

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten,
Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Univ.- Prof. Dr. med. Chia-Jung Busch)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Thema: Einfluss des metabolischen Status diabetischer Ratten
auf die Trommelfellwundheilung**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität
Greifswald

2022

vorgelegt von: Lars Reuther

geb. am: 10.03.1980
in: Karlsburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Holger Kaftan

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Arne Böttcher

Tag der Disputation: 10.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Symbolverzeichnis	XII
1. Einleitung.....	13
1.1 Diabetes mellitus	13
1.2 Diabetes mellitus und Wundheilung	14
1.3 Aufbau des Trommelfells	16
1.4 Trommelfelldefekt.....	17
1.4.1 Akuter Trommelfelldefekt	17
1.4.2 Allgemeine Wundheilungsprozesse	17
1.4.3 Wundheilungsprozesse am Trommelfell.....	18
1.4.4 Chronischer Trommelfelldefekt	18
1.5 Diabetes mellitus und Wundheilung am Trommelfell	19
1.6 Modelltiere	20
1.7 Ziele der Arbeit	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Formale Voraussetzungen	23
2.2 Versuchstiere	23
2.3 Tierhaltung	25

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Diabetes-Diagnostik	25
2.3.2	Diabetes-Therapie	26
2.4	Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage	26
2.5	Bestimmung des Langzeitblutzuckers zur qualitativen Beurteilung der Stoffwechsellage	26
2.6	Versuchsablauf	27
2.6.1	Anästhesie	28
2.6.2	Antibiotische Therapie	28
2.6.3	Chirurgische Maßnahmen und Befunddokumentation	28
2.6.4	Planung und Gruppengröße.....	29
2.6.5	Fixierung, Präparation und Dekalzifizierung.....	30
2.6.6	Paraffinieren und Anfertigung der histologischen Schnitte	30
2.6.7	Hämatoxylin-Eosin Färbung	31
2.6.8	Mikroskopische Untersuchung und Befunddokumentation.....	32
2.7	Statistische Auswertung	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Einteilung der diabetischen Ratten entsprechend ihrer Stoffwechsellage	33
3.2	Alter der Versuchstiere.....	35
3.3	Mikroskopische und endoskopische Ergebnisse der Wundheilung ...	36
3.4	Histologische Ergebnisse der Wundheilung.....	37

Inhaltsverzeichnis

3.4.1	Normoglykämische Kontrollgruppe	38
3.4.2	Gruppe der Ratten mit gut kompensierten Diabetes-Stoffwechsel	40
3.4.3	Gruppe der Ratten mit schlecht kompensierten Diabetes- Stoffwechsel.....	44
4.	Diskussion.....	47
5.	Zusammenfassung	54
	Literaturverzeichnis.....	55
	Lebenslauf.....	63
	Publikationsliste	64
	Danksagung.....	65
	Eidesstattliche Erklärung	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Beispiel der Fotodokumentation der Trommelfellbefunde 29

Abbildung 2 Perforationsrate in Abhängigkeit vom Kontrollzeitpunkt..... 36

Abbildung 3 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 14 nicht perforierte Seite 37

Abbildung 4 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 7 (a)..... 38

Abbildung 5 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 7 (b) 39

Abbildung 6 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 14 39

Abbildung 7 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 21 40

Abbildung 8 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 7 41

Abbildung 9 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 14 (a)..... 42

Abbildung 10 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 14 (b)..... 43

Abbildung 11 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 21 44

Abbildung 12 Trommelfell - Schlecht kompensierte Diabetesgruppe Tag 7 45

Abbildung 13 Trommelfell - Schlecht kompensierte Diabetesgruppe Tag 21 ... 46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Postmortale Fructosaminwerte und Gruppeneinteilung der diabetischen Ratten 34

Tabelle 2 Geplante und tatsächliche Anzahl der Trommelfelle zur histologischen Untersuchung 35

Abkürzungsverzeichnis

BB/OK	B(io)B(reeding)/O(ttawa)K(arlsburg)
bFGF	basic fibroblast growth factor/ basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bzw.	beziehungsweise
c	capillary/ Kapillare
ca.	circa Tage
D. m.	Diabetes mellitus
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EAC	external auditory canal/ äußerer Gehörgang
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid/ Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor/ epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	endothelial progenitor cells/ endotheliale Vorläuferzellen
et al.	et alii/ und andere
F	Fibrinoid
f./ff.	folgende/ fortfolgende
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

Abkürzungsverzeichnis

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HbA1c	glykolisiertes Hämoglobin A
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färben
HNO	Hals-Nasen-Ohren
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus/ insulin-abhängiger Diabetes mellitus
IGF	insulin-like growth factor/ insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
Inc.	incorporated
IU	International Unit/ Internationale Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Manubrium
m	Mittelwert
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex/ Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mrd.	Milliarden

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger ribonucleic acid/ Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Nr.	Nummer
ob/ob	obese hyperglycaemic/ adipös hyperglykämisch
P	Perforation
PDGF	platelet-derived growth factor/ Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
pH	pondus hydrogenii/ Potential des Wasserstoffs
SAS	Statistical Analysis System
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STZ	Streptozotocin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TGF- β	transforming growth factor-β/ transformierender Wachstumsfaktor β
USA	United States of America/ Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	vascular endothelial growth factor/ vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vgl.	Vergleiche

Abkürzungsverzeichnis

ZDF Zucker-diabetic-fatty

Symbolverzeichnis

*	Granulozyten
%	Prozent
®	Registered Trade Mark/ registrierte Waren-/Dienstleistungsmarke

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine weltweit verbreitete chronische Stoffwechselerkrankung, die mit einem teilweisen oder vollständigen Verlust der Insulinsekretion oder einer peripheren Insulinresistenz einhergeht und damit zur Hyperglykämie führt. Eine neuere Klassifikation des Diabetes mellitus unterscheidet vier Typen: Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2, „andere spezifische Typen“ und Gestationsdiabetes [1]. Lag die Zahl der weltweit erkrankten Menschen mit Diabetes aller vier Typen im Jahr 2000 noch bei ca. 150 Millionen, wird bis 2025 mit einer Verdopplung auf ca. 300 Millionen Menschen mit Diabetes gerechnet [2].

Für Deutschland wird die Prävalenz des Diabetes mellitus insgesamt auf etwa 4,6 Millionen geschätzt. Dies entspricht 7,2 % der Bevölkerung. Während der letzten zehn Jahre ist die Zahl der Erwachsenen mit einem bekannten Diabetes um 38 % angestiegen. Hiervon ist ein Drittel auf die demografische Alterung der Bevölkerung zurückzuführen [3]. Allein in den USA beliefen sich die mit der Diagnostik und Therapie von Diabetes mellitus entstehenden Kosten auf 327 Mrd. US-Dollar [4].

Der primär insulinabhängige Diabetes mellitus Typ 1 entsteht durch einen Mangel an Insulin, welcher auf eine irreversible und selektive Zerstörung [5] der insulinproduzierenden Langerhans-Zellen des Pankreas zurückzuführen ist [6, 7]. Etwa 5-7 % der Diabetespatienten leiden an Diabetes mellitus Typ 1, wobei Männer und Frauen in etwa gleich häufig betroffen sind. Das Krankheitsbild entwickelt sich in der Regel vor dem 35. Lebensjahr mit der höchsten Inzidenz während der Pubertät. Weltweit lässt sich eine Zunahme der Neuerkrankungsrate des Diabetes mellitus Typ 1 feststellen. Bemerkenswert erscheint, dass geographische und bevölkerungsspezifische Differenzen in der Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1 zu verzeichnen sind [8]. Die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 1 ist im asiatischen Raum am geringsten, während diese im skandinavischen

Raum am höchstens ist. Für diese Unterschiede werden genetische Differenzen sowie Umwelteinflüsse angenommen [9].

Trotz der engmaschig kontrollierten Substitution mit Insulin ist die Mortalität bei Menschen mit Typ 1 Diabetes erhöht. Vergleicht man die Lebenserwartung von Menschen mit Diabetes mit denen der Normalbevölkerung, so ist diese um sechs bis sieben Jahre reduziert [10]. Die Ursache des Diabetes mellitus Typ 1 ist nicht vollständig geklärt. Jedoch ist bekannt, dass autoimmunologische Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Genese des Krankheitsbildes haben [11, 12, 13]. Der Typ 1 Diabetes entwickelt sich nach zunehmender Zerstörung der β -Zellen des Pankreas und erreicht erst seine vollständige Ausprägung, wenn 90 % der endokrinen Zellen kein Insulin mehr produzieren. Es kommt neben der Invasion von lymphozytären Zellen in die Langerhans-Zellen zu einem frühzeitigen Auftreten von zirkulierenden Autoantikörpern gegen zytoplasmatische Inselzellantigene, Inselzelloberflächenantigene, Glutamatdecarboxylase und Insulin [14]. Diese Antikörper sind schon lange vor Manifestation der Erkrankung nachweisbar [11]. Immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin A [15] oder monoklonale Antikörper können den Krankheitsverlauf verzögern [16, 17]. In der Literatur wird als aktivierender Mechanismus der Autoimmunantwort auch ein parainfektöser Einfluss, beispielsweise im Rahmen von Coxsackie-Virusinfektionen, beschrieben [18].

1.2 Diabetes mellitus und Wundheilung

Wundheilungsprozesse können bei Menschen mit Diabetes mellitus, insbesondere wenn dieser über eine längere Zeitdauer besteht, im Vergleich zu Stoffwechselgesunden deutlich verzögert sein [19]. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die Wundheilung bei Menschen mit Diabetes mellitus und schlecht geführten Blutzuckerspiegel beeinträchtigt wird.

Der Prozess der Wundheilung beim Menschen wird durch verschiedene Signalkaskaden, bestehend aus Chemokinen und Zytokinen, unterstützt, welche durch die Interaktion von Fibroblasten, Keratinozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Endothelzellen gesteuert und aufrecht erhalten werden [19]. Im Rahmen der

durch die Wunde verursachten Hypoxie induziert von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen freigesetztes VEGF (vascular endothelial growth factor) die Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) im Knochenmark. Hieraus resultiert beim Menschen ein Anstieg der Stickstoffmonoxid-Konzentration, wodurch die Freisetzung von EPC (endothelial progenitor cells) aus dem Knochenmark stimuliert wird. Weiterführend konnte in einer tierexperimentellen Arbeit an diabetischen Mäusen nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von eNOS im Knochenmark eingeschränkt ist, wodurch die Mobilisation von EPC gehemmt wird [20].

Die Ausbildung neuer Blutgefäße aus präexistierenden Kapillaren, welche die Wundränder penetrieren, wird als eine der essentiellen Komponenten im Wundheilungsprozess angesehen [21]. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Diabetes mellitus wird jedoch durch Mikro- und Makroangiopathie die Durchblutung im Gewebe, insbesondere in den kapillaren Endstrecken, eingeschränkt. Hierdurch verringert sich die Sauerstoffversorgung, die Anzahl an inflammatorischen Zellen, welche das Wundgebiet erreichen, und somit auch die Menge an Mediatoren, die durch diese Zellen freigesetzt werden. Neben der Angiopathie scheint auch eine erhöhte Glukosekonzentration im Wundgebiet die Wundheilung zu stören: Die topische Applikation von Glukose auf Wunden nicht-diabetischer Ratten konnte einen direkten hemmenden Einfluss auf die Angiogenese zeigen [22].

Allgemein sind Wundheilungsprozesse durch Wachstumsfaktoren gesteuert. Die Konzentration von IGF 1 und IGF 2 (insulin-like growth factor) ist in Wunden diabetischer Ratten reduziert [23]. Zudem konnte im Umkehrschluss gezeigt werden, dass in Wunden von diabetischen Tieren durch die Zugabe von IGF ein positiver Einfluss auf die Wundheilung zu verzeichnen ist [24]. Für TGF- β (transforming growth factor- β) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass dieser für die Wundheilung von großer Bedeutung ist und eine Reduktion zu einer Verzögerung der Wundheilung führt. In der Wundflüssigkeit von diabetischen Ratten ist die TGF- β Konzentration vermindert [25]. Bei Menschen mit Diabetes mellitus und venösen Ulcera sowie frischen Wunden konnte gezeigt werden,

dass die physiologische Erhöhung der TGF- β Konzentrationen nicht stattfand [26, 27]. Analog zum TGF- β spielt auch der PDGF (platelet-derived growth factor) eine Rolle in den meisten Phasen der Wundheilung. Ein Mangel an PDGF konnte in Wundflüssigkeiten von diabetischen Patienten gefunden werden [28]. Die PDGF Konzentration war auch signifikant erniedrigt im Wundgewebe von Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus. Die topische Anwendung von PDGF konnte somit im Rattenversuch einen positiven Einfluss auf die akute Wundheilung sowie eine erhöhte Widerstandsfähigkeit von Wunden zeigen [29].

1.3 Aufbau des Trommelfells

Das Trommelfell stellt eine Membran dar, welche den äußeren Gehörgang vom Mittelohr trennt [30]. Morphologisch entspricht es einem nach innen gerichteten Trichter, an dessen Spitze sich der Umbo befindet [31]. Das Trommelfell wird in eine unten gelegene größere Pars tensa und eine obere, kleinere und deutlich lockerere Pars flaccida unterteilt. Zieht man eine Linie in Verlängerung des Hammergriffs sowie eine weitere senkrecht dazu durch den Umbo, lässt sich das Trommelfell in einen vorderen oberen, vorderen unteren, hinteren oberen und hinteren unteren Quadranten einteilen [32]. Histologisch untergliedert man das Trommelfell in drei Schichten. Hierzu zählt von außen nach innen die Epidermis, die Lamina propria sowie die Mukosa. Diese Schichten werden jeweils durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Der Aufbau der Epidermis ist für die Pars tensa sowie Pars flaccida identisch und besteht aus keratinisierendem, squamösem Epithel mit einem Aufbau aus Stratum corneum, granulosum, spinosum und basale [32]. Die Lamina propria der Pars tensa beinhaltet verschiedene Unterschichten: eine subepidermale, lockere Bindegewebsschicht mit einem äußeren Gefäßplexus, eine fibröse Schicht mit nach außen gerichteten, radiären kollagenen Fasern und nach innen gerichteten, zirkulären kollagenen Fasern. Dieser Schicht schließt sich eine submuköse Bindegewebsschicht an, welche einen inneren Gefäßplexus sowie periphere Nerven beinhaltet. Im Gegensatz zur Pars tensa ist die Lamina propria der Pars flaccida aus lockerem Bindege-

webe mit kollagenen und elastischen Fasern aufgebaut. Darüber hinaus ist analog zur Pars tensa ein innerer und äußerer Gefäßplexus sowie periphere Nerven vorhanden. Die gesamte Lamina propria weist zudem Fibroblasten, Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen auf [33]. Die Mukosa sowohl der Pars tensa als auch der Pars flaccida besteht aus niedrigen kuboidalen Zellen sowie wenigen Becherzellen, die vorrangig in der Peripherie zu finden sind [34].

1.4 Trommelfeldefekt

1.4.1 Akuter Trommelfeldefekt

Als häufigste Ursache für einen akuten Trommelfeldefekt wird die akute Otitis media beschrieben [30, 35, 36, 37]. An zweiter Stelle folgen traumatische Trommelfellperforationen, welche häufiger direkt als indirekt auftreten, wobei in der Mehrzahl der Fälle der hintere untere Quadrant betroffen ist [38]. Traumatische oder iatrogene Verletzungen des menschlichen Trommelfells verschließen sich im Allgemeinen in wenigen Tagen spontan [39]. So heilen Trommelfeldefekte in Folge einer zuvor stattgefundenen akuten Otitis media zu 90 %, nach Trauma in circa 80 % der Fälle spontan und nach Parazentesen zur Behandlung eines Mittelohrergusses in nahezu 100 % der Fälle [40, 41, 42, 43].

1.4.2 Allgemeine Wundheilungsprozesse

Der reguläre Wundheilungsprozess nach einer Gewebsverletzung kann in verschiedene, sich teilweise überlappende Phasen eingeteilt werden und soll im Folgenden aufgrund der sehr komplexen Abläufe in verkürzter Form dargestellt werden [44, 45]:

- 1.) Hämostase und Entzündungsphase, welche unmittelbar nach der Verletzung einsetzt und etwa vier bis sechs Tag andauert. Anfänglich treten eine Vasokonstriktion sowie eine Aktivierung der Blutgerinnungskaskade mit damit einhergehender Thrombusbildung auf. Innerhalb der ersten Stunden wandern aufgrund gesteigerter Gewebspermeabilität

neutrophile Granulozyten sowie proinflammatorische Zytokine und aktivierte Wundmakrophagen ein.

- 2.) Proliferationsphase, die etwa vier Tage nach stattgehabter Gewebsverletzung einsetzt und ca. zwei Wochen andauert. Es kommt zu einer Proliferation von Epithelzellen am Wundrand. Thrombozyten und Makrophagen setzen die Wachstumsfaktoren EGF (epidermal growth factor) und PDGF frei, wodurch Fibroblasten vom Wundrand her einwandern und proliferieren. Makrophagen sezernieren bFGF (basic fibroblast growth factor) und TGF- β 1 mit der daraus resultierenden Ausbildung einer extrazellulären Matrix, die als Grundlage zur Einwanderung von Epithelzellen dient.
- 3.) Re-Modellierung, die etwa um den achten Tag beginnt und bis zu einem Jahr andauern kann. Hierbei tritt zwar eine Normalisierung der Hyperproliferation ein, jedoch finden im Bindegewebe weiterhin Umbauprozesse über einen längeren Zeitraum statt.

1.4.3 Wundheilungsprozesse am Trommelfell

Im Unterschied zu den vorab dargestellten allgemeinen Wundheilungsprozessen findet sich nach Trommelfellddefekt zunächst die Ausbildung von Granulationsgewebe und anschließend die Re-Epithelisierung [45]. Somit kann die Wundheilungsabfolge am Trommelfell, bei der die eigentliche Wundheilung erst durch den Verschluss der Epithelschicht beginnt, als einzigartig beschrieben werden [46, 34].

1.4.4 Chronischer Trommelfellddefekt

Heilen Trommelfellddefekte in Folge von Wundheilungsverzögerung nicht innerhalb von 12 Wochen aus, liegt ein chronischer Trommelfellddefekt vor [47, 48]. Die Prävalenz chronischer Trommelfellddefekte ist mit <1 % als niedrig für Industriestaaten zu klassifizieren [48, 49]. Durch Beeinträchtigung der Wundheilung kann in einigen Fällen die Perforation über längere Zeit persistieren, oder überhaupt nicht verheilen [46]. Unterschiedliche Symptome wie Otorrhoe, Cholesteatom und Schallleitungsschwerhörigkeit können die Folge sein [50, 51].

Vor diesem Hintergrund stellt die Therapie der chronischen Trommelfelldefekte eine besondere Herausforderung dar [47]. Ursächlich für chronische Trommelfelldefekte sind z. B. eine Einschränkung der Mittelohrbelüftung durch Funktionsstörung der Tuba auditiva, wiederkehrende akute Otitis media sowie eine postoperative Folge nach Paukenhöhlendrainage. Menschen mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte haben aufgrund der Tubenbelüftungsstörung ein erhöhtes Risiko für chronische Trommelfelldefekte. Als weiteren Risikofaktor für die Entstehung eines chronischen Trommelfelldefektes wird der Diabetes mellitus beschrieben [48]. Die Therapie eines chronischen Trommelfelldefektes besteht aus dem operativen Verschluss im Sinne einer Tympanoplastik mit dem Ziel der Wiederherstellung der Kontinuität des Trommelfells [37, 52].

Es ist nicht bekannt, ob das Vorhandensein des Diabetes mellitus einen Einfluss auf den Erfolg einer Tympanoplastik zur operativen Therapie eines chronischen Trommelfelldefektes hat.

1.5 Diabetes mellitus und Wundheilung am Trommelfell

In mehreren klinischen und experimentellen Studien konnte ein hemmender Einfluss des Diabetes mellitus auf die Wundheilung nachgewiesen werden [27, 53, 54]. Es sind hingegen nur wenige Studien durchgeführt worden, die den Einfluss des Diabetes mellitus auf die Wundheilung bei Trommelfelldefekten untersuchten. In einer Studie von Kaftan et al. wurde die Prävalenz des chronischen Trommelfelldefektes bei Erwachsenen ermittelt sowie die damit assoziierten Risikofaktoren untersucht [55]. Hierbei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines chronischen Trommelfelldefektes und Diabetes mellitus, der jedoch nicht statistisch signifikant war. Vrabec et al. verglichen den Wundheilungsverlauf nach standardisiertem Trommelfelldefekt bei Zucker-fatty-Ratten, Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus sowie einer Kontrollgruppe [56]. Die Zucker-fatty-Ratte bildet ein dem Diabetes mellitus Typ 2 vergleichbares Krankheitsbild aus, welches sowohl mit einer Hyperglykämie als auch einer peripheren Insulinresistenz einhergeht [57]. Streptozotocin, ein zytotoxisches Glucosamin, führt zu einer Zerstörung der β -Zellen des Pankreas,

wodurch es zu einem vollständigen Verlust der Insulinproduktion kommt. Dieser Effekt und die daraus resultierenden Folgen entsprechen dem Diabetes mellitus Typ 1 beim Menschen. In den drei Gruppen kam es jeweils zu einem vollständigen Verschluss der Trommelfelldefekte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es bei den Zucker-fatty-Ratten zu einem verzögerten Defektverschluss, nicht aber bei den Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus. Im Gegensatz dazu wiesen Greenwald et al. nach, dass ein Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus bei der Ratte zu einer weniger ausgeprägten Hemmung der Wundheilung verglichen mit endogenem Diabetes mellitus führt [58]. Daher scheinen Modelltiere besser geeignet, bei denen die diabetische Stoffwechsellage, ähnlich wie bei Menschen mit Diabetes mellitus, genetisch bedingt ist. Darüber hinaus wurde in der Studie von Vrabec et al. die Hyperglykämie der diabetischen Ratten nicht behandelt. Dies entspricht aber nicht der Situation beim Menschen. Üblicherweise erhalten Menschen mit Diabetes mellitus eine dem Krankheitsbild angepasste medikamentöse oder Insulintherapie. Dennoch treten bei diesen Patienten Situationen ein, in denen die diabetische Stoffwechsellage aufgrund von Blutzuckerschwankungen und damit einhergehend verändertem oder erhöhtem Insulinbedarf als nicht optimal angesehen werden muss [59]. Der Effekt einer engmaschigen Insulintherapie beim insulinpflichtigen Diabetes mellitus sowie die verschiedenen zugrundeliegenden Ätiologien des Krankheitsbildes können jeweils einen Einfluss auf die Wundheilung am Trommelfell haben.

1.6 Modelltiere

Vor dem Hintergrund, dass weder klinische Studien noch in-vitro Untersuchungen realisierbar sind, verbleiben lediglich tierexperimentelle Versuche zur Analyse von Wundheilungsprozessen am Trommelfell. Diese können mit verschiedenen Spezies durchgeführt werden. Entsprechende Arbeiten liegen für Ratten, Meerschweinchen und Chinchillas vor [36, 60, 61, 62, 63]. Für die vorliegende Arbeit wurde die Ratte als Versuchstier aufgrund einer dem Menschen ähnlichen Trommelfellstruktur sowie aus Kostengründen bevorzugt [64, 65]. Der kleinere

Trommelfelldurchmesser im Vergleich zum Chinchilla wurde in Kauf genommen, da die Vorteile insbesondere der einfacheren Tierhaltung überwogen. Darüber hinaus eignet sich die Ratte für die vorliegenden Untersuchungen aufgrund der Verfügbarkeit des verwendeten validierten und etablierten Diabetes-Modells. Weitere Studien untersuchten ebenfalls im Tiermodell der B(io)B(reeding)/O(ttawa)K(arlsburg) Ratte die Wundheilung im Knochen [59, 66, 67, 68].

Die spontan-diabetische BB/OK-Ratte entwickelt einen autoimmunbedingten Diabetes mellitus Typ 1 mit Charakteristika, die denen des Diabetes mellitus Typ 1 des Menschen ähnlich sind. Hierzu gehören ein frühzeitiges Auftreten des Krankheitsbildes, das Vorkommen bei schlanken Tieren sowie das Vorhandensein von Glukosurie, Hyperglykämie, Hypoinsulinämie und Ketoazidose in beiden Geschlechtern. Ursächlich für den BB/OK-Diabetes ist eine spezifische Autoimmunreaktion gegen β -Zellen innerhalb der Langerhans-Zellen des Pankreas mit der direkten Folge einer Insulitis. Wie beim Menschen ist die Krankheitsentwicklung als multifaktoriell anzusehen, wodurch die BB/OK-Ratte als geeignetes Modell für den menschlichen Diabetes mellitus Typ 1 und den daraus resultierenden Komplikationen erscheint [69, 70]. Die Komplexität der Wundheilungsprozesse bedingt, dass in-vitro-Studien zur Untersuchung der Beeinflussung der Wundheilung am Trommelfell nicht geeignet sind. Die Studie musste daher am vorliegenden Tiermodell erfolgen.

Ob die Geschwindigkeit der Trommelfellheilungsprozesse bei Menschen mit Diabetes mellitus grundsätzlich verzögert ist und durch eine schlechte Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage zusätzlich beeinträchtigt werden, ist bisher nicht bekannt. Studien zu dieser Fragestellung sind aus verschiedenen Gründen beim Menschen nicht durchführbar. Dazu zählen, dass ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus wegen der drohenden akuten Komplikationen eines hyperglykämischen Schocks sowie der möglichen Langzeitschäden wie der diabetischen Retinopathie und Nephropathie unbedingt vermieden werden müssen. Darüber hinaus ist es ethisch nicht vertretbar, Trommelfelldefekte an Probanden zu Forschungszwecken zu verursachen.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage bei spontan-diabetischen BB/OK Ratten auf den zeitlichen Verlauf der Wundheilung des Trommelfells verglichen mit nicht diabetischen Kontrolltieren zu untersuchen. Weiterhin betrachtete diese Arbeit die Frage, inwiefern die Qualität der Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage bei Ratten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus die Wundheilungsprozesse zusätzlich beeinträchtigten.

2. Material und Methoden

2.1 Formale Voraussetzungen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittel und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Die Versuchstiere wurden entsprechend der Auflagen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) behandelt. Die Versuchsleiter waren zum Zeitpunkt der Studie durch die Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) geprüft und zur Durchführung von tierexperimentellen Studien ermächtigt.

2.2 Versuchstiere

Es wurden 40 spontan-diabetische BB/OK Ratten mit den Diabetes-induzierenden Genen Iddm 1 (insulin dependent diabetes mellitus) und Iddm 2 sowie 20 nicht-diabetische BB/OK Ratten ohne diese Genvarianten verwendet (BB.1K x BB.4S).

Die Größe der einzelnen Gruppen wurde anhand von Studien mit vergleichbarem Studiendesign und vergleichbarer Fragestellung gewählt [56]. Des Weiteren hat eine Power-Analyse basierend auf den Tabellen von Machin et al. ergeben, dass eine Studie mit 20 Ratten pro Gruppe eine ausreichende Power bietet, um Unterschiede herauszufiltern [71]. Basierend auf einem Fehler erster Ordnung von 0,05, einem zu erwartenden mittleren Unterschied zwischen den Gruppen von zwei Tagen und einer Standardabweichung von zwei Tagen ist von einer Studien-Power von 91,7 % auszugehen (Two-Sample-Test, T-Test Power Analyse mit Anpassung für den Mann-Whitney-Test). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die geplanten Gruppengrößen geeignet erscheinen, um signifikante Unterschiede abzubilden.

Bei den spontan-diabetischen BB/OK-Ratten entwickelt sich mit hoher Inzidenz ein dem Typ 1 Diabetes des Menschen ähnliches Krankheitsbild. Es treten spe-

zifische Kennzeichen dieser Erkrankung wie Insulinitis, Insulinopenie, Hyperglykämie, Ketoseneigung, Polyurie und Polydipsie auf. Die BB-Ratten wurden 1974 erstmals in einem Wistarrattenaufzuchtstamm der BioBreeding Laboratories in Ottawa (Kanada) entdeckt und gehen auf mehrere spontandiabetische Versuchstiere zurück. Es erfolgte eine Selektion hinsichtlich der Diabetesmanifestation.

Der Diabetes mellitus in den BB/OK-Ratten wird durch eine β -Zell-spezifische mononukleäre Zellinfiltration (Insulinitis) innerhalb der Langerhans-Zellen im Pankreas hervorgerufen. Dieser Autoimmunmechanismus führt zu einer selektiven Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen [69, 72, 73, 74, 75, 76, 77].

Die Tiere entwickeln das Vollbild des Diabetes mellitus durchschnittlich im Alter von $18,6 \pm 4,3$ Wochen, es sind jedoch auch spätere Manifestationszeitpunkte möglich [72]. Es kommt zu einem plötzlichen Einsetzen der Hyperglykämie, welche vergesellschaftet ist mit einem Hypoinsulinismus.

Das Auftreten des Diabetes mellitus kann durch drei rezessive diabetische Gene erklärt werden: Iddm 1, Iddm 2 und Iddm 3. Iddm 1 verursacht eine Lymphopenie und wurde zwischen Loci D4Mit6 und Npy auf Chromosom 4 detektiert. Die Klasse-II-Gene des MHC (major histocompatibility complex) des RTu-Haplotyps entsprechen dem zweiten genetischen Faktor, dem Iddm 2, welcher für die Entwicklung des Diabetes mellitus verantwortlich ist. Iddm 3 wurde auf dem Chromosom 18 zwischen den Loci Olf und D18Mit9 identifiziert [72].

Werden die Ratten nicht umgehend mittels Insulinsubstitution behandelt, kommt es innerhalb weniger Tage zum Tod der Tiere. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung bezüglich des Auftretens der Diabetesmanifestation sind beide Geschlechter gleichermaßen betroffen. Dies gilt auch für den Zeitpunkt der Erstmanifestation.

Untersuchungen zum Einfluss der Diät diabetischer BB/OK Ratten konnten zeigen, dass die Menge an zugeführtem Fett eine Änderung in der Genexpression

bei den Nachkommen zur Folge hat [68]. Offenbar hat die Diät einen unterschiedlichen Einfluss auf die Genexpression während der Schwangerschaft und wird bei männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich reguliert. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Diät mit erhöhtem Fettgehalt einen epigenetischen Einfluss auf die Föten in utero ausübt.

Anders als beim Menschen kommt es bei den diabetischen BB-Ratten weder zu einer arteriellen Hypertonie noch zu einer Nephropathie.

2.3 Tierhaltung

Die spontan-diabetischen BB/OK-Ratten und die nicht-diabetischen BB/OK-Ratten wurden im Institut für Pathophysiologie, Abteilung für Versuchstierkunde der Universitätsmedizin Greifswald gezüchtet und unter strengen hygienischen Bedingungen frei von Pathogenen gehalten. Der Gesundheitszustand der Versuchstiere wurde durch speziell geschultes Tierpflegepersonal sichergestellt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die Tiere keine Systemerkrankungen entwickelten, welche Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchungen gehabt hätten. Die Tiere wurden in Macrolon-Käfigen (Ehret GmbH, Deutschland, Größe III) in Gruppen von zwei oder drei Ratten untergebracht. Ihnen wurde ein ständiger Zugang zu speziellem Futter (Ssniff[®], Soest, Deutschland) und Wasser ermöglicht. Die Lichtverhältnisse wurden im Sinne eines geregelten 12-Stunden Tag-Nacht-Wechsels (6-18 Uhr, 18-6 Uhr) angepasst, um eine möglichst stabile Umwelt zur Vermeidung von unerwünschten Nebeneffekten durch Störung des circadianen Rhythmus zu gewährleisten.

2.3.1 Diabetes-Diagnostik

Der Diabetes-Status der Tiere wurde durch die Messung des Glucosegehaltes im Urin (Diabur-Test 5000, Boehringer, Mannheim, Deutschland) diagnostiziert. Daran anschließend erfolgte die Messung des Blut-Glucose-Spiegels. Ein Wert von >300 mg/dL an zwei aufeinanderfolgenden Tagen war maßgebend, um eine Zuordnung in die Gruppe der spontan diabetischen Ratten vorzunehmen [69].

2.3.2 Diabetes-Therapie

Die diabetischen Versuchstiere wurden täglich mittels subkutaner Applikation von Insulin (Lente[®], Novo Nordisk, Dänemark) therapiert, wobei die Insulindosis pro Tier zwischen 1 IU/kg und 6 IU/kg variierte. Diese Spannbreite ergab sich aus dem Körpergewicht der Tiere und der individuellen Blut-Glucose-Konzentration [69].

2.4 Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage

Die Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage wurde durch die Tierpfleger gewährleistet, welche die Aufgabe hatten, während der Versuche eine Hälfte der 40 diabetischen Ratten mit einer dem Körpergewicht angepassten Insulindosis zu therapieren. Die zweite Hälfte der diabetischen Ratten wurde mit einer für das Körpergewicht zu geringen Insulinmenge behandelt. Nur die Tierpfleger kannten die Aufteilung der Tiere in Gruppen mit unterschiedlicher Quantität der Insulindosierung. Den Versuchsleitern war diese Aufteilung während der Versuchsreihe nicht bekannt. Eine dem Körpergewicht angepasste Insulindosis bedeutet jedoch nicht, dass der diabetische Stoffwechsel dauerhaft gut eingestellt ist. Umgekehrt bedeutet eine im Verhältnis zum Körpergewicht zu niedrige Insulindosierung nicht automatisch, dass der diabetische Stoffwechsel tatsächlich schlecht eingestellt ist. Deshalb war die definitive Zuordnung der diabetischen Ratten zur Gruppe mit gut oder schlecht eingestelltem Diabetes mellitus erst am Studienende nach Bestimmung des nachfolgend unter 2.5 beschriebenen Fructosamins möglich.

2.5 Bestimmung des Langzeitblutzuckers zur qualitativen Beurteilung der Stoffwechsellage

Die Bewertung der Qualität der Einstellung des diabetischen Stoffwechsels und damit einhergehend die definitive Zuordnung der diabetischen Ratten zur Gruppe mit gut oder schlecht eingestelltem Diabetes mellitus erfolgte unmittelbar nach Beendigung der Studie durch die Bestimmung von Fructosamin, einem glykierten Serum-Protein. Der gemessene Wert ermöglicht die Beurteilung der

diabetischen Stoffwechsellage der letzten drei Wochen. Je höher der Fructosamin-Spiegel im Blut ist, umso höher war der durchschnittliche Blut-Glucose-Spiegel in dem genannten Zeitraum.

Die Bestimmung des Fructosamins machte die retrospektive Beurteilung des Blutzuckerspiegels möglich. Diese Methode stellt eine Alternative zur HbA1c-Bestimmung dar. Mittels HbA1c-Bestimmung erfolgt die Betrachtung der hyperglykämischen Stoffwechsellage über einen Zeitraum von drei Monaten, wohingegen die Fructosaminkonzentration die Blutglucosekonzentration der letzten ein bis drei Wochen anzeigt [78]. Der Entstehung der glykierten Serumproteine liegt der gleiche Mechanismus zugrunde, wie für das HbA1c, wobei eine Reaktion der Aminogruppen der Proteine mit der Aldehydgruppe der Glucose abläuft. Durch die Amadori-Umlagerung entstehen innerhalb von mehreren Tagen Ketosamine, die irreversibel an Proteine gebunden sind. Die entsprechenden, an Protein gebundenen Ketoamine werden erst mit dem Abbau von Serumproteinen aus dem Blut entfernt. Das Ausmaß der Glykierung ist von der mittleren Blutglucosekonzentration abhängig [79, 80].

Die Untersuchung der Serumproben der Ratten erfolgte mittels Nitroblau-Tetrazolium (NBT) Fructosamin Assay (COBAS INTEGRA 800, Roche Diagnostics Lds., Rotkreuz, Schweiz). Dem Test zur Fructosaminbestimmung liegt die Nitroblau-Tetrazolium-Methode zugrunde, welche eine präzise und automatisierbare Messung der Glykierung von Serumproteinen ermöglicht. Der Probe wird ein NBT-Puffer hinzugefügt, wobei der Farbtest auf der Fähigkeit von Ketosaminen beruht, NBT in einer alkalischen Lösung zur Formazan zu reduzieren. Die Fructosaminkonzentration ist der Geschwindigkeit der Formazanbildung direkt proportional.

2.6 Versuchsablauf

Die Versuchstiere wurden nach einem mittleren Zeitraum von 43 Tagen nach Erstmanifestation des Diabetes mellitus in den Versuchsablauf aufgenommen. Nach diesem Zeitraum entwickeln die Ratten das Vollbild des Diabetes mellitus [69].

2.6.1 Anästhesie

Die Allgemeinanästhesie erfolgte mittels intraperitonealer Anästhesie mit 60 mg/kg Ketamin (Ketamin 10 %, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und 8 mg/kg Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Zur Ermittlung der entsprechenden Dosierungen erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts der Versuchstiere vor jeder Injektion.

2.6.2 Antibiotische Therapie

Präinterventionell wurde eine antibiotische Prophylaxe mit Trimethoprim (16 mg/ml) und Sulfamethoxazol (80 mg/ml) (cotrim-ratiopharm® Ampullen SF, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) in einer Dosis von 0,2 ml/kg subkutan appliziert. Dies diente der Vermeidung von Infektionen und insbesondere der Entwicklung von eitrigen Mittelohrentzündungen, welche zu einer Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse hätte führen können.

2.6.3 Chirurgische Maßnahmen und Befunddokumentation

Die chirurgischen und diagnostischen Maßnahmen fanden unter Verwendung eines Operationsmikroskopes mit 20-facher Vergrößerung statt (OPMI Primo, Carl-Zeiss®, Oberkochen, Deutschland). Die Versuchstiere zeigten keine Anzeichen einer Otitis media oder Otitis externa. Die Myringotomie mit einem Durchmesser von 0,8 mm erfolgte im rechten Trommelfell mit einer halbkugelförmig geschliffenen Nadel im hinteren, oberen Quadranten der Pars tensa. Unmittelbar nach der Perforation wurde jedes Trommelfell mit einem 0° Oto-Endoskop und einer daran angeschlossenen Digitalkamera fotografiert (Karl Storz® 3-Millimeter-Otoendoskop 0°, Karl Storz Kaltlichtquelle 482, Tuttlingen, Deutschland; Nikon® Digitalkamera Coolpix 995, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland).

Die Trommelfelle wurden am siebten, neunten, elften, 14. und 21. Tag nach Perforation mikroskopisch kontrolliert und die Ergebnisse mit dem Endoskop fotodokumentiert (Abbildung 1). Hierfür war zur ausreichend sicheren Beurteilung des Trommelfellbefundes und zur Vermeidung einer erhöhten Stresssituation für

die Versuchstiere eine Allgemeinanästhesie nach dem oben erwähnten Schema notwendig. Neben dem Befund des Trommelfelldefektes wurden sämtliche weitere Trommelfellbefunde im Rahmen der Wundheilung erfasst. Da eine Kontrolle des Trommelfellbefundes nicht täglich erfolgte, wurde der Zeitpunkt des Trommelfellverschlusses definiert als Mittelwert aus letztem Tag mit noch sichtbarer Trommelfellperforation und dem Tag, bei dem zum ersten Mal ein Verschluss der Perforation festgestellt wurde.

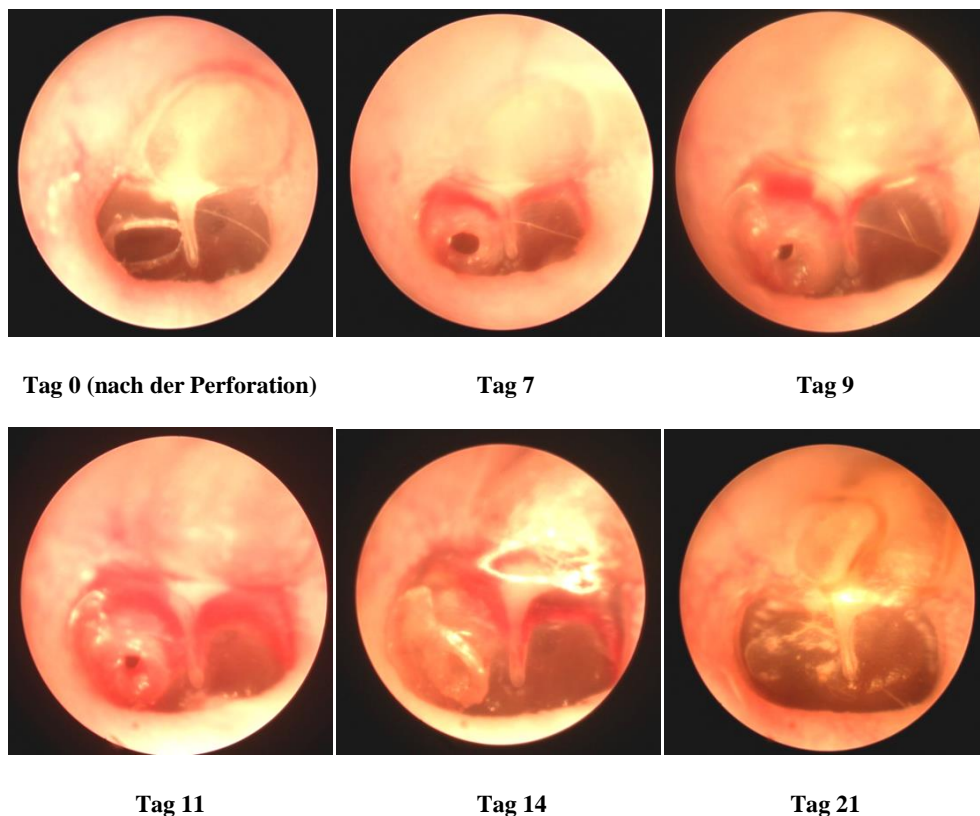


Abbildung 1 Beispiel der Fotodokumentation der Trommelfellbefunde

2.6.4 Planung und Gruppengröße

Um die Wundheilungsprozesse auch histologisch beurteilen zu können, wurden durch die Tierpfleger vier Versuchstiere aus der Kontrollgruppe, der Gruppe mit gewichtadaptierter Insulindosierung und der mit bezogen auf das Körpergewicht zu niedriger Insulindosis am siebten und 14. Tag randomisiert ausgewählt und

mit einer Überdosis Thiopental (Thiopental inresa[®], Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) getötet. Die übrigen Versuchstiere wurden am 21. Tag getötet. Aus diesen wurden vier weitere Tiere pro Gruppe randomisiert ausgewählt, um auch der Trommelfelle einer histologischen Untersuchung zuzuführen. Wie oben beschrieben, erfolgte die definitive Zuordnung der Versuchstiere zu den Gruppen der gut und schlecht kompensierten Diabetes-Ratten erst am Ende der Studie anhand der Fructosamin-Konzentration. Daher konnte am siebten und 14. Tag lediglich eine vorläufige Einschätzung der stattgehabten Stoffwechsellage anhand des Blutglukoseverlaufes vorgenommen werden. Der postmortal bestimmte Fructosamin-Spiegel zeigte, dass nicht alle der anhand des Blutglukoseverlaufes einer der beiden Gruppen zugeordneten Tiere tatsächlich zu dieser gehörten. Hierdurch kam es zu einem Unterschied zwischen der geplanten Anzahl der histologisch zu untersuchenden Trommelfelle pro Gruppe und der tatsächlichen Anzahl der histologisch untersuchten Trommelfelle.

2.6.5 Fixierung, Präparation und Dekalzifizierung

Die getöteten Tiere wurden dekapitiert und die Köpfe anschließend in 4,5 % Formalin für fünf Tage zur Fixierung eingelegt. Anschließend erfolgte die Präparation der Felsenbeine in einem der späteren Aufarbeitung entsprechendem Block, wobei eine Orientierung insbesondere am Verlauf des äußeren Gehörgangs möglich war. Nach der Formalinfixierung und Präparation erfolgte die Dekalzifizierung über drei Tage in einer Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung mit Formaldehyd, Methansäure und destilliertem Wasser (Formical-4[®]-Lösung, Decal Chemical Corporation, USA). Durch diese Lösung bleiben die nukleären und zellulären Bestandteile für die spätere histologische Aufarbeitung und Beurteilung intakt.

2.6.6 Paraffinieren und Anfertigung der histologischen Schnitte

Die Proben wurden anschließend dehydriert und in Paraffinblöcke eingebettet (Shandon Citadel 2000, Thermo Electron Corp., Waltham, USA). Hierzu wurde das Präparat zunächst für eine Minute in Formalin (Formaldehydlösung 4,5 %, pH~7) eingelegt. Nachfolgend erfolgte der Zusatz von 96 % Alkohol in sechs

Schritten für jeweils eine Minute. Daraufhin wurde das Präparat in drei Schritten mit Xylol versetzt, um abschließend für eine Dauer von zwei Minuten in Paraffin eingebettet zu werden. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit einem Mikrotom (HM 355S, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland). Hierbei wurden die 2 µm-Schnitte rechtwinkelig zum Hammergriff angefertigt.

2.6.7 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um eine entsprechende histologische Auswertung vornehmen zu können, erfolgte die Färbung der histologischen Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin. Hiermit lässt sich sowohl eine Zellkernfärbung als auch eine Färbung des Zytoplasmas realisieren.

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurde anhand des nachfolgend aufgeführten Protokolls durchgeführt:

1. Versetzen der Objektträger zunächst für drei Minuten mit Hämatoxylin-Lösung Gill Nr. 3 (6 g/l Hämatoxylin; 52,8 g/l Aluminiumsulfat; 0,6 g/l Natriumjodat),
2. Abspülen mit Leitungswasser,
3. Kurzes Eintauchen des Objektträgers in HCl-Alkohol mit anschließendem fünfminütigem Abspülen unter fließendem Leitungswasser,
4. Erneutes kurzes Spülen – diesmal mit destilliertem Wasser,
5. Für die Dauer von drei bis fünf Minuten wurde Eosin Y (wässrig 0,5 %) zugegeben und für ca. zwei Sekunden Eosin Y alkoholisch mit Phloxin B (0,1 % ((w/v)) Eosin Y; 0,1 % ((w/v)) Phloxin B in absolutem Alkohol) angesäuert,
6. Nochmaliges kurzes Spülen des Objektträgers mit destilliertem Wasser,
7. Abschließendes Versetzen des Objektträgers mit der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 % und 96 %) und Eindecken desselben mit Pertex.

2.6.8 Mikroskopische Untersuchung und Befunddokumentation

Die mikroskopischen Untersuchungen der Trommelfelle wurden mit einem Lichtmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss[®], Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer Colorview-II Digitalkamera (Olympus[®] Europa GmbH, Hamburg, Deutschland), durchgeführt. Die anschließende computergestützte Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgten mit einem Soft-Imaging-System (SIS, Münster, Deutschland).

2.7 Statistische Auswertung

Die Signifikanz der beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen wurde paarweise mit dem Logrank -Test geprüft [81]. Beim Logrank-Test handelt es sich um ein nichtparametrisches Verfahren, welches sich als Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse etabliert hat. Es lässt sich damit überprüfen, ob das Mortalitätsrisiko in zwei oder mehr Gruppen verschieden ist.

P-Werte $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 15 (Statistical Package for the social sciences 2003, SPSS Inc., USA) und SAS Version 9 (Statistical Analysis System 2005, SAS Heidelberg, Deutschland).

3. Ergebnisse

3.1 Einteilung der diabetischen Ratten entsprechend ihrer Stoffwechsellage

Basierend auf der Fructosamin-Konzentration im Serum wurden die diabetischen Versuchstiere in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Tabelle 1). Die Ratten mit gut eingestellter diabetischen Stoffwechsellage wiesen im Mittel einen Fructosamin-Wert von $140 \pm 26 \mu\text{mol/l}$ auf. Dieser Gruppe konnten insgesamt 17 Tiere zugeordnet werden. Bei den hinsichtlich der diabetischen Stoffwechsellage schlecht eingestellten Tieren konnte ein Fructosamin-Mittelwert von $198 \pm 17 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Dieser Gruppe gehörten insgesamt 23 Tiere an (Tabelle 2). Der Unterschied der Fructosamin-Werte war statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

Ergebnisse

	Nr. Versuchstier	Fructosamin in $\mu\text{mol/l}$	Stoffwechsellage
1	776	177	schlecht
2	779	164	gut
3	826	156	gut
4	802	179	schlecht
5	803	188	schlecht
6	799	141	gut
7	799	176	schlecht
8	835	180	schlecht
9	818	191	schlecht
10	832	94	gut
11	794	99	gut
12	823	209	schlecht
13	822	177	schlecht
14	830	155	gut
15	795	195	schlecht
16	796	204	schlecht
17	842	98	gut
18	845	184	schlecht
19	855	152	gut
20	857	102	gut
21	853	124	gut
22	851	151	gut
23	854	184	schlecht
24	865	157	gut
25	864	143	gut
26	871	161	gut
27	862	164	gut
28	941	194	schlecht
29	931	212	schlecht
30	958	199	schlecht
31	929	189	schlecht
32	960	160	gut
33	945	204	schlecht
34	938	221	schlecht
35	946	220	schlecht
36	949	229	schlecht
37	967	205	schlecht
38	963	161	gut
39	1025	202	schlecht
40	972	232	schlecht

Tabelle 1 Postmortale Fructosaminwerte und Gruppeneinteilung der diabetischen Ratten
Nr.: Nummer; μmol : Mikromol; l: Liter

	Geplante Anzahl der Trommelfelle zur histologischen Untersuchung/Gruppe	Tatsächliche Anzahl der Trommelfelle zur histologischen Untersuchung		
		Normoglykämische Ratten (n = 20)	Gut kompen-sierte diabeti-sche Ratten (n = 17)	Schlecht kom-pensierte diabeti-sche Ratten (n = 23)
Tag 7	4	4	5	3
Tag 14	4	4	6	2
Tag 21	4	4	4	4

Tabelle 2 Geplante und tatsächliche Anzahl der Trommelfelle zur histologischen Untersuchung
n: Anzahl

3.2 Alter der Versuchstiere

Die Interventionen wurden bei den gut kompensierten Ratten in einem durchschnittlichen Alter von 129 ± 12 Tagen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war der Diabetes mellitus für 43 ± 2 Tage manifest.

Bei den Ratten mit schlecht kompensiertem Diabetes mellitus betrug das durchschnittliche Lebensalter zum Zeitpunkt der Intervention 138 ± 27 Tage mit einem durchschnittlichen Krankheitsverlauf des Diabetes mellitus von 43 ± 3 Tagen.

Die Versuchstiere der Kontrollgruppe ohne Diabetes mellitus wiesen ein durchschnittliches Lebensalter von 107 ± 1 Tage zum Zeitpunkt der Intervention auf. Das durchschnittliche Körpergewicht der 20 nicht-diabetischen BB/OK Ratten war dem durchschnittlichen Gewicht der diabetischen Ratten vergleichbar.

3.3 Mikroskopische und endoskopische Ergebnisse der Wundheilung

Bei allen Versuchstieren kam es zu einem Verschluss der Trommelfellperforation (Abbildung 2).

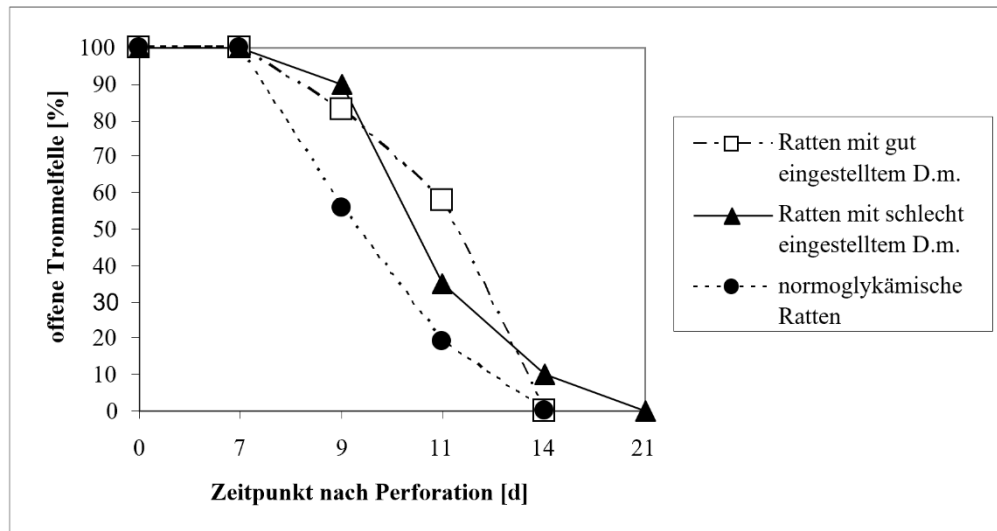


Abbildung 2 Perforationsrate in Abhängigkeit vom Kontrollzeitpunkt
d: Tage, D. m.: Diabetes mellitus

In der Gruppe der normoglykämischen Versuchstiere konnte eine mittlere Dauer bis zum Verschluss der Perforation von 9,8 Tagen festgestellt werden (Konfidenzintervall 95 % 8,8 – 10,4). Für die hinsichtlich des Diabetesstoffwechsels gut kompensierten Ratten zeigte sich eine mittlere Dauer bis zum Verschluss der Trommelfellperforationen von 11,1 Tagen (Konfidenzintervall 95 % 10,1 – 12,1). Bei den Tieren mit schlecht kompensierter Stoffwechselsituation war eine mittlere Dauer von 11,2 Tagen (Konfidenzintervall 95 % 10,1 – 12,3) bis zum vollständigen Verschluss der Trommelfellperforationen zu verzeichnen.

Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen ergab signifikante Unterschiede zwischen beiden diabetischen Gruppen und der Kontrollgruppe. Wird der statistische Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit gut kompensierter diabetischer Stoffwechselsituation betrachtet, ließ sich dieser mit $p = 0,03$ bemessen und erfüllte somit das Signifikanzkriterium. Auch zwischen

der Kontrollgruppe und der schlecht kompensierten Gruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,04$).

Es konnten hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Verschlusses der Trommelfellperforationen zwischen den gut und schlecht kompensierten Diabetes-Ratten nachgewiesen werden ($p = 0,77$).

3.4 Histologische Ergebnisse der Wundheilung

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in beiden Diabetesgruppen erschien der nicht perforierte Bereich des Trommelfells an allen untersuchten Tagen wesentlich dünner als die perforierte Hälfte. Dieser vordere, nicht perforierte Bereich war von einem ein- bis zweischichtigen unverhornten Plattenepithel überzogen. Diesem folgte eine dünne, straffe, zellarme und gefäßlose subepitheliale Schicht. Dieser lag zur Paukenhöhle hin ein einschichtiges Plattenepithel auf (Abbildung 3).

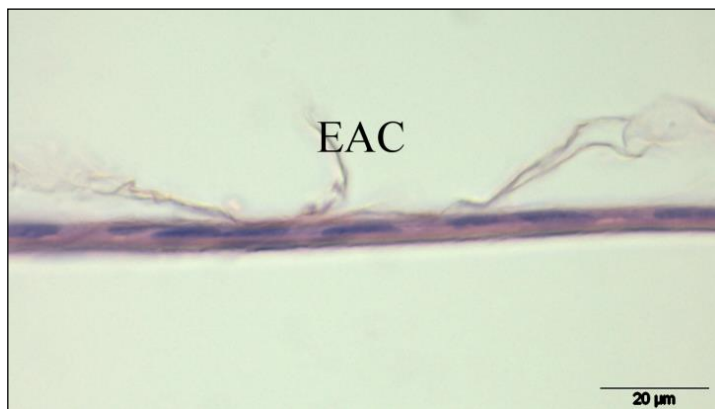


Abbildung 3 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 14 nicht perforierte Seite Mitte (40x vergrößert)

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang)
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie, Universität Greifswald.

3.4.1 Normoglykämische Kontrollgruppe

3.4.1.1 Histologische Untersuchung Tag 7

Die vier untersuchten Trommelfelle zeigten in der hinteren, perforierten Hälfte ein nach außen hin begrenztes mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel (Abbildung 4).

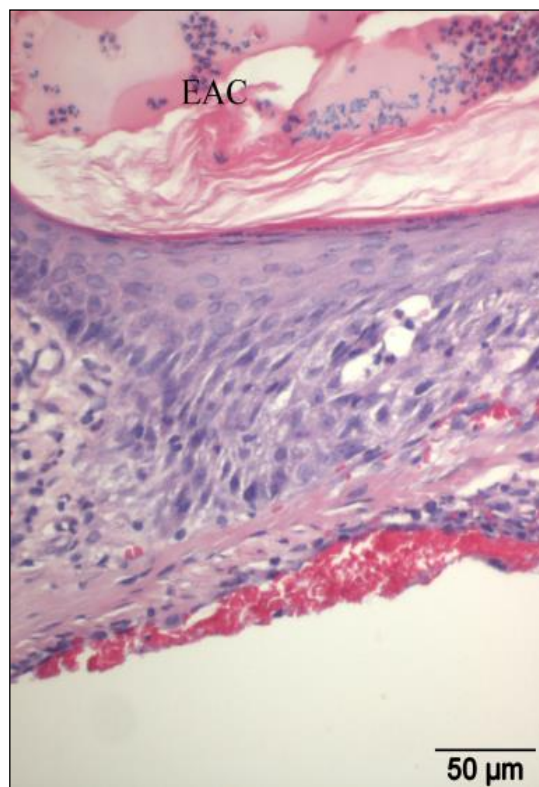


Abbildung 4 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 7 (a)
(20x vergrößert)

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang)
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Miehe,
Institut für Anatomie, Universität Greifswald.

In der subepithelialen lockeren Bindegewebsschicht kamen Granulozyten zur Darstellung. Dieser Schicht folgte eine Lage aus dünnem, straffem Bindegewebe, welchem zur tympanalen Seite des Trommelfells eine dicke, zell- und kapillarreiche Schicht auflag (Abbildung 5).

Die tympanale Seite des Trommelfells war mit einer Schicht aus Granulozyten besetzt. Eine tympanale Epithelschicht ließ sich hier nicht abgrenzen.

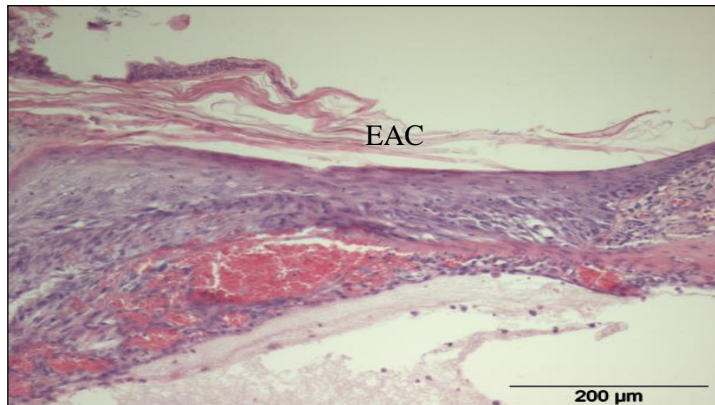


Abbildung 5 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 7 (b) (20x vergrößert)
EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang)
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

3.4.1.2 Histologische Untersuchung Tag 14

Bei den untersuchten vier Trommelfellen zeigten sich die Perforationen histologisch verschlossen. Die hintere, vormals perforierte Hälfte des Trommelfells war verdickt mit bis zu dreischichtigem unverhornten Plattenepithel auf der Außenseite, subepithelialer verdickter kapillarisierte zellreicher Bindegewebsschicht mit fokalen kleinen Einlagerungen von Fibrinoid sowie einem einschichtigen Plattenepithel auf der tympanalen Seite (Abbildung 6).

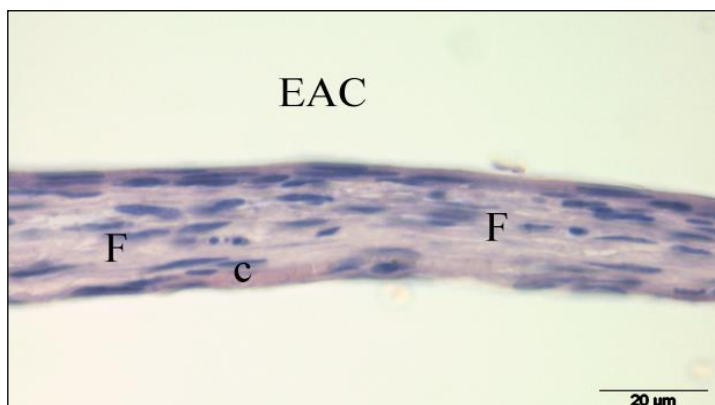


Abbildung 6 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 14 (40x vergrößert)
c: capillary (Kapillare); EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang),
F: Fibrinoid
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

3.4.1.3 Histologische Untersuchung Tag 21

Bei den vier untersuchten Trommelfellen zeigten sich die ehemaligen Perforationen histologisch verschlossen. Die perforierte Hälfte des verheilten Trommelfells war weiterhin verdickt. Diese Hälfte bestand aus einem bis zu zweischichtigen unverhornten Plattenepithel. Die subepitheliale Bindegewebschicht enthielt parallel zur Oberfläche orientierte Zellen mit Einlagerung von Fibrinoid und war nicht kapillarisiert. Die tympanale Begrenzung wurde aus einem einschichtigen Plattenepithel gebildet (Abbildung 7).

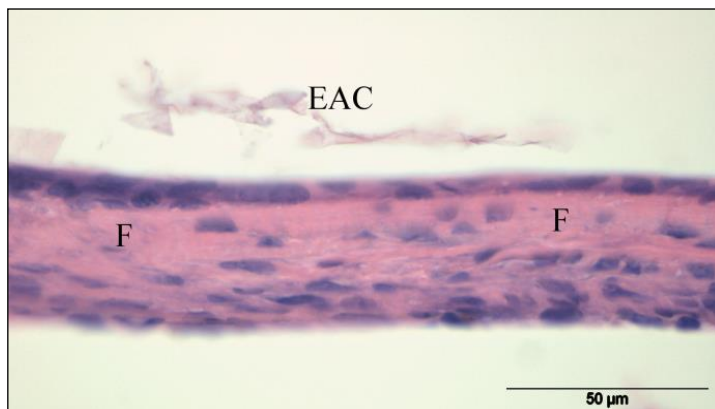


Abbildung 7 Trommelfell - Kontrollgruppe Tag 21 (40x vergrößert)
EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang); F: Fibrinoid
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Miehe, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

3.4.2 Gruppe der Ratten mit gut kompensierten Diabetes-Stoffwechsel

3.4.2.1 Histologische Untersuchung Tag 7

In die histologische Untersuchung der gut eingestellten Diabetes-Ratten konnten am siebten Tag nach Perforation fünf Trommelfelle eingeschlossen werden.

Bei den untersuchten Trommelfellen war die hintere, perforierte Hälfte des Trommelfells stark verdickt. Die Histomorphologie zeigte sich vergleichbar mit den Untersuchungen am siebten Tag nach Perforation in der Kontrollgruppe (Abbildung 8). Dabei kamen in der subepithelialen lockeren Bindegewebs-

schicht Granulozyten zur Darstellung. Dieser Schicht folgte eine Lage aus dünnem, straffem Bindegewebe, welchem zur tympanalen Seite des Trommelfells eine dicke, zell- und kapillarreiche Schicht auflag. Die tympanale Seite des Trommelfells war mit einer Schicht aus Granulozyten besetzt. Eine tympanale Epithelschicht ließ sich hier nicht abgrenzen.

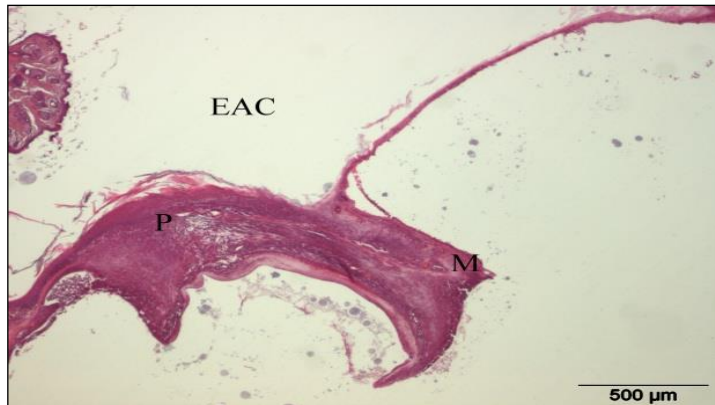


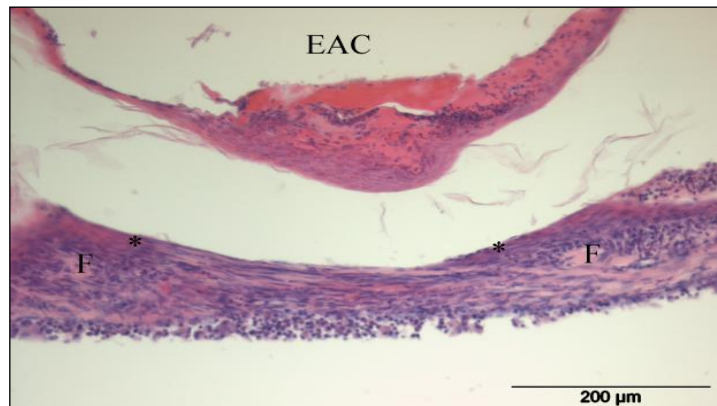
Abbildung 8 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 7 (10x vergrößert)

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang); M: Malleus;
P: Perforation

Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

3.4.2.2 Histologische Untersuchung Tag 14

Bei den sechs untersuchten Trommelfellen der gut kompensierten Diabetes-Ratten erschien das Perforationsareal durch Granulationsgewebe verschlossen. Die Oberfläche war jedoch noch nicht epithelisiert (Abbildung 9).

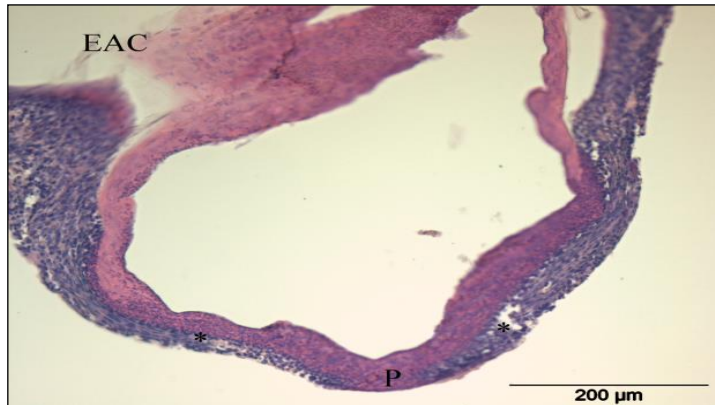


**Abbildung 9 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe
Tag 14 (a) (10x vergrößert)**

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang); F: Fibrinoid;
*: Granulozyten. Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke,
Institut für Anatomie, Universität Greifswald.

Von den Wundrändern ausgehend organisierten sich parallel zur Oberfläche angeordnete Fibroblasten, welche tympanal dem Granulationsgewebe unterlagert waren. Unmittelbar anliegende Teile des Trommelfells waren, im Vergleich mit dem nicht perforierten Areal, leicht verdickt. Sie wurden außen von einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel überzogen.

Das subepitheliale Bindegewebe enthielt kleinere Fibrinoidablagerungen und Granulozyten. Der tympanalen Seite, deren Epithel nicht deutlich sichtbar erschien, lagen Granulozyten auf (Abbildung 10).



**Abbildung 10 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe
Tag 14 (b) (10x vergrößert)**

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang); P: Perforation;
*: Granulozyten. Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Miehe, Institut
für Anatomie, Universität Greifswald.

3.4.2.3 Histologische Untersuchung Tag 21

Am 21. Tag nach Perforation konnten in der Gruppe der gut kompensierten Ratten vier Trommelfelle histologisch untersucht werden.

Die perforierte Hälfte des verheilten Trommelfells erschien verdickt. Diese Hälfte bestand aus einem bis zu zweischichtigen unverhornten Plattenepithel. Die subepitheliale Bindegewebeschicht enthielt parallel zur Oberfläche orientierte Zellen, frei von Fibrinoid und nicht kapillarisiert. Die tympanale Begrenzung wurde aus einem einschichtigen Plattenepithel gebildet (Abbildung 11).

Die Morphologie der Trommelfelle am 21. Tag war damit vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe.

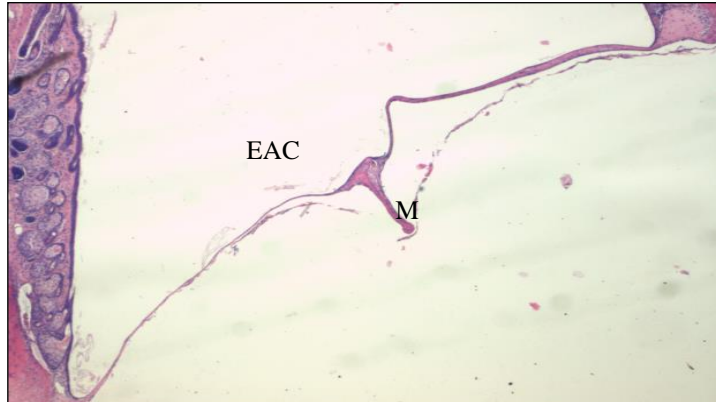


Abbildung 11 Trommelfell - Gut kompensierte Diabetesgruppe Tag 21 (2,5x vergrößert)

EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang); M: Malleus

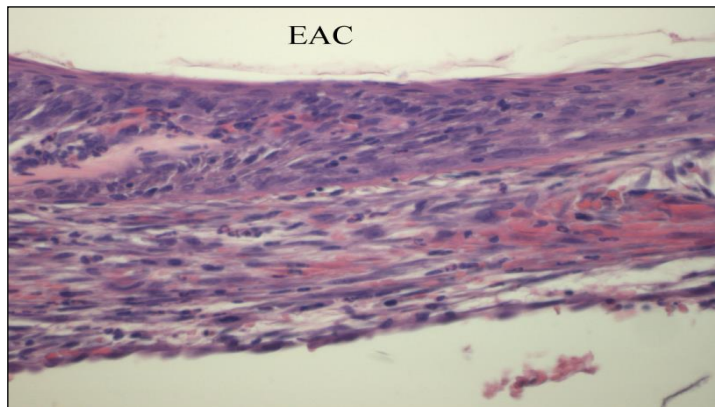
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie, Universität Greifswald.

3.4.3 Gruppe der Ratten mit schlecht kompensierten Diabetes-Stoffwechsel

3.4.3.1 Histologische Untersuchung Tag 7

In der Gruppe der drei untersuchten Ratten mit schlecht kompensiertem Diabetes mellitus zeigte sich das Trommelfell im Bereich der Perforation verdickt. Es war außen von einem hohen mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel überzogen. Das subepitheliale Bindegewebe zeigte sich gut vaskularisiert.

Es enthielt Granulozyten und parallel zur Oberfläche angeordnete Lagen von Fibroblasten. Auf der tympanalen Seite zeigte sich ein einschichtiges Plattenepithel (Abbildung 12).



**Abbildung 12 Trommelfell - Schlecht kompensierte Diabetesgruppe
Tag 7 (10x vergrößert)**

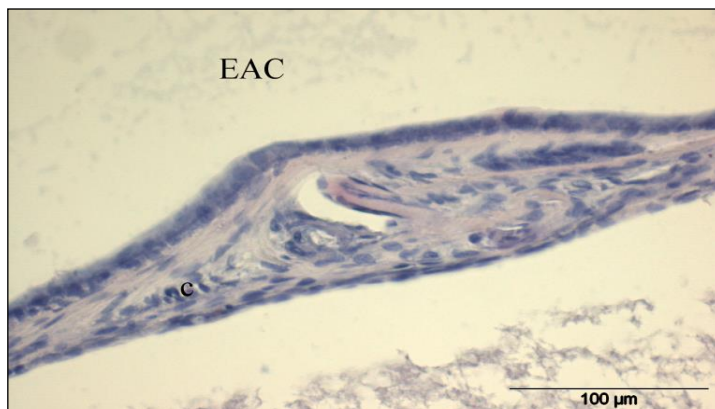
EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang)
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Mieke, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

3.4.3.2 Histologische Untersuchung Tag 14

Am 14. Tag nach Perforation waren die histologischen Schnitte in der Gruppe der schlecht kompensierten Diabetes-Ratten nicht auswertbar. Dieser Gruppe konnten retrospektiv nach Analyse der Fructosamin-Werte nur zwei statt ursprünglich geplant vier Tiere zugeordnet werden. Von den zwei für die histologische Untersuchung zur Verfügung stehenden Präparaten befanden sich alle angefertigten Schnitte außerhalb der Perforationsstelle und des Hammeransatzes am Trommelfell. Ein Nachschneiden der Präparate war nicht möglich, da das Untersuchungsmaterial keine weiteren Bestandteile der Trommelfellebene beinhaltete. Die sich in den vorhandenen Schnitten dargestellten Trommelfellanteile entsprechen morphologisch dem Befund der Ratten der Kontrollgruppe am 21. Tag.

3.4.3.3 Histologische Untersuchung Tag 21

Am 21. Tag zeigten die vier histologisch untersuchten Präparate ein intaktes Trommelfell. Der perforierte, nun verschlossene Anteil des Trommelfells erschien verdickt. Dieses Areal bestand aus einem zwei- bis dreischichtigen un-
verhornten Plattenepithel. In der Nähe des Hammeransatzes war das subepitheliale Bindegewebe kapillarisiert und enthielt einzelne Granulozyten. Die tympanale Begrenzung wurde durch ein einschichtiges Plattenepithel gebildet (Abbildung 13).



**Abbildung 13 Trommelfell - Schlecht kompensierte Diabetesgruppe
Tag 21 (20x vergrößert)**

c: capillary (Kapillare); EAC: external auditory canal (äußerer Gehörgang)
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Miehe, Institut für Anatomie,
Universität Greifswald.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf den Wundheilungsverlauf am Trommelfell. Mit den Untersuchungsergebnissen konnte eine statistisch signifikante, wenn auch zeitlich kurze, Verzögerung der Trommelfellwundheilung spontan-diabetischer BB/OK-Ratten verglichen mit einer Kontrollgruppe tierexperimentell nachgewiesen werden. Bei allen Versuchstieren, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, verschloss sich die Trommelfellperforation spontan. Weiterhin betrachtete diese Arbeit die Frage, inwiefern die Qualität der Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage bei Ratten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus die Wundheilungsprozesse zusätzlich beeinflussten. Hierbei zeigte sich zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlich gut eingestelltem Diabetes mellitus kein Unterschied sowohl in der Dauer bis zum vollständigen Perforationsverschluss als auch hinsichtlich des histomorphologischen Befundes.

In einer vorherigen Studie wurde der Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf die Trommelfellwundheilung bereits von Vrabec et al. untersucht [56]. In diesen Untersuchungen wurden drei verschiedene Versuchstier-Gruppen miteinander verglichen: Zucker-diabetic-fatty-Ratten (ZDF), Streptozotocin-induziert diabetische Ratten (STZ) und eine Kontrollgruppe bestehend aus Sprague-Dawley-Ratten.

Im Unterschied zur vorliegenden Studie, welche ein Typ-1 Diabetes Modell nutzte, handelte es sich bei der ZDF-Ratte um ein Modelltier des Typ-2 Diabetes mellitus, bei der sowohl eine Hyperglykämie als auch eine periphere Insulinresistenz vorlagen. Die STZ-Ratte entwickelt ein dem Typ-1 Diabetes mellitus äquivalentes Krankheitsbild, da das den Tieren applizierte Streptozotocin hochtoxisch auf β -Zellen des Pankreas wirkt. Die β -Zellen wurden von Vrabec et al. innerhalb von 48 Stunden in einen Zelltod überführt, wodurch nachfolgend eine Hypoinsulinämie mit konsekutiver Hyperglykämie eintrat [56]. Es erfolgte eine standardisierte Trommelfellperforation im hinteren oberen Quadranten bei allen Versuchstieren und die nachfolgende Untersuchung der Perforationen ab dem

sechsten postinterventionellen Tag. Ein ähnliches Vorgehen wurde auch für die vorliegende Arbeit gewählt.

In den Untersuchungen von Vrabcic et al. kam es in allen drei Gruppen zu einem vollständigen Verschluss sämtlicher Trommelfellperforationen. In der Kontrollgruppe konnte eine mittlere Heilungsdauer von $8,5 \pm 1,2$ Tage ermittelt werden. In der Gruppe der STZ-Ratten zeigte sich eine mittlere Dauer bis zum Verschluss der Perforationen von $8,9 \pm 1,3$ Tagen. In der Gruppe der ZDF-Ratten ließ sich die mittlere Heilungsdauer mit einem Zeitraum von $11,4 \pm 4,1$ Tagen feststellen [56]. Statistisch signifikant verzögert war nach Vrabcic et al. die Trommelfellwundheilung der ZDF-Ratten verglichen mit der Kontrollgruppe und den STZ-Ratten [56]. Für die Gruppe der STZ-Ratten konnte keine statistisch signifikante Verzögerung der Wundheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

In der Wertung der unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeit von Vrabcic et al. und den hier vorgelegten ist die Betrachtung des Studienaufbaus essenziell. Vrabcic et al. verwendeten einen durch Streptozotocin toxisch induzierten Zelltod der β -Zellen. Dieser stellte sich innerhalb von 48 Stunden ein. Im Gegensatz dazu beruhte das in dieser Studie verwendete Modell auf einer genetisch determinierten Erkrankung und entspricht damit dem Typ 1 Diabetes des Menschen [69, 72, 82]. So entstehen z. B. bei den Ratten mit genetisch bedingtem Diabetes Veränderungen im Stoffwechsel bereits vor der klinischen Manifestation, da latent zunehmend schon über längere Zeit die Insulinproduktion gestört ist [69, 72].

Im Gegensatz zu der Studie von Vrabcic et al. mit Interventionen am Trommelfell drei bis vier Wochen nach Diabetesmanifestation, wurden in der vorliegenden Studie die Eingriffe am Trommelfell erst sechs Wochen nach Diabetesmanifestation durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die BB-OK Ratten das Vollbild des Diabetes mellitus auf, so dass von einer vergleichbaren Stoffwechsellage wie bei Diabetes-Patienten auszugehen ist [69].

In einer weiteren früheren Untersuchung zu Wundheilungsprozessen an der Haut konnten Greenwald et al. ebenfalls zeigen, dass Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus einen geringeren hemmenden Effekt ausübt als endogen verursachter Diabetes mellitus [58]. In dieser Studie wurden Wistar-Ratten in drei verschiedenen Gruppen untersucht: normale Ratten ohne Diabetes mellitus, Ratten mit genetisch induziertem Diabetes mellitus sowie Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus. Die Wunden an der Haut des Rückens wurden nach ein bzw. drei Wochen anhand biomechanischer Parameter analysiert. Die Wunden der Ratten der Normalgruppe wiesen biomechanisch die stabilsten Parameter auf, gefolgt von den Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus. Die Wunden der Ratten mit genetisch induziertem Diabetes mellitus zeigten sich in dieser Studie hinsichtlich ihrer biomechanischen Eigenschaften am wenigsten widerstandsfähig [58].

Eine mögliche Erklärung für die Studienergebnisse von Ratten mit Streptozotocin-induziertem und endogenen Diabetes mellitus liegt in der unterschiedlichen Dauer des zeitlichen Einflusses der diabetischen Stoffwechsellage auf die Wundheilung begründet. Die negativen Effekte des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus setzen im Gegensatz zum endogenen Diabetes mellitus erst direkt nach Ausschalten der Langerhans-Zellen ein.

Dieses Argument wird gestützt durch Bitar et al., der in Untersuchungen eine Abnahme der Kollagen-Ablagerung und damit einhergehende Abnahme der Hautelastizität in Abhängigkeit von der Dauer des Diabetes mellitus feststellte [25]. Im Rahmen dieser Studie konnten nachgewiesen werden, dass mit zunehmender Dauer des Diabetes mellitus in den verschiedenen Gruppen der Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus Ratten eine Abnahme der Expression der mRNA (messenger ribonucleic acid) für Collagen Typ I und III vorlag.

Häufig wird angenommen, dass eine engmaschige Kontrolle und Optimierung der diabetischen Stoffwechsellage eine Verbesserung der Wundheilung zur Folge hat [83]. Im Gegensatz zu dieser verbreiteten Annahme zeigte die vorliegende Arbeit keinen signifikanten Unterschied im Wundheilungsverlauf nach

Trommelfellperforation der gut und weniger gut kompensierten diabetischen Ratten. Die histologischen Untersuchungen der Trommelfelle ließen an Tag 21 lediglich marginale Unterschiede erkennen.

Bei Menschen mit Diabetes mellitus wird durch Mikro- und Makroangiopathie die Durchblutung im Gewebe, insbesondere in den kapillaren Endstrecken, eingeschränkt. Die Glykolisierung an Gefäßwänden, sowie kapillär im Bindegewebe, ist eine Ursache. Hierdurch verringert sich die Sauerstoffversorgung, die Anzahl an inflammatorischen Zellen, welche das Wundgebiet erreichen und somit auch die Menge an Mediatoren, die durch diese Zellen freigesetzt werden. Neben der Angiopathie scheint auch eine erhöhte Glukosekonzentration im Wundgebiet die Wundheilung zu stören: Die topische Applikation von Glukose auf Wunden nicht-diabetischer Ratten konnte einen direkten hemmenden Einfluss auf die Angiogenese zeigen [22].

In einem humanen Wundheilungsmodell wurde der Einfluss des Diabetes mellitus Typ 1 und 2 auf die Wundheilung sowie die Kontrolle der Stoffwechsellage untersucht [53]. Black et al. verwendeten ein Modell, in dem sich Granulationsgewebe innerhalb von Polytetrafluorethylen-Röhrchen bildet, welche subkutan am seitlichen Oberarm von insgesamt 59 Diabetes-Patienten implantiert wurden [53]. Die Qualität der Wundheilung wurde in diesem Modell in Abhängigkeit von der Menge an Kollagen quantifiziert, welches sich in den Röhrchen bildete. Darüber hinaus wurden Fibroblasten kultiviert, die aus dem Granulationsgewebe gewonnen wurden, um anschließend deren Proliferationsverhalten zu analysieren. Die Kollagen-Ablagerung und die Proliferation der Fibroblasten waren vermindert in der Gruppe der Menschen mit Diabetes mellitus Typ 1 verglichen mit den Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 und denen der Kontrollgruppe. Das Ausmaß der Kollagen-Ablagerung korrelierte hingegen nicht mit der Glykämie, welche anhand des HbA1c-Levels der Probanden quantifiziert wurde. Black et al. schlussfolgerten, dass im Gegensatz zu tierexperimentellen Studien mit sehr hohen Blutglukosewerten geringe Abweichungen des Blutzuckerspiegels keinen messbaren Effekt auf die Kollagenproduktion nach sich ziehen [53].

Rahman et al. zeigten, dass die Wundheilung nach Laser-Myringotomie am Trommelfell von nicht diabetischen Sprague-Dawley-Ratten nicht mit einer signifikanten Abnahme der Stabilität der Trommelfelle einhergeht [84]. Die Schwingungseigenschaften des Trommelfells wurden in der Studie mittels Moiré-Interferometrie bestimmt, wobei die funktionellen Eigenschaften bezüglich der Widerstandskraft auf Druckausübung zwei Wochen nach stattgehabter Perforation wiederhergestellt waren. Die Bindegewebsfasern wiesen einen veränderten Verlauf verglichen mit den normalen Trommelfellen auf. Dieser Umstand konnte jedoch durch eine Gewebsvermehrung kompensiert werden. Die histologischen Ergebnisse der Studie stimmen mit den Resultaten der in der vorliegenden Arbeit präsentierten histologischen Untersuchungen überein, bei denen ebenfalls eine Verbreiterung des dreischichtigen Epithels ohne darüberhin ausgehende feingewebliche Veränderungen nachgewiesen werden konnten [84].

Es liegen mehrere Arbeiten vor, in denen der Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf die Wundheilung des Knochens nach Anlage von Bohrlöchern bzw. nach Frakturierungen am Oberschenkelknochen untersucht wurden [59, 66]. In diesen Studien kam die BB/OK-Ratte als Versuchstier zur Anwendung, die Kontrolle und Beeinflussung der diabetischen Stoffwechsellage erfolgte in derselben Weise wie in der vorliegenden Arbeit und wie eingangs beschrieben. Follak et al. konnten einen positiven Effekt der engmaschigen und damit gut kontrollierten Diabetes-Therapie lediglich bei größeren knöchernen Defekten nachweisen [59, 83]. Bei kleineren knöchernen Defekten war kein Unterschied innerhalb der gut und schlecht kompensierten Diabetes Ratten sowie im Vergleich der Diabetes-Ratten mit nicht diabetischen Tieren in der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Diese Ergebnisse sind somit in Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit zu werten.

In einer Untersuchung an ob/ob (obese hyperglycaemic mice) Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich eine verminderte Ansammlung von Kollagen nicht durch die Zufuhr von Insulin korrigieren ließ [85]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu schlussfolgern, dass unter anderem

die für die Wundheilung bedeutsame Menge an Kollagen nicht von der Qualität der Diabetestherapie abhängig zu sein scheint.

In einer verblindeten und randomisierten tierexperimentellen Studie an Wistar-Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus und einer nicht-diabetischen Vergleichsgruppe wurden Einflüsse der diabetischen Stoffwechsellage auf Wundheilungsprozesse nach Inzision der Wangenschleimhaut und Wangenhaut untersucht [86]. In den histologischen Analysen ließ sich in der Gruppe der diabetischen Ratten eine verzögerte Wundheilung bei erhöhter lokaler Entzündungsreaktion beobachten. Diese Ergebnisse lassen sich in Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit interpretieren. Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass die Autoren auf eine statistische Auswertung zugunsten einer alleinigen histomorphologischen Deskription verzichteten.

Die Arbeitsgruppe um Andreassen et al. konnte in der Haut von Ratten mit Toxin-induziertem Diabetes eine um 30 % verringerte Kollagen-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen [87]. Eine Therapie mit Insulin konnte diesen Effekt nicht umkehren, jedoch zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an verabreichtem Insulin und der Spannungsfähigkeit der Wunde. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass eine Insulintherapie grundlegend essentiell für eine adäquate Wundheilung ist. Auf der anderen Seite jedoch scheint sie nicht in der Lage zu sein, den hemmenden Effekte des Diabetes mellitus auf die Wundheilung vorzubeugen [88].

In einer weiterführenden Studie an Patienten mit chronischer Rhinosinusitis wurde der Einfluss des Diabetes mellitus auf das Outcome nach endonasaler endoskopischer Nasennebenhöhlenchirurgie untersucht [89]. Hierbei konnten die Autoren um Hajjij et al. zeigen, dass verglichen mit einer nicht an Diabetes mellitus erkrankten Kontrollgruppe Menschen mit Diabetes mellitus in ähnlicher Weise von einer endonasalen endoskopischen Nasennebenhöhlenoperation profitieren. Dieser positive Effekt ist unabhängig von der Qualität der Insulin-Therapie des Diabetes mellitus und stützt die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.

Untersuchungen zur Verzögerung der Wundheilung am Trommelfell sind beim Menschen nicht möglich, da Trommelfellperforationen im Rahmen von Studien nicht vorsätzlich herbeigeführt werden können. Ebenso ist es ethisch nicht realisierbar, Menschen mit Diabetes mellitus gezielt einer schlechten Stoffwechsellage zuzuführen. Aus diesem Grund musste auf das vorliegende Tiermodell zurückgegriffen werden. Für die vorliegende Arbeit wurde die Ratte als Versuchstier aufgrund einer dem Menschen ähnlichen Trommelfellstruktur sowie aus Kostengründen bevorzugt [65, 64]. Darüber hinaus eignet sich die Ratte für die durchgeführten Untersuchungen aufgrund der Verfügbarkeit des verwendeten validierten und etablierten Diabetes-Modells [46, 47, 90].

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass die vorliegenden Ergebnisse eine Bedeutung für solche Patientinnen und Patienten haben, die Trommelfellperforationen aufweisen und an einem Diabetes mellitus erkrankt sind. Hinsichtlich der Erfolgsaussichten einer Tympanoplastik bleibt festzuhalten, dass bereits das Vorliegen des Diabetes mellitus einen verzögernden Einfluss auch bei optimierter Therapie und engmaschiger Blutzuckerkontrolle auf die Wundheilung haben kann. Insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz des Diabetes mellitus muss diesem Umstand eine zunehmende Gewichtung beigemessen werden.

5. Zusammenfassung

Es wird allgemein angenommen, dass nicht nur das Vorhandensein des Diabetes mellitus, sondern auch die Qualität der Therapie zur Optimierung der diabetischen Stoffwechsellage einen Einfluss auf Wundheilungsprozesse hat.

An 40 spontan-diabetischen B(io)B(reeding)/O(ttawa)K(arlsburg) sowie 20 nicht-diabetischen BB/OK Ratten wurden systematische Trommelfellperforationen vorgenommen. Der Verlauf der Trommelfellwundheilung wurde zu definierten Zeitpunkten fotodokumentiert und histologische Untersuchungen der Wundheilungsprozesse erfolgten zum Versuchsende.

In der Gruppe der normoglykämischen Versuchstiere konnte eine mittlere Dauer bis zum Verschluss der Perforation von 9,8 Tagen festgestellt werden. Für die hinsichtlich des Diabetesstoffwechsels gut kompensierten Ratten zeigte sich eine mittlere Dauer bis zum Verschluss der Trommelfellperforationen von 11,1 Tagen ($p = 0,03$). Bei den Tieren mit schlecht kompensierter Stoffwechselsituation war eine mittlere Dauer von 11,2 Tagen bis zum vollständigen Verschluss der Trommelfellperforationen zu verzeichnen ($p = 0,04$). Die Wundheilung am Trommelfell diabetischer Ratten ist im Vergleich zu stoffwechselgesunden Ratten statistisch signifikant verzögert. Es konnten hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Verschlusses der Trommelfellperforationen zwischen den gut und schlecht kompensierten Diabetes-Ratten nachgewiesen werden ($p = 0,77$). Die Qualität der Stoffwechselkontrolle hat somit keinen spezifischen Einfluss auf die Wundheilung, sondern alleinig das Vorliegen des Diabetes mellitus verzögert diese.

Für Menschen mit Diabetes mellitus und gleichzeitigen Trommelfellperforationen lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass unabhängig von der Blutzuckerkontrolle eine verzögerte Wundheilung, z. B. nach einer Tympanoplastik, resultieren kann.

Literaturverzeichnis

1. Expert Committee on The D, Classification of Diabetes M (2003) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S5-20.
2. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431.
3. Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C (2013) [Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56:668-677.
4. American Diabetes A (2018) Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. *Diabetes Care* 41:917-928.
5. Atkinson MA, Maclaren NK (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331:1428-1436.
6. Davidson A, Diamond B (2001) Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340-350.
7. Riley WJ, Atkinson MA, Maclaren NK (1988) Insulin autoantibodies in pre-diabetes. *Adv Exp Med Biol* 246:45-51.
8. Odugbesan O, Fletcher JA, Sanders A, Bradwell AR, Botazzo GF, Barnett AH (1988) Autoantibodies in Indian-Asians with insulin-dependent diabetes in the UK. *Postgrad Med J* 64:357-360.
9. Tillil H, Kobberling J (1989) [Genetic determinants of diabetes mellitus]. *Internist (Berl)* 30:536-546.
10. Schatz H, Pfeiffer AFH (2014) *Diabetologie kompakt*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
11. Nerup J, Lernmark A (1981) Autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 70:135-141.
12. Brogren CH, Baekkeskov S, Dyrberg T et al. (1983) Role of islet cell antibodies in the pathogenesis of type I diabetes. *Curr Probl Clin Biochem* 12:65-85.

13. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Egeberg J, Nielsen JH (1986) Mechanisms of pancreatic islet cell destruction. Dose-dependent cytotoxic effect of soluble blood mononuclear cell mediators on isolated islets of Langerhans. *Allergy* 41:250-259.
14. Francfort JW, Naji A, Silvers WK, Barker CF (1987) Elevated levels of a lymphocyte subset accurately predict the diabetic state in the BB rat. *Pancreas* 2:141-145.
15. Stiller CR, Dupre J, Gent M et al. (1984) Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 223:1362-1367.
16. Like AA, Biron CA, Weringer EJ, Byman K, Sroczynski E, Guberski DL (1986) Prevention of diabetes in BioBreeding/Worcester rats with monoclonal antibodies that recognize T lymphocytes or natural killer cells. *J Exp Med* 164:1145-1159.
17. Corbett JA, Wang JL, Misko TP, Zhao W, Hickey WF, Mcdaniel ML (1993) Nitric oxide mediates IL-1 beta-induced islet dysfunction and destruction: prevention by dexamethasone. *Autoimmunity* 15:145-153.
18. Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G et al. (1985) Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet* 1:1409-1412.
19. Brem H, Tomic-Canic M (2007) Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117:1219-1222.
20. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M et al. (2007) Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117:1249-1259.
21. Arnold F, West DC (1991) Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 52:407-422.
22. Teixeira AS, Andrade SP (1999) Glucose-induced inhibition of angiogenesis in the rat sponge granuloma is prevented by aminoguanidine. *Life Sci* 64:655-662.
23. Brown DL, Kane CD, Chernausek SD, Greenhalgh DG (1997) Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice. *Am J Pathol* 151:715-724.
24. Tsuboi R, Shi CM, Sato C, Cox GN, Ogawa H (1995) Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1

- stimulates wound healing in animal models. *J Invest Dermatol* 104:199-203.
25. Bitar MS (1998) Glucocorticoid dynamics and impaired wound healing in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 152:547-554.
 26. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW (2002) Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19:440-447.
 27. Blakytyn R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 23:594-608.
 28. Castronuovo JJ, Jr., Ghobrial I, Giusti AM, Rudolph S, Smiell JM (1998) Effects of chronic wound fluid on the structure and biological activity of becaplermin (rhPDGF-BB) and becaplermin gel. *Am J Surg* 176:61S-67S.
 29. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J et al. (1989) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 109:429-440.
 30. Liew LJ, Chen LQ, Wang AY, Von Unge M, Atlas MD, Dilley RJ (2018) Tympanic Membrane Derived Stem Cell-Like Cultures for Tissue Regeneration. *Stem Cells Dev* 27:649-657.
 31. Boenninghaus HG, Lenarz T (2001) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg
 32. Lim DJ (1995) Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 49:101-115.
 33. Krstić RV (1991) Human Microscopic Anatomy. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg
 34. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K (1995) Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 28:913-932.
 35. Bluestone CD (1998) Epidemiology and pathogenesis of chronic suppurative otitis media: implications for prevention and treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 42:207-223.
 36. Wang AY, Liew LJ, Shen Y et al. (2017) Rat model of chronic tympanic membrane perforation: A longitudinal histological evaluation of underlying mechanisms. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 93:88-96.
 37. Immich APS, Pennacchi PC, Naves AF et al. (2017) Improved tympanic membrane regeneration after myringoplastic surgery using an artificial biograft. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 73:48-58.

38. Naumann HH, Helms J, Herberhold C, Kastenbauer E (1992) Band 1 Ohr. In: *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*. Thieme Georg Verlag, Berlin, p 565-575, 583-595, 601-623, 647-653, 761
39. Wang AY, Liew LJ, Shen Y, Wang JT, Von Unge M, Dilley RJ (2017) In response to the letter to the editor regarding: Rat model of chronic tympanic membrane perforation: Ventilation tube with mitomycin C and dexamethasone. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 100:256-257.
40. Amadasun JE (2002) An observational study of the management of traumatic tympanic membrane perforations. *J Laryngol Otol* 116:181-184.
41. Berger G (1989) Nature of spontaneous tympanic membrane perforation in acute otitis media in children. *J Laryngol Otol* 103:1150-1153.
42. Lee P, Kelly G, Mills RP (2002) Myringoplasty: does the size of the perforation matter? *Clin Otolaryngol Allied Sci* 27:331-334.
43. Szeremeta W, Parameswaran MS, Isaacson G (2000) Adenoidectomy with laser or incisional myringotomy for otitis media with effusion. *Laryngoscope* 110:342-345.
44. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117:12S-34S.
45. Smola H, Eming SA, Hess S, Werner S, Krieg T (2001) Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Dtsch Arztebl International* 98:2802.
46. Boedts D (1995) Tympanic membrane perforations. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 49:149-158.
47. Seonwoo H, Shin B, Jang KJ et al. (2019) Epidermal Growth Factor-Releasing Radially Aligned Electrospun Nanofibrous Patches for the Regeneration of Chronic Tympanic Membrane Perforations. *Adv Healthc Mater* 8:e1801160.
48. Chung JH, Lee SH, Woo SY, Kim SW, Cho YS (2016) Prevalence and associated factors of chronic suppurative otitis media: Data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2009-2012. *Laryngoscope* 126:2351-2357.
49. Monasta L, Ronfani L, Marchetti F et al. (2012) Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. *PLoS One* 7:e36226-e36226.
50. Hong P, Bance M, Gratzner PF (2013) Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of

- experimental and tissue engineering studies. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 77:3-12.
51. Cass ND, Patten L, Cass SP (2019) Collagen Allografts Compared With Autologous Tissue in Tympanoplasty. *Otol Neurotol* 40:767-771.
 52. Kohles N, Schulz T, Esser D (2015) [Chronic otitis mediaChronic Otitis Media]. *Laryngorhinootologie* 94:776-789.
 53. Black E, Vibe-Petersen J, Jorgensen LN et al. (2003) Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Arch Surg* 138:34-40.
 54. Goodson WH, 3rd, Hung TK (1977) Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res* 22:221-227.
 55. Kaftan H, Noack M, Friedrich N, Volzke H, Hosemann W (2008) [Prevalence of chronic tympanic membrane perforation in the adult population]. *HNO* 56:145-150.
 56. Vrabec JT (1998) Tympanic membrane perforations in the diabetic rat: a model of impaired wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118:304-308.
 57. Shafrir E (1992) Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab Rev* 8:179-208.
 58. Greenwald DP, Shumway S, Zachary LS et al. (1993) Endogenous versus toxin-induced diabetes in rats: a mechanical comparison of two skin wound-healing models. *Plast Reconstr Surg* 91:1087-1093.
 59. Follak N, Kloting L, Wolf E, Merk H (2004) Delayed remodeling in the early period of fracture healing in spontaneously diabetic BB/OK rats depending on the diabetic metabolic state. *Histol Histopathol* 19:473-486.
 60. Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H, Kelly KE, Cao K (1992) An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 106:47-55.
 61. Dileo MD, Amedee RG (1996) Fibrin-glue-reinforced paper patch myringoplasty of large persistent tympanic membrane perforations in the guinea pig. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 58:27-31.
 62. Spandow O, Hellstrom S (1993) Animal model for persistent tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:467-472.
 63. Wang AY, Shen Y, Wang JT, Friedland PL, Atlas MD, Dilley RJ (2014) Animal models of chronic tympanic membrane perforation: a 'time-out'

- to review evidence and standardize design. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 78:2048-2055.
64. Kaftan H, Hosemann W, Beule A, Junghans D (2004) [An improved animal model for chronic perforation of the tympanic membrane]. *HNO* 52:714-719.
65. Schmidt SH, Hellstrom S (1991) Tympanic-membrane structure--new views. A comparative study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 53:32-36.
66. Follak N, Kloting I, Wolf E, Merk H (2004) Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone* 35:144-152.
67. Kloting N, Follak N, Kloting I (2005) Diabetes per se and metabolic state influence gene expression in tissue-dependent manner of BB/OK rats. *Diabetes Metab Res Rev* 21:281-287.
68. Lange J, Barz T, Ekkernkamp A, Kloting I, Follak N (2013) Gene expression profile in bone of diabetes-prone BB/OK rats fed a high-fat diet. *Genes Nutr* 8:99-104.
69. Kloting I, Vogt L (1991) BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats: features of a subline of diabetes-prone BB rats. *Diabetes Res* 18:79-87.
70. Kloting I, Vogt L, Serikawa T (1995) Locus on chromosome 18 cosegregates with diabetes in the BB/OK rat subline. *Diabetes Metab* 21:338-344.
71. Machin D, Campbell MJ, Fayers P, Pinol A (1997) *Sample Size Tables for Clinical Studies*. Blackwell Science.
72. Kloting I, Berg S, Kovacs P, Voigt B, Vogt L, Schmidt S (1997) Diabetes and hypertension in rodent models. *Ann N Y Acad Sci* 827:64-84.
73. Kloting I, Kovacs P (1998) Phenotypic differences between diabetes-prone BB rat sublines cosegregate with loci on chromosomes X and 10. *Biochem Mol Biol Int* 45:865-870.
74. Kloting I, Kovacs P (1998) Genes of the immune system cosegregate with the age at onset of diabetes in the BB/OK rat. *Biochem Biophys Res Commun* 242:461-463.
75. Kloting I, Schmidt S, Kovacs P (1998) Mapping of novel genes predisposing or protecting diabetes development in the BB/OK rat. *Biochem Biophys Res Commun* 245:483-486.

76. Kloting I, Van Den Brandt J, Kovacs P (1998) Quantitative trait loci for blood glucose confirm diabetes predisposing and protective genes, Iddm4 and Iddm5r, in the spontaneously diabetic BB/OK rat. *Int J Mol Med* 2:597-601.
77. Kloting I, Voigt B, Kovacs P (1998) Metabolic features of newly established congenic diabetes-prone BB.SHR rat strains. *Life Sci* 62:973-979.
78. Chen HS, Wu TE, Lin HD et al. (2010) Hemoglobin A(1c) and fructosamine for assessing glycemic control in diabetic patients with CKD stages 3 and 4. *Am J Kidney Dis* 55:867-874.
79. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR (1983) Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 127:87-95.
80. Kruse-Jarres JD, Jaraus J, Lehmann P, Vogt BW, Rietz P (1989) A new colorimetric method for the determination of fructosamine. *LaboratoriumsMedizin* 13:245-253.
81. Cox DR, D. O (1984) *Analysis of Survival Data*. Chapman and Hall/CRC
82. Kaftan H, Reuther L, Mieke B, Hosemann W, Kloting I (2011) Influence of glycemic control on tympanic membrane healing in diabetic rats. *Laryngoscope* 121:823-827.
83. Kahn CR, Weir GC, King GL, Moses AC, Smith RJ, Jacobson AM (2007) *Joslin's Diabetes Mellitus*. Lippincott Williams & Wilkins (LWW)
84. Rahman A, Hultcrantz M, Dirckx J, Margolin G, Von Unge M (2005) Fresh tympanic membrane perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol* 26:1100-1106.
85. Goodson WH, 3rd, Hunt TK (1986) Wound collagen accumulation in obese hyperglycemic mice. *Diabetes* 35:491-495.
86. Alzoubi F, Joseph B, Andersson L (2017) Healing of soft tissue lacerations in diabetic-induced rats. *Dent Traumatol* 33:438-443.
87. Andreassen TT, Seyer-Hansen K, Oxlund H (1981) Biomechanical changes in connective tissues induced by experimental diabetes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 98:432-436.
88. Andreassen TT, Oxlund H (1987) The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biochemical properties of rat skin incisional wounds. *Acta Chir Scand* 153:405-409.

89. Hajjij A, Mace JC, Soler ZM, Smith TL, Hwang PH (2015) The impact of diabetes mellitus on outcomes of endoscopic sinus surgery: a nested case-control study. *Int Forum Allergy Rhinol* 5:533-540.
90. Kloting I, Kovacs P, Van Den Brandt J (2002) Congenic BB.SHR (D4Mit6-Npy-Spr) rats: a new aid to dissect the genetics of obesity. *Obes Res* 10:1074-1077.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird in der elektronischen Version der Dissertationsschrift aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Greifswald, 10.06.2022

Unterschrift

Publikationsliste

1. Delay of tympanic membrane wound healing in rats with topical application of a tyrosine kinase inhibitor. Kaftan H, Reuther L, Mieke B, Hosemann W, Herzog M. *Wound Repair Regen.* 2008 May-Jun;16(3):364-9
2. The influence of inhibition of the epidermal growth factor receptor on tympanic membrane wound healing in rats. Kaftan H, Reuther L, Mieke B, Hosemann W, Herzog M. *Growth Factors.* 2010 Aug;28(4):286-92.
3. Influence of glycemic control on tympanic membrane healing in diabetic rats. Kaftan H, Reuther L, Mieke B, Hosemann W, Klötting I. *Laryngoscope.* 2011 Apr;121(4):823-7.
4. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 1: influence on tympanic membrane wound healing in rats. Kaftan H, Reuther L, Mieke B, Hosemann W, Beule A. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012 Jan;269(1):87-92.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachfolgenden Personen meinen tief empfundenen Dank aussprechen, ohne die das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Professor Dr. Holger Kaftan sei als mein Doktorvater außerordentlich dafür gedankt, mir das Thema der Arbeit überlassen und mich mit unermüdlicher Geduld und Motivation begleitet zu haben.

Meinem akademischen und klinischen Lehrer, Professor Dr. Werner Hosemann, möchte ich meinen besonderen Dank dafür aussprechen, mich mit seiner Persönlichkeit und seinem für mich vorbildhaften Charakter in den ersten Jahren meines Berufslebens entscheidend geprägt zu haben.

Der Abteilung für Versuchstierkunde und insbesondere Frau Professorin Dr. Ingrid Klötting möchte ich dafür danken, die Versuche mithilfe Ihrer Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter überhaupt erst möglich gemacht zu haben.

Frau Dr. Bärbel Miehe möchte ich für die Unterstützung bei der Befundung und Interpretation der histologischen Ergebnisse danken.

Die größte Dankbarkeit darf ich meinen lieben Eltern aussprechen, die dieses Werk in allen Phasen und mich und meinen Weg mit jeglicher Unterstützung bedacht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 10.06.2022

Unterschrift