im Hintergrund zeigt sich
schemenhaft die Struktur des Scaffold III. In den
Maschen deutet sich das oben (Abbildung 39 a-d)
angesprochene radiäre Wachstum der Fibroblasten an.

Kulturdauer: 26 Tage

Vergrößerung: 4fach

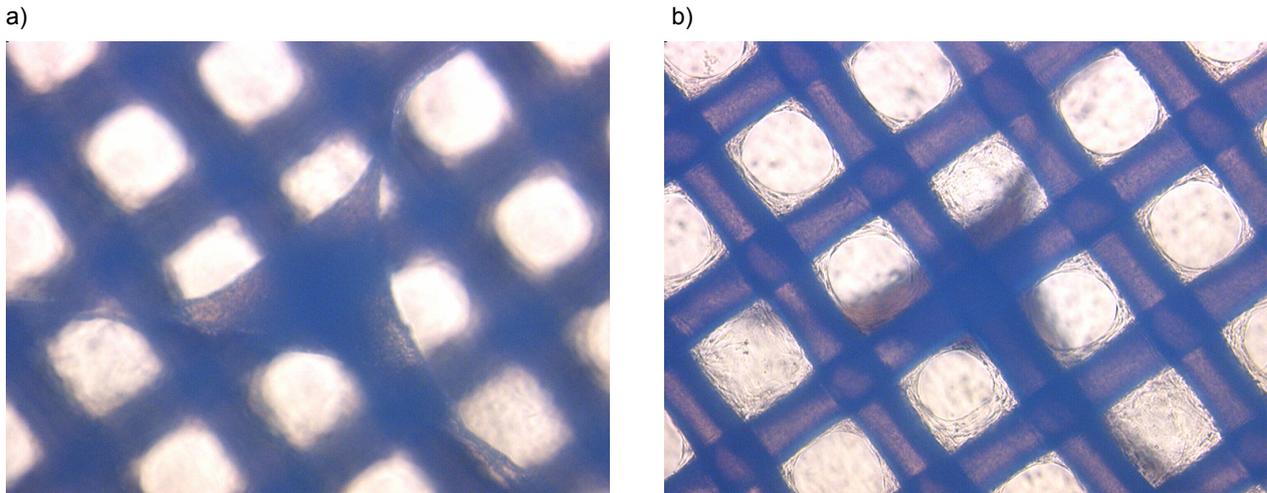


Abbildung 64 a und b:

Vergrößerung (10fache) der Abbildung 63. a) Im Vordergrund die dreieckige Zellfläche. Im Hintergrund unscharf die Struktur des Scaffold III. b) Im Vordergrund transluzent die dreieckige Zellfläche. Zentral unterhalb dieser Zellansammlung ein stärkeres Fibroblastenwachstum innerhalb der Maschen des Scaffold III.

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Durch die Rasterelektronenmikroskopie wird das Wachstumsverhalten der Fibroblasten deutlicher beschrieben. Hauptsächlich wurde der aus dem Scaffold III bestehende Anteil flächig bewachsen (Abbildung 65). Es fanden nur wenige Zellflächen auf den Faserbündeln von Scaffold II (Abbildung 67 a). Nur teilweise manifestierte sich das Hauptwachstum auf den Faserbündeln von Scaffold II (Abbildung 69). Dennoch fanden sich vereinzelt die in vitro ersichtlichen Zellbrücken bzw. Zellflächen innerhalb der Faserbündelzwischenräume (Abbildung 67 b). Die zum Komposit-Graft kombinierten Scaffolds II und III ließen sich nach der Fixierung durch eine spürbare Kraftaufwendung wieder trennen. An den Auflageflächen der beiden Trägerstrukturen kam es zu einem übergreifenden Wachstum der Fibroblasten (Abbildung 68) und somit zu einer organischen Verbindung der anorganischen PET-Trägerstrukturen (Abbildung 69). Bei der Präparateaufbereitung kam es erneut zu Rissbildung innerhalb der Zellfläche (Abbildung 66, 67 a und 68). Die Lokalisation dieser Risse zeigt allerdings Unterschiede in Abhängigkeit der Kulturdauer auf. So fanden sich, bei den nur wenige Tage kultivierten Präparaten, die Risse, wie schon bekannt, an den Avital-Vital-Grenzen des

Scaffold III (Abbildung 66). Nach vorangeschrittener Kulturdauer zeigten sich die Risse innerhalb der Zellflächen zwischen den Maschen (Abbildung 68). Bei den Fasern des Scaffold II wurde keine Ablösung des Gewebes beobachtet.

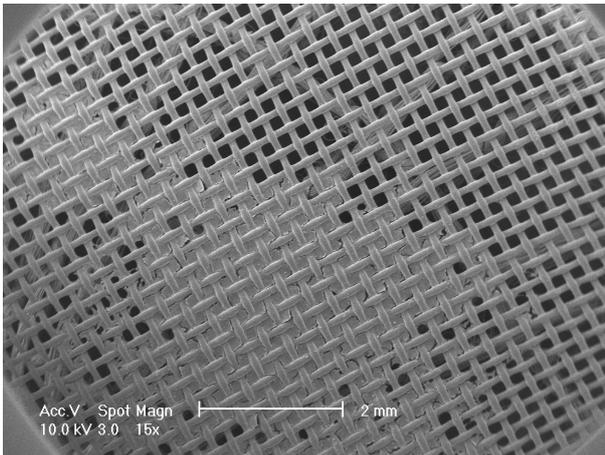
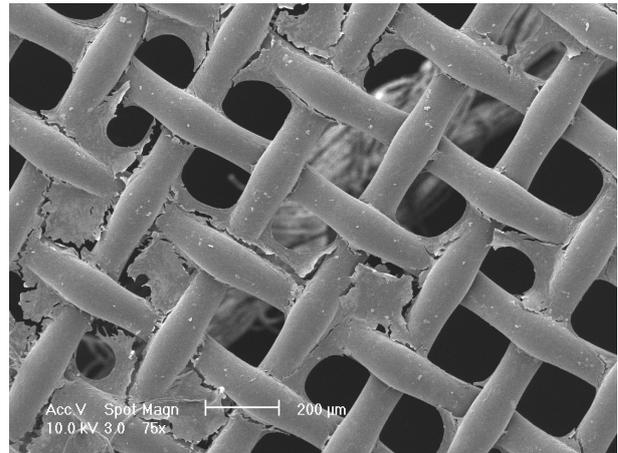
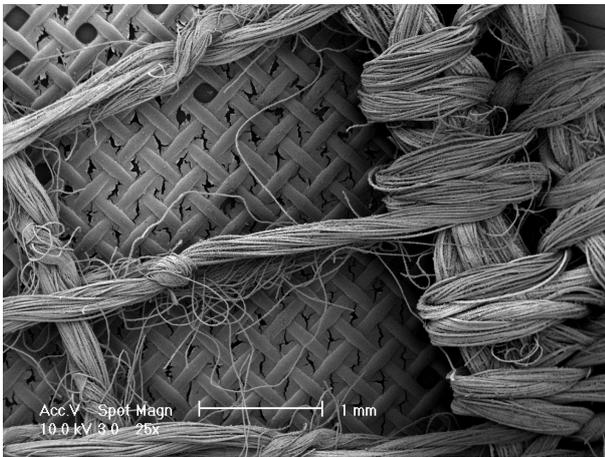


Abbildung 65:
Komposit-Präparat mit der Aufsicht auf das Scaffold III. Die Trägerstruktur ist zum großen Teil zellulär besiedelt. Im Hintergrund schimmern die Faserbündel von Scaffold II durch.
Kulturdauer: 35 Tage

Abbildung 66:
Ausschnittsvergrößerung von der vorherigen Abbildung. Hier zeigt sich Scaffold III im Vordergrund. Aus den Ecken der Maschen der Fasern wachsen die Fibroblasten in das Zentrum und verschließen diese teilweise komplett. Im Hintergrund zieht von unten links nach oben recht ein Faserbündel von Scaffold II.
Kulturdauer: 35 Tage



a)



b)

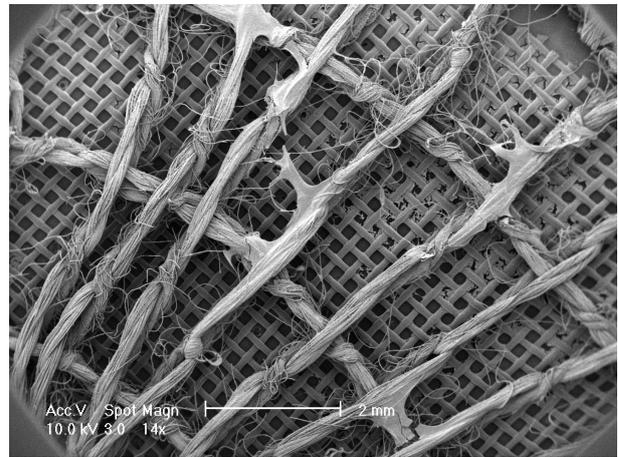
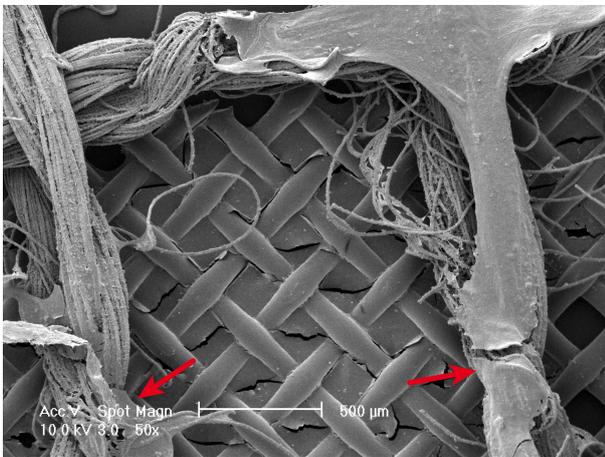


Abbildung 67 a und b:

Die Abbildungen a) und b) stellen das gleiche Präparat wie in Abbildung 65, dieses mal mit der Aufsicht auf Scaffold II, dar. Die Maschen von Scaffold III sind fast vollständig zugewachsen. Es zeigen sich lediglich künstliche Risse in der Zellschicht. In dieser Ansicht ist kein Wachstum auf dem Anteil von Scaffold II zu erkennen.

Kulturdauer: 56 Tage

a)



b)

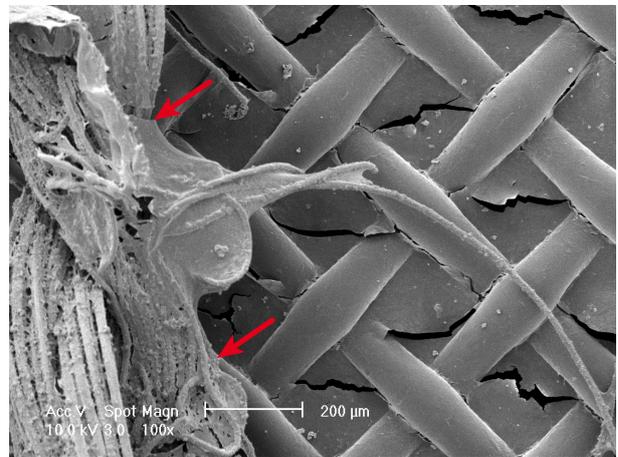
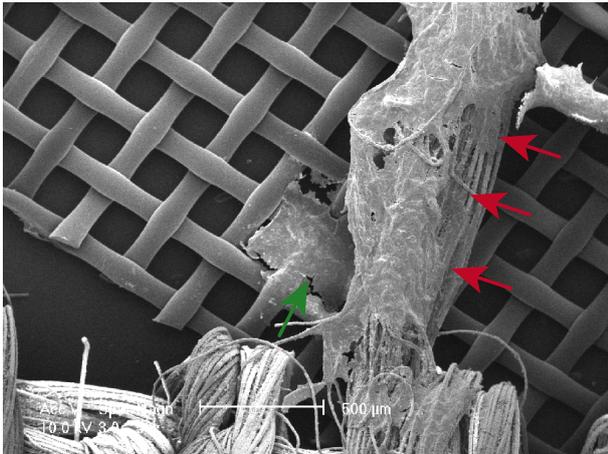


Abbildung 68 a und b:

An den Schnittpunkten der beiden kombinierten Trägerstrukturen greift das Zellwachstum über und verbindet diese miteinander (rote Pfeile). Das Scaffold III ist vollständig bewachsen. Der Faserzwischenraum von Scaffold II ist noch nicht durch Fibroblasten verschlossen worden.

Kulturdauer: 56 Tage

a)



b)

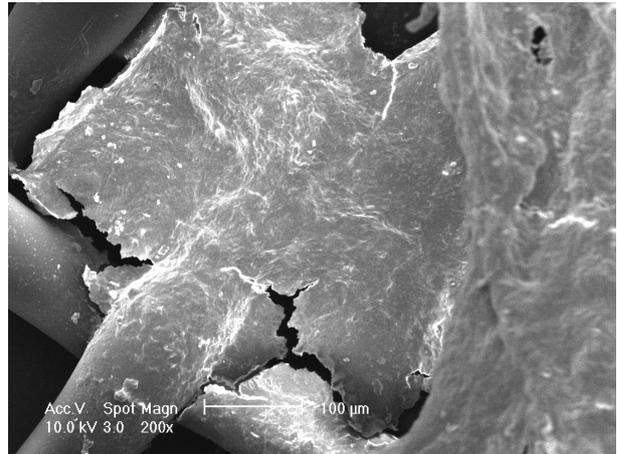


Abbildung 69 a und b:

Abbildung b) ist die 5fache Vergrößerung von Abbildung a). Das Hauptwachstum der Fibroblasten manifestiert sich auf dem Abschnitt des Faserbündels von Scaffold II (rote Pfeile). Im Hintergrund setzt sich das Zellwachstum auf dem untenliegenden Scaffold III fort (grüner Pfeil).

Kulturdauer: 56 Tage

4.0 Diskussion

4.1 Bewertungen der Materialeigenschaften

Eine chronische Perforation der Membrana tympanica hat unterschiedliche Ätiologien. Obgleich traumatische kleinere Trommelfellperforationen spontan verheilen können (Hüttenbrink, 2005), kommt es häufig auch iatrogen bedingt (Bsp.: Parazentese) (Kay et al., 2001; Levine et al., 1994; Nichols et al., 1998) oder durch verschiedene Pathologien (chronische otitis media, Cholestaetom) (Wullstein, 1968; Boeninghaus und Lenarz, 2007) zu chronischen Perforationen größeren Ausmaßes. Diese erfordern einen chirurgischen Eingriff (Hüttenbrink, 2005). Für diese schwierigen Indikationen haben sich bis dato Knorpel-Perichondrium-Transplantate bewährt (Neumann und Jahnke, 2005). Die Literatur zeigt große Schwankungen in der Erfolgsrate der Tympanoplastik (Aggarwal et al., 2006). Die Mehrzahl der Autoren beschreiben jedoch eine Verschlussrate des Trommelfelles von mehr als 90% (Tringali et al., 2008). Die in selbem Zusammenhang genannten postoperativen Komplikationen wie Dislokationen und Krümmung des ausgedünnten Knorpeltransplantates, eine vermeintlich schlechtere Schallübertragung und ein erhöhter Zeitfaktor sollten hier der Anreiz sein, ein PET-Scaffold zu entwickeln, durch welches einige oder alle Nachteile der oben genannten Tympanoplastik vermieden werden.

Seit über 30 Jahren werden Gefäßprothesen aus Polyethylenterephthalat (PET) erfolgreich im klinischen Alltag verwendet (Chakfé et al., 2004). Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass PET als Scaffoldmaterial zur Züchtung von respiratorischem Epithel geeignet ist (Bücheler, 2002). Als ein Material für Trommelfellersatz ist PET bisher nicht eingesetzt und nur als Beispielmateriale genannt worden. Die Materialeigenschaften bieten hingegen gute Optionen diesen Werkstoff in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie zu etablieren. PET ist sowohl bioinert, als auch gekennzeichnet durch eine hohe Biokompatibilität besonders für Weichgewebe (Puskas und Chen, 2004). Diese Eigenschaften machen PET als Scaffoldmaterial sehr interessant, da viele andersartigen Scaffolds Immunreaktionen in immunkompetenten Tiermodellen hervorrufen (Nussenbaum et al., 2004). In allen angefertigten Kulturen kam es zu einer schnellen

Besiedlung der PET-Oberfläche. Das Zellwachstum schien nicht durch das synthetische Material gestört, so dass es je nach Scaffold zum flächigen Bewuchs kam. Das Ausmaß des flächigen Bewuchses war jedoch abhängig von der Maschenweite bzw. von dem Faserbündelabstand (Bücheler, 2002). Auch wurden keine morphologischen Zellveränderungen, der am Scaffold adhärenen Zellen beobachtet. Histologische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch eine mangelnde Adhärenz der Zellen an der Oberfläche der Trägerstruktur. Zwischen der glatten Oberfläche des hier verwendete Scaffold III und dem Gewebe kam es zu Rissen und Kontaktauflösungen. Um den Zell-Scaffold-Kontakt zu stärken ließe sich die Oberfläche des Scaffold III durch verschiedenen Techniken verändern. Eine Modifizierung der Oberflächenporosität kann durch chemische und/oder thermische Verfahren erreicht werden (Jiao und Cui, 2007). Neben morphologischen Änderungen, könnte die Oberfläche auch durch die Kombination mit (un-)geladenen Makromolekülen für ein verbessertes Zellattachement sorgen (Ma et al., 2007; Vasita et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre es, die Stickechnologie durch elektronische Spinnverfahren zu ersetzen. Hierdurch ist es möglich Fibrillen/Fasern mit Durchmessern bis in den Nanometerbereich herzustellen. Aus diesen Fibrillen konstruierte Vliese ähneln sehr stark der kollagenen Grundstruktur der extrazellulären Matrix, wodurch ideale Wachstumsbedingungen für Zellen geschaffen werden (Nair et al., 2004).

4.2 Bewertung Scaffold I

Die Trägerstruktur ist durch multiple, ohne Regelmäßigkeit ineinander verwobene Fibrillen aufgebaut. Der Durchmesser betrug jeweils 15µm.

Das Scaffold I wies eine zu große Höhe auf, sodass das potentielle Zellwachstum der Fibroblasten ausgehend von dem Gewebetransplantat sich nicht primär flächig, sondern auch über die gesamte Tiefe des Trägermaterials aufteilte (Lawrence und Madihally, 2008). Bevor optisch/klinisch ein flächiger Bewuchs des Scaffolds erreicht werden konnte, war die Kulturdauer schon soweit voran geschritten, dass es teilweise zu Apoptose der Fibroblasten kam (Evan und d'Adda di Fagagna, 2009). Es ließ sich in

in vitro makroskopisch wie auch mikroskopisch kein zufrieden stellendes Wachstum einer Zellmembran beweisen.

Die histologische Auswertung bewies hingegen eine großflächige Besiedlung des Scaffolds. Dafür verantwortlich erscheint der dichte Verlauf der Fibrillen innerhalb des vliesartigen Scaffolds. Die so geschaffene Grundstruktur ähnelt zwar nicht dem Empfängergewebe (Wintermantel und Ha, 2002), bietet jedoch gute Wachstumsbedingungen für die Fibroblasten, auch wenn die Fibrillen einen Durchmesser von mehreren Mikrometern besitzen (Nair et al., 2004).

Aus den Ergebnissen des Scaffold I lässt sich schlussfolgern, dass das Material und die Grundstruktur des Trägermaterials für eine zelluläre Besiedlung gut geeignet sind. Die Dicke des Scaffold und die unregelmäßige Fibrillenordnung sind jedoch Scaffoldmerkmale, die weiterhin überdacht und überarbeitet werden sollten. Eine Dickenminderung des PET-Vlieses, sowie eine Fibrillenordnung in Anlehnung an die anatomische Trommelfellstruktur, könnten ein kontrolliertes Zellwachstum ermöglichen.

4.3 Bewertung Scaffold II

Scaffold II nimmt die aus der Versuchreihe mit Scaffold I resultierenden Überlegungen auf. Die in dieser Versuchsreihe genutzten PET-Scaffolds sollten sowohl die mechanischen, als auch die strukturellen Anforderungen eines Trommelfelles imitieren (Place et al., 2009). Die Grundstruktur des Scaffold II stellte die Anatomie der Membrana tympanica nach. Ein aus PET-Fasern verstärkter äußerer Rand bildet den Anulus fibrosus. Die Membrana fibrosa wird durch radiär verlaufende (= anatomisch äußere Schicht) und in regelmäßigen Abständen dazu zirkulär verlaufenden (= anatomisch innere Schicht) dünneren PET-Faserbündeln simuliert (Abbildung 8)(Lim, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Zellwachstum wie gewünscht dem anatomisch nachgeahmten Faserverlauf folgt. Verbesserungswürdig erscheint der zelluläre Verschluss der Faserbündelzwischenräume. Die Zwischenräume der radiär und zirkulär verlaufenden Fasern wurden in Abhängigkeit vom Abstand der Fasern teils vollständig, partiell (Abstände bis zu 100 µm) oder kaum (Abstände über 150 µm) zellulär ausgefüllt. Das "kontrollierte" Zellwachstum ist während der gesamten Kulturdauer

problemlos zu beobachten. Das entstehende Endprodukt ähnelt partiell dem Empfängergewebe. Der mit Fibroblasten bewachsene, aus PET-Fasern nachgebildete Anulus fibrosus soll eine regelrechte Einheilung an der Grenzfläche zwischen artifiziellem Trommelfell und Empfänger ermöglichen (Moffat et al., 2009) und die chirurgische Fixierung erleichtern. Dies muss aber noch in weiterführenden Studien eruiert werden.

Die Idee innerhalb der Grundstruktur eine räumliche Anordnung der Fibrillen zu benutzen, welche der extrazellulären Matrix ähnelt (Nair et al., 2004) wurde wie bei Scaffold I auch hier in größerem Maßstab aufgegriffen. Die multifilen Faserbündel bestehen je nach ihrem Durchmesser aus unterschiedlich vielen Fibrillen. Durch das Bündeln mehrerer Fibrillen entstehen zum einen eine vergrößerte Oberfläche und zum anderen interfibrilläre Spalten. Sowohl die vergrößerte Oberfläche, als auch der interfibrilläre Raum ist der Zelladhäsion dienlich. Hier konnte sich das Gewebe fest verankern. Einwachsende Zellen und die extrazelluläre Matrix wandeln die Garne in Abschnitte mit höherer lokaler Steifigkeit um. Dabei werden die Textilien erheblich versteift (de Haan, 1999). Dadurch wird auch bei einem Gesamtdurchmesser der Trägerstruktur von 16 mm und 32 mm, wobei die Anordnung der Faserbündel in Relationen übereinstimmte, die Stabilität des Vital-Avital-Komplexes bedacht. Nur so können bei einer Trommelfellrekonstruktion mit Hilfe eines bioartifizialen Trommelfelles bei totalen, subtotalen als auch bei kleineren Trommelfellläsionen ein sicher Defektverschluss (Minimierung der Rezidive und Revisionseingriffe), eine ausreichende Stabilität gegenüber Ventilationsstörungen (Adhäsivprozesse, Retraktionstaschen) (Neumann, 2005) und akustische Eigenschaften, die mit einem gesunden Trommelfell vergleichbar sind, gewährleistet sein (Schöttke et al., 1992). Nachfolgende Verformungen in diesen versteiften Regionen können jedoch zu einer Beschädigung des eingewachsenen Gewebes führen. Die histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Auswertungen zeigen, dass es zu artifizialen Rissen hauptsächlich innerhalb des Zellverbandes kam. Vereinzelt zeigten sich auch Kontinuitätsunregelmäßigkeiten an den Zell-Scaffold-Grenzen. Das Gewebe löste sich aber nie vollständig von der Scaffoldoberfläche. Der so gegebene Zell-Scaffold-Kontakt scheint ausreichend, so dass ein ungewolltes Ablösen der Fibroblastenschicht nicht zu erwarten ist.

Die anfängliche mechanische Stabilität des Vital-Avital-Verbundes wird durch den textilen Scaffold gewährleistet. Biologische Gewebe zeigen in der Regel ein anisotrop-nichtlineares und zeitabhängiges mechanisches Verhalten (Fung, 1993). Die Verdrillung mehrere Fibrillen zu einer Faser erhöht die Grundstabilität des Scaffolds, wodurch die räumliche Ausrichtung nicht durch äußere Einflüsse beeinträchtigt wird. Dies soll garantieren, dass das Ersatzmaterial auch in physiologischer Positionierung dem Zellverband eine stabile Unterlage bietet. Retraktions- und/oder gravitations-bedingte, unphysiologische Verformungen können so vermieden werden. Es zeigt sich allerdings schon bei den Präparaten in vitro ein Herauslösen von Einzelfilamenten aus den Faserbündeln. Diese sind zwar der zellulären Besiedlung der Faserbündelzwischenräume dienlich, deuten aber auf eine verminderte mechanische Belastbarkeit der einzelnen Faserbündel hin. Das Ausmaß unter physiologischer Belastung wird durch die hier gezeigten morphologischen Veränderungen des Scaffolds in biologischem Milieu nur angedeutet. Es sind aber wichtige Materialeigenschaften für die Entwicklung eines spezifischen Scaffolddesign (Johnson et al., 2009).

4.4 Bewertung Scaffold III

Das Design von Scaffold III wurde so verändert, dass ein flächiger Fibroblastenbewuchs über ein symmetrisches PET-Geflecht ermöglicht wird. Scaffold III besteht aus PET-Fasern. Hierbei sind die Fasern allerdings monofil und nicht aus mehreren Fibrillen zusammengesetzt. Für eine Besiedlung und Anhaftung von Stammzellen eignen sich besonders Fasern mit Durchmessern von 10 μm . Durch Reduktion des Durchmessers in den Nanometerbereich kann zuzüglich die Zellproliferationsrate, sowie Zellausbreitung auf den Fasern gesteigert werden (Moroni et al., 2006). Der Faserdurchmesser des hier verwendeten Scaffolds beträgt ca. 75 – 100 μm . Innerhalb von 19 Tagen war ein progredientes Zellwachstum zu bemerken. Die Ergebnisse zeigen nach 22 Tagen einen vollständigen flächigen Bewuchs der 15 mm großen Trägerstruktur, so dass die Faserdimension für die Besiedlung und Proliferation von Fibroblasten als geeignet anzusehen ist. Ein weiterer für die Zellbesiedlung und Zellwachstum entscheidender Faktor ist die Maschenweite. Gestickte Scaffolds mit einer Maschenweite von 50-100

µm werden schneller und dichter von Fibroblasten besiedelt im Vergleich zu Scaffolds mit Maschenweiten von ≥ 150 µm (Bücheler, 2002). Bei diesem Scaffold beträgt die Maschenweite 100 µm, wodurch der oben genannte flächige Bewuchs begünstigt wird. Die Fasern verlaufen nahezu im 90° zueinander und überlagern sich an den Kreuzungsstellen wechselseitig. Durch das Überkreuzen der Fasern erhöht sich die Dicke des Scaffolds und die Fibroblasten sind gezwungen eine mehrschichtige Zellmembran auszubilden. Mit einer Membrandicke der Präparate von ca. 100-150 µm gleicht es der physiologischen Dicke eines Trommelfelles (Lim, 1995). Die darauf zu vermutende Schwingungsfähigkeit dieses Präparates sollte/müsste noch in weiterfolgenden Versuchsreihen verifiziert werden.

Die entstandene Fibroblastenmembran umscheidet das Scaffold in toto und zeigt eine homogene, glatte Oberfläche. Die glatte Oberfläche der Gewebemembran wird durch die ebene Scaffoldoberfläche bedingt (Figallo et al., 2007). Die wenigen kleinen, artifiziellen Einrisse in der Gewebemembran entstanden an den Zell-Scaffold-Grenzen (Avital-Vital-Grenze). Der Zellverband scheint durch die glatte Oberfläche keine ausreichende Stabilität zu erreichen, so dass schnitt- und färbebedingt die Anschnitte der Scaffoldfasern aus dem Zellverband herausgelöst wurden (Abbildung 53 und 55). Der locus minoris resistentiae ist jeweils die Grenzen zwischen Zellen und Scaffoldoberfläche.

Den bei den vorbereitenden Maßnahmen zur histologischen wie auch rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung erzeugten mechanischen Kräften trotz des Gesamtkonstrukts. Eine dauerhafte Verformung der Präparate nach manueller Manipulation ist nicht gegeben, so dass von einer eigendynamischen Rückstellkraft ausgegangen werden kann.

4.5 Bewertung Scaffold IV (Komposit-Graft)

Die Idee ein Komposit-Graft zu erstellen, ist die Konsequenz aus den Ergebnissen von Scaffold II und III. Das Scaffold IV entsteht aus der Kombination des Scaffold II mit Scaffold III. Wie die Ergebnisse von Scaffold II zeigen, besteht zwar ein ausreichender Scaffold-Zell-Kontakt, jedoch sind teilweise die Abstände der Faserbündel zu groß, so

dass es nicht wie bei Scaffold III zu einem flächenmäßig totalen Bewuchs der Trägerstruktur kommt (Bücheler, 2002). Die Überlegung ist, mit Hilfe von Scaffold III, die Faserbündelzwischenräume von Scaffold II, welche mehr als 150 µm betragen, zu überbrücken und so ein weiteres flächiges Ausbreiten der Fibroblasten zu erreichen. Somit sollte es nicht notwendig sein, eine Oberflächenmodifikation für Scaffold III vorzunehmen, um den oben beschriebenen geringeren Zell-Scaffold-Verbund zu verbessern (Jiao und Cui, 2007). Die räumlich gesehene Höhendifferenz der beiden Scaffolds bedingt ein fehlendes erwünschtes Übergreifen des flächigen Zellwachstums auf Scaffold III auf die Zwischenfaserräume von Scaffold II.

Ein Nachweis von zellulären Strukturen lässt sich an den Schnittstellen der beiden Scaffolds belegen. Experimentell wurde deutlich, dass die beiden Trägerstrukturen über den Zellverband miteinander verwachsen. Ein Auflösen des Verbundes ist durch eine spürbare Kraft möglich. Der so geschaffene Scaffold-Scaffold-Kontakt ist jedoch so schwach ausgeprägt, dass es nach Fixierung der Präparate häufig zur Auflösung dieses Verbundes kam. Durch die im Verlauf entstehende zelluläre Verbindung werden die Trägerstrukturen in sich (de Haan, 1999) und miteinander versteift. Die manuelle Manipulation während der Präparateaufbereitung vermag dadurch in geringerem Maße die Fasern des Scaffold III gegeneinander zu verschieben. Die entstehende Kraft wird auf die Zellflächen verteilt. So ist es zu erklären, dass nach entsprechender Kulturdauer (ca. 50 Tagen) artifizielle Risse nicht mehr an den Zell-Scaffold-Grenzen (Scaffold III) entstehen, sondern innerhalb der gewachsenen Zellschicht.

4.6 Fazit

Die Materialeigenschaften von Polyethylenterephthalat (PET) sind für die Kultivierung von Fibroblasten zweckmäßig (Hamerli et al., 2003). Das Scaffolddesign ist maßgeblich für das orientierte und kontrollierte Zellwachstum verantwortlich (Provin et al., 2008).

Klinische Relevanz und Zukunftsperspektiven des Tissue Engineering in der operativen Rekonstruktion eines Trommelfeldefektes ist es, eine oder mehrere Methoden zu entwickeln, die eine zeitlich günstigere, minimal invasivere und vor allem deutlich effizientere Behandlung ermöglichen. Die Ziele einer tympanoplastischen Versorgung

wurden von Wullstein (1968) wie folgt festgelegt. Der plastische Verschluss muss zur Neubildung einer lufthaltigen Paukenhöhle mit einer als Ersatz des Trommelfells wirkenden Membran führen. Die Membran muss zudem den Erhalt und/oder Wiederaufbau der Hörfunktion des erkrankten und teilweise defekten Mittelohres nach hörphysiologischen Prinzipien bewirken. Je schlechter die Einheilungsbedingungen für ein Implantat sind, desto eher sollte man sich für die Verwendung von autologem Gewebe entscheiden (Helms, 1992). Das Resultat daraus ist eine Kombination aus körpereigenem Gewebe und einer der Physiologie, Anatomie und Funktion nachgeahmten Trägerstruktur. Die somit bestrebte stabile Abdeckung des Mittelohres sollte Rezidive von Adhäsivprozessen bei Mangelbelüftung/Tubenfunktionsstörungen, akustische Funktionseinschränkungen sowie Fremdkörperreaktionen minimieren. Das Transplantat orientiert sich hierbei an der Defektgröße. Die Funktionalität und Stabilität des Transplantates in vivo kann durch die Modifikation der Trägerstruktur im Vorfeld geplant und garantiert werden. Der Versuch Trommelfellperforationen mit Hilfe von Computer-Aided-Design-Verfahren (CAD-Verfahren) hergestellten Calcium-Alginat-Transplantaten zu verschließen ist bis dato durch die Größe des Defektes limitiert (Hott et al., 2004). Eine Tierexperimentelle Studie zeigte hingegen, dass die Calcium-Alginat-Transplantate eine hohe Erfolgsrate im Verschluss von chronischen Trommelfellperforationen mit einer Größe von 2-5mm aufweisen. Problematisch dabei erscheint jedoch die theoretische Ototoxizität von Calcium-Alginat-Transplantaten (Weber et al., 2006).

Die für die von Wullstein (1952) beschriebene Myringoplastik-Membran sollte mit den hier verwendeten Scaffolds in vitro erzeugt werden. Die Entwicklung ging von PET-Vliessen, über PET-Geflechte zu PET-Gestricken. Abschließend wurde die Kombination von Scaffold II und III zu einem Komposit-Graft in Versuchsreihen getestet. Der in den Versuchen misslungene, vollständige Bewuchs zu einer flächigen Zellmembran, zieht folgende Überlegungen nach sich. Zu planen wäre eine resorbierbare Trägerstruktur in Design von Scaffold III. Diese könnte mit aufplattierten Zellen auf Scaffold II platziert werden. Als biologisch abbaubares Scaffoldmaterial eignen sich verschiedene Polymere. Polylactid-co-Glycolid (PLGA) hat sich in in-vitro Versuchen durch eine überdurchschnittliche Zellproliferation von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen hervor getan (Blackwood et al., 2008). Nach vollständiger Resorption

würde die entstandene Fibroblastenmembran so die Faserbündelzwischenräume auskleiden. Der nichtresorbierbare Anteil bildet eine stabile Grundlage gegenüber mechanischen Kräften und für das Zellwachstum, während sich der Abbau des resorbierbaren Anteils vollzieht (Mayer et al., 2000). Die Resorptionszeit müsste nach diesen Ergebnissen mindestens 19 Tage betragen, aber dürfte nicht mehr als die in-vitro Lebensdauer (Abbildung 9) von Fibroblasten überschreiten (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965; Hayflick, 1992). Die Maschenweite in dem nicht resorbierbaren Anteil bleibt bei $> 150\mu\text{m}$ bestehen. Dies scheint einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von epithelialen Zellen zu haben (Bücheler et al., 2000; Raeber et al., 2000). In Hinblick auf die Herstellung eines artifiziellen Trommelfelles, welches später wie in der Natur einen Plattenepithelüberzug erhalten soll (Michaels, 1988), muss dieser Vorteil gewahrt bleiben.

Die gewachsene Zellschicht bildete sich beim Scaffold III bis zu einer Höhe von ca. $150\mu\text{m}$ und bei Scaffold II bis ca. $200\mu\text{m}$ aus. Hierdurch kann eine dem Trommelfell physiologische Schwingungsfähigkeit, wie bei Knorpel-Perichondrium-Transplantaten gleicher Stärke, vermutet werden (Zahnert et al. 1997). Die Schwingungsfähigkeit ließe sich z. Bsp. durch Laser-Doppler-Vibrometrie bestimmen (Jang et al., 2009). Die Steifigkeit/Stabilität unter verschiedenen Belüftungssituationen im Mittelohr soll durch die Trägerstruktur erreicht werden. Daraus resultierende Veränderungen im Schwingungsverhalten müssen aber noch in weiteren Versuchen untersucht werden (Eiber, 2008).

Die vollständige in-vitro Herstellung eines humanen Trommelfelles ist so mit dieser Arbeit nicht gelöst. Mittel- bis langfristig ist aber ein ausbaufähiger Ansatz geschaffen worden, der es erlaubt das Tissue Engineering zur Tympanoplastik einzusetzen.

5.0 Zusammenfassung

Diese Arbeit geht einem weiteren Ansatz nach, mittels Tissue Engineering einen Trommelfellersatz in vitro zu erzeugen. Es stehen reichlich invasive Verschlussmöglichkeiten mittels Faszientransplantaten oder Knorpel-Perichondrium-Transplantaten zur Verfügung. Dennoch ist es das Ziel, weitere schnellere, minimal-invasive Methoden zu entwickeln, die eine ebenso hohe oder höhere Erfolgsrate bieten.

Dazu wurden drei Trägerstrukturen (Scaffolds) aus dem gleichen Material (PET), aber mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung hergestellt und zwei Scaffolds zu einem Komposit-Graft kombiniert. Diese wurden mit Fibroblasten (19-77 Tage) kultiviert, welche aus Patientengewebe bei Standardconchektomien und Tonsillektomien gewonnen wurden. Die Präparate wurden in vitro per Auflichtmikroskop beobachtet und anschließend histologisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Die makroskopische Auswertung zeigte, dass das Wachstumsverhalten, der aus der Primärkultur gewonnenen und auf das Scaffold aufplattierten Fibroblasten, eine deutliche Abhängigkeit von dem Scaffolddesign (Faserquerschnitt, Faseraufbau und Maschenweite) des textilen Trägers aufweist. Gesticke mit kleineren Maschenweiten (Scaffold I und III; 50-100 µm) wurden schneller und dichter von Fibroblasten besiedelt. Das im Vergleich dazu reduzierte und "kontrollierte" Auswachsen der Fibroblasten auf Gesticken mit 150 µm Maschenweite (Scaffold II) musste durch eine nicht resorbierbare Leitstrukturen unterstützt werden. Das Komposit-Graft wurde entwickelt, damit ein für den Trommelfellersatz ausreichende(r) flächige Membran/Gewebeverband gezüchtet werden kann.

Die aus der Histologie gewonnenen Daten wiesen eine flächige Besiedlung der Trägerstruktur nach. Die Trägerstrukturoberfläche wurde von zellulärem Material komplett eingeschleiert. Der feste dreidimensionale Verbund zwischen Fibroblasten und der Scaffoldoberfläche wurde jedoch oft durch experimentelle Artefakte aufgelöst. Diese Fixierungs- und Schnittartefakte waren geringer am Scaffold I und Scaffold II zu erkennen, da die Zellen hier die Möglichkeit hatten, sich zwischen den Fibrillen zu verankern. Dennoch ließ sich bei allen Versuchsanordnungen eine eindeutige Lagebeziehung der anorganischen Matrix zu dem organischen Gewebe nachvollziehen.

Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde ebenso ein flächiger Bewuchs der Trägerstrukturen nachgewiesen. Die Oberfläche zeigte keine weiteren Zelldifferenzierungen. Es zeigte sich eine dem Trommelfell ähnliche Zelloberfläche als auch Schichtdicke.

Abschließend sollten weitere experimentelle Schritte geplant werden, um die Vorteile des bioartifiziellen Trommelfelles gegenüber anderen Trommelfellersatztechniken abzugrenzen. Dazu gehört eine Modifikation der Trägerstrukturen, die Besiedlung der Scaffolds mit anderen Zelltypen z.B. epithelialen Zellen, und die Untersuchungen zur Schwingungsfähigkeit der in vitro hergestellten Trommelfelle.

In weiterführenden Studien wäre es wünschenswert, mit tierexperimentellen Untersuchungen an persistierenden Trommelfellperforationen, die klinische Relevanz und Anwendbarkeit zu evaluieren.

6.0 Literaturverzeichnis

Aggarwal R, Saeed SR, Green KJ. Myringoplasty. J Laryngol Otol 2006; 120: 429-432

Ars B, Ars-Piret N. The morphogenesis of the tympanic part of the temporal bone. Clin Otolaryngol Allied Sci 1986; 11: 9-13

Atala A, Mooney DJ. Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. Boston: Birkhäuser Verlag, 1997

Baumann I, Diedrichs HW, Plinkert PK, Zenner HP. Autologous tissue in initial type I and type III tympanoplasty operations in chronic suppurative otitis media. HNO 1997; 45: 990-996

Beck C. New studies in tympanic sclerosis. HNO 1969; 17: 234-237

Berghaus A, Stelter K. Alloplastic implants in head and neck surgery. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2006; 14: 270-277

Blackwood KA, McKean R, Canton I, Freeman CO, Franklin KL, Cole D, Brook I, Farthing P, Rimmer S, Haycock JW, Ryan AJ, MacNeil S. Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. Biomaterials 2008 ; 29: 3091-3104

Boenninghaus HG, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007

Borkowski G, Sudhoff H, Luckhaupt H. Autologous perichondrium-cartilage graft in the treatment of total or subtotal perforations of the tympanic membrane. Laryngorhinootologie 1999; 78: 68-72

Bücheler M, Raeber G, Mayer J, Scheffler B, Wintermantel E, Bootz F. Scaffold design for respiratory epithelium transplants. In: Jahnke K, Fischer M (Hrsg.). 4th European Congress of Oto-Rhino-Laryngology. Head and Neck Surgery. Berlin, Monduzzi, Bologna 2000: 1355-1259

Bücheler M, Scheffler B, von Foerster U, Bruinink A, Bootz F, Wintermantel E. Wachstum humanen respiratorischen Epithels auf Kollagenfolie. Laryngo Rhino Otol 2000; 79: 160-164

Bücheler M. Tissue engineering in otorhinolaryngology, head and neck surgery. Laryngorhinootologie 2002; 81: 61-80

Bücheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. DNA Cell Biol 2003; 22: 549-564

Bücheler M, von Foerster U, Haisch A, Bootz F, Lang S, Rotter N. Tissue engineering of respiratory epithelium. Regenerative medicine for reconstructive surgery of the upper airways. HNO 2008; 56: 275-280

Cao Y, Vacanti JP, Ma PX, Ibarpa C, Paige KT, Upton J, Langer R, Vacanti CA. Tissue Engineering of Tendon. Materials Research Society Symposium 1995

Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, Durand B, Kretz JG. Vascular graft prosthesis. Ann Chir 2004; 129: 301-309

Couloigner V, Baculard F, El Bakkouri W. Inlay butterfly cartilage tympanoplasty in children. Otol Neurotol 2005; 26: 247-251

De Haan J. Structure-property relations in plain weft-knitted fabric reinforced composites (KFRCs) preparing for load bearing implants: experimental study and beam model approach. Biocompatible Materials Science and Engeneering, ETH Zürich, Switzerland, Thesis No. 13042, 1999

Doyle JW, Ward-Bailey PF, Kandutsch AA. Effects of growth factors on cell cycle arrest in dolichyl phosphate-depleted cultures. *J Cell Physiol* 1993; 155: 171-178

Eavey RD. Inlay tympanoplasty: cartilage butterfly technique. *Laryngoscope* 1998; 108: 657-661

Eiber A. Mechanical problems in human hearing. *Stud Health Technol Inform* 2008; 133: 83-94

Evan GI, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 25-31

Fibras W. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des statoakustischen Organs. Hörleitung. In: Drenckhahn D, Zenker W, Hrsg. *Benninghoff Anatomie*. München-Wien-Baltimore: Urban&Schwarzenberg, 1994: 756-758

Figallo E, Flaibani M, Zavan B, Abatangelo G, Elvassore N. Micropatterned biopolymer 3D scaffold for static and dynamic culture of human fibroblasts. *Biotechnol Prog* 2007 ; 23: 210-216

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 1994; 12: 689-693

Freshney RI. Three-dimensional culture systems. In: Freshney RI, Alan R, eds. *Culture of animal cells*. New York: Liss Inc, 1987: 297-307

Frick H, Leonhardt H, Starck D. *Allgemeine Anatomie. Spezielle Anatomie I*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 1992

Fung YC. Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues. New York: Springer Verlag, 1993

Goessler UR, Stern-Straeter J, Riedel K, Bran GM, Hörmann K, Riedel F. Tissue engineering in head and neck reconstructive surgery: what type of tissue do we need? Eur Arch Otorhinolaryngol 2007; 264: 1343-1356

Gourmley PK. Stapedectomy in tympanosclerosis. A report of 67 cases. Am J Otol 1987; 8: 123-130

Graham MD, Reams C, Perkins R. Human tympanic membrane-malleus attachment. Preliminary study. Ann Otol Rhinol Laryngol 1978; 87: 426-431

Hamerli P, Weigel T, Groth T, Paul D. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylenterephthalat membranes. Biomaterials 2003; 24: 3989-3999

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, Exp Cell Res 1965; 37: 614-636

Hayflick L. Aging, longevity, and immortality in vitro. Exp Gerontol 1992; 27: 363-368

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains, Exp Cell Res 1961; 25: 585-621

Helms J. Fortschritte in der Tympanoplastik. In: Ganz H, Schätzle W, eds. HNO Praxis Heute. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1992: 25-31

Hildmann H. Surgery of chronic suppurative otitis media in childhood. Laryngorhinootologie 1989; 68: 193-200

Hott ME, Megerian CA, Beane R, Bonassar LJ. Fabrication of tissue engineered tympanic membrane patches using computer-aided design and injection molding. *Laryngoscope* 2004; 114: 1290-1295

Huangfu M, Saunders JC. Auditory development in the mouse: structural maturation of the middle ear. *J Morphol* 1983; 176: 249-259

Hüttenbrink KB. Behandlung einer akuten Trommelfellperforation mit EGF freisetzender Folie. *HNO* 2005; 53: 515-516

Jang CH, Park H, Choi CH, Cho YB, Park IY. The effect of increased inner ear pressure on tympanic membrane vibration. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73: 371-375

Jiao YP, Cui FZ. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomed Mat* 2007; 2: 24-37

Johnson J, Niehaus A, Nichols S, Lee D, Koepsel J, Anderson D, Lannutti J. Electrospun PCL in vitro: a microstructural basis for mechanical property changes. *J Biomater Sci Polym Ed* 2009; 20: 467-481

Jones JR, Atwood RC, Poologasundarampillai G, Yue S, Lee PD. Quantifying the 3D macrostructure of tissue scaffolds. *J Mat Sci Mat Med* 2009; 20: 463-471

Ju XJ, Xie R, Yang L, Chu LY. Biodegradable 'intelligent' materials in response to chemical stimuli for biomedical applications. *Expert Opin Ther Pat* 2009; 19: 683-696

Justice BA, Badr NA, Felder RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today* 2009; 14: 102-107

Kaftan H, Hosemann W, Junghans D, Göpferich A, Schindler E, Beule A. Traumatic tympanic membrane perforations. Local application of an alginat matrix loaded with epidermal growth factor in an animal model. *HNO* 2005; 53: 539-544

Kastenbauer E, Prechtel K. Die Transplantation menschlicher Trommelfelle im allogenen und xenogenen System. Arch klin exp Ohr-, Nasen- u. Kehlkopf-Heilk 1973; 203: 217-224

Karamuk E, Mayer J, Wintermantel E, Akaike T. Partially degradable film/fabric composites: textile scaffolds for liver cell culture. Artifi Organs 1999; 23: 881-884

Kay DJ, Nelson M, Rosenfeld RM. Meta-analysis of tympanostomy tube sequelae. Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 124: 374-380

Kubik S. The human face, its anatomy, physiognomic interpretation and modern description. I. The anatomy and physiognomic interpretation of the face. Med Welt 1965; 48: 71-80

Kobrak HG. Pathology and audiology of middle-ear lesions. AMA Arch Otolaryngol 1956; 63:177-182

Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993; 260: 920-926

Lawrence BJ, Madhally SV. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. Cell Adh Migr 2008; 2: 9-16

Levine S, Daly K, Giebink GS. Tympanic membrane perforations and tympanostomy tubes. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 1994; 163: 27-30

Lim DJ. Structure and function of the tympanic membrane: a review. Acta Otorhinolaryngol Belg 1995; 49: 101-115

Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. Colloids Surf B Biointerfaces 2007; 60: 137-157

Matsuda Y, Kurita T, Ueda Y, Ito S, Nakashima T. Effect of tympanic membrane perforation on middle-ear sound transmission. *J Laryngol Otol* 2009; 123: 81-89.

Mayer J, Karamuk E, Akaike T, Wintermantel E. Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system. *J Control Release* 2000; 64: 81-90

Michaels L. Evolution of the epidermoid formation and its role in the development of the middle ear and tympanic membrane during the first trimester. *J Otolaryngol* 1988; 17: 22-28

Milewski C. Results of tympanoplasty following application of cartilage-perichondrium transplants for tympanic membrane substitution under unfavourable circumstances. *Laryngorhinootologie* 1991; 70: 402-404

Moffat KL, Wang IN, Rodeo SA, Lu HH. Orthopedic interface tissue engineering for the biological fixation of soft tissue grafts. *Clin Sports Med* 2009; 28: 157-176

Mongkolrattanothai K, Oram R, Redleaf M, Bova J, Englund JA. Tuberculous otitis media with mastoiditis and central nervous system involvement. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 453-456.

Moroni L, Licht R, de Boer J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Fiber diameter and texture of electrospun PEOT/PBT scaffolds influence human mesenchymal stem cell proliferation and morphology, and the release of incorporated compounds. *Biomaterials* 2006; 27: 4911-4922

Nair LS, Bhattacharyya S, Laurencin CT. Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 659-668

Neumann A, Jahnke K. Trommelfellrekonstruktion mit Knorpel. *HNO* 2005; 53: 573-586

Nichols PT, Ramadan HH, Wax MK, Santrock RD. Relationship between tympanic membrane perforations and retained ventilation tubes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 417-419

Nussenbaum B, Teknos TN, Chepeha DB. Tissue engineering: the current status of this futuristic modality in head neck reconstruction. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 311-315

Patel M, Fisher JP. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. *Pediatr Res* 2008; 63: 497-501

Place ES, George JH, Williams CK, Stevens MM. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem Soc Rev* 2009; 38: 1139-1151

Plester D. When should an ear not be operated on. *Laryngol Rhinol Otol* 1984; 63: 386-388

Plester D, Helms J, Jahnke K, Kastenbauer ER, Kley W, Zöllner C. Artificial materials in reconstruction of middle ear. *Laryngol Rhinol Otol* 1985; 64: 224-227

Provin C, Takano K, Sakai Y, Fujii T, Shirakashi R. A method for the design of 3D scaffolds for high-density cell attachment and determination of optimum perfusion culture conditions. *J Biomech* 2008; 41: 1436-1449

Puskas JE, Chen Y. Biomedical application of commercial polymers and novel polyisobutylene-based thermoplastic elastomers for soft tissue replacement. *Biomacromolecules* 2004; 5: 1141-1154

Raeber G, Bücheler M, Scheffler B, Karamuk E, Mayer J, Bootz F, Wintermantel E. PET-fabrics as a model scaffold for Tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 2000; 166: 128-129

Ranke OF, Lullies H. Gehör, Stimme, Sprache. Berlin: Springer-Verlag, 1953

Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Häuptl T, Burmester GR, Sittinger C. Bone engineering on the basis of periosteal cell cultured in polymer fleece. *Mat Sci Mat Med* 1999; 10: 767-772

Reece GP, Patrick CW. Tissue engineered construct design principles. In: Patrick CW, Mikos AG, McIntire LV, eds. *Frontiers in Tissue Engineering*. Amsterdam: Pergamon Press, 1998: 166-196

Rosowski JJ. The effects of external and middle ear filtering on auditory threshold and noise induced hearing loss. *J Acoust Soc Am* 1991; 90: 124-135

Rotter N, Haisch A, Bücheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262: 539-545

Rotter N, Wirz C, Oder J, Wollenberg B, Huss R, Brandau S, Lang S, Bücheler M. Cell-based strategies for salivary gland regeneration. *HNO* 2008; 56: 281-287

Ruah CB, Ars B. Applied embryology and post-natal morphology of the human tympanic membrane. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 85-93

Sanna M, Bacciu A, Falcioni M, Taibah A, Piazza P. Surgical management of jugular foramen meningiomas: a series of 13 cases and review of the literature. *Laryngoscope* 2007; 117: 1710-1719.

Schmidt HM. Kopf und Hals. In: Drenckhahn D, Zenker W, Hrsg. *Benninghoff Anatomie*. München-Wien-Baltimore: Urban&Schwarzenberg, 1994: 479

Schöttke H, Hartwein J, Pau HW. Einfluß unterschiedlicher Transplantatmaterialien bei der Tympanoplastik Typ 1 auf den Schalldruckpegel im Gehörgang. *OtoRhinoLaryngol Nova* 1992; 2: 318-320

Smyth GD, Hassard TH. Tympanoplasty in children. *Am J Otol* 1980; 1: 199-205

Spano A, Palmieri B, Taidelli TP, Nava MB. Reduction of capsular thickness around silicone breast implants by zafirlukast in rats. *Eur Surg Res* 2008; 41: 8-14

Strauss P. Hearing results following tympanoplasty. *HNO* 1979; 27: 217-220

Tos M. *Manual of Middle ear Surgery*. Stuttgart-New York: Thieme-Verlag, 1993

Tringali S, Dubreuil C, Bordure P. Tympanic membrane perforation and tympanoplasty. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2008; 125: 261-272

Vasita R, Shanmugam I K, Katt DS. Improved biomaterials for tissue engineering applications: surface modification of polymers. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 341-353

Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations. *Laryngoscope* 2006; 116: 700-704

Williams KR, Blayney AW, Rice HJ. Middle Ear Mechanics as examined by the Finite Element Method. In: Hüttenbrink KB, eds. *Middle Ear Mechanics in Research in Otosurgery*. Dresden: Die Deutsche Bibliothek, 1997: 67-75

Wintermatel E, Ha SW. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 2002

Wullstein H, Bandtlow O, Kley W, Osterwald L, Schmitt HG, Wigand ME. *Operationen zur Verbesserung des Gehöres*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1968

Zahnert T, Bonitz M, Hüttenbrink KB. Akustische und mechanische Eigenschaften von Trommelfelltransplantaten. *Laryngo-Rhino-Otol* 1997; 76: 717-723

7.0 Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. M. Bücheler, OA an der Klinik für Hals-,
Nasen-, Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Bonn

Prof. Dr. W. Götz, Leiter der Abteilung für Oralbiologische Grundlagenforschung an der
Zahnklinik der Universitätszahnklinik Bonn
und seinen Mitarbeiterinnen im Labor

Prof. Dr. Ch. Bourauel, Experimentelle und theoretische dentale Biomechanik
und seinen Mitarbeitern im Labor