

# Zastosowania technik inżynierii tkankowej w leczeniu perforacji błon bębenkowych

## Tissue engineering techniques in repairing of tympanic membrane perforations

MARIA MAKUSZEWSKA <sup>1/</sup>, MAGDALENA SOKOŁOWSKA <sup>2/</sup>, BOŻENA SKOTNICKA <sup>3/</sup>

<sup>1/</sup> Oddział Otolaryngologii, Wojewódzki Szpital Zespolony im. J. Śniadeckiego w Białymstoku

<sup>2/</sup> Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>3/</sup> Klinika Otolaryngologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Inżynieria tkankowa łączy zasady inżynierii materiałowej i nauk przyrodniczych. Stosowana jest w celu wytworzenia materiałów biologicznych do zastąpienia bądź przywrócenia ciągłości i czynności tkanek lub narządów. Wymaga ona odpowiedniego sterowania trzema zasadniczymi składowymi: komórkami (somaticznymi lub macierzystymi), odpowiednim rusztowaniem dla odtwarzającej się tkanki oraz czynnikami stymulującymi ten proces. W pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczącego zastosowania technik inżynierii tkankowej do przyspieszania lub indukowania gojenia perforacji błon bębenkowych. Dotychczasowe doświadczenia w tym zakresie z użyciem komórek macierzystych nie wykazały swojej przewagi. Natomiast liczne materiały wykorzystywane jako rusztowanie dla odtwarzającej się błony (matryce pozakomórkowe allo- i ksenogenne pochodzenia, kolagen, fibroina jedwabna, chitozan) potwierdziły swoją biokompatybilność, brak reakcji immunologicznych po ich zastosowaniu, biodegradację i odpowiednie cechy mechaniczne. Pochodne kwasu hialuronowego znalazły już praktyczne zastosowanie jako związki przyspieszające gojenie błon bębenkowych. Choć czynniki wzrostu wydają się przyspieszać proces gojenia, to konieczne są dalsze badania w celu określenia, które z nich są najbardziej odpowiednie.

**Słowa kluczowe:** perforacje błon bębenkowych, matryce pozakomórkowe, kolagen, fibroina jedwabna, chitozan, kwas hialuronowy, czynniki wzrostu

Tissue engineering combines the principles of engineering and life sciences to develop biological materials that substitute or restore the continuity and function of tissues and organs. This requires the synergistic control of the three components of this process: stem or somatic cells, proper matrix to support the proliferating cells, and inducing factors. This article reviews recent papers on those techniques used to induce tympanic membrane healing. The experiments with stem cells did not show their advantage over the cells of endogenous origin in the tympanic membrane healing process. However, many supporting materials, such as extracellular allo- and xenogenic matrices, collagen, silk fibroin or chitosan, have proved their biocompatibility, nontoxicity and nonimmunogenicity, as well as and suitable mechanical characteristics. Hialuronic acid has found practical application in the dressings used after otological surgery to accelerate the healing of tympanic membrane. Although growth factors tend to enhance the healing of tympanic membrane perforations, further studies are needed to determine which of them are most appropriate.

**Key words:** tympanic membrane perforations, extracellular matrices, collagen, silk fibroin, hyaluronic acid, growth factors

© Otorinolaryngologia 2015, 14(1): 1-9

www.mediton.pl/orl

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr n. med. Maria Makuszevska  
Klinika Otolaryngologii Dziecięcej UM  
ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok  
tel. 85 7450832, e-mail: pedorl@umb.edu.pl

EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu  
bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów  
PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu  
TGF $\alpha$  – transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$   
VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego  
KGF – czynnik wzrostu keratynocytów

### Wstęp

Perforacje błon bębenkowych stanowią stosunkowo częsty problem kliniczny, niosący ze sobą ryzyko nawracających infekcji ucha środkowego oraz przewodzeniowego upośledzenia słuchu. Powstają one na skutek ostrych lub przewlekłych

zmian zapalnych ucha środkowego, urazów lub są następstwem działań lekarskich; diagnostycznych lub terapeutycznych.

Ponieważ błona bębenkowa jest strukturą zawieszoną w powietrzu, gojenie musi przebiegać w sposób odmienny niż w skórze. Badania nad gojeniem perforacji błony bębenkowej w modelach doświadczalnych wykazały, iż w początkowych etapach dominującą rolę odgrywa nabłonek wielowarstwowy płaski pokrywający zewnętrzną powierzchnię błony [1, 2]. Proliferacja tego nabłonka nie rozpoczyna się na brzegu perforacji, ale w pewnym oddaleniu, w okolicy rękkojeści młoteczka i pierścienia włóknistego gdzie znajdują się komórki nabłonkowe o cechach komórek macierzystych [1-3]. Proliferujące i migrujące komórki nabłonkowe tworzą nad brzegami perforacji nawis z warstwą rogową zmieszana z wysiękiem włóknikowym, która nadaje kierunek i utrzymuje odtwarzającą się błonę w odpowiedniej płaszczyźnie [2]. Proliferacja fibroblastów następuje wtórnie w stosunku do migrującej warstwy nabłonkowej [2]. Początkowo pogrubiała blizna na błonie bębenkowej stopniowo ulega ścięczeniu, a odbudowana warstwa kolagenowa nie uzyskuje swojej pierwotnej struktury, włókna kolagenowe są mniej liczne, a ich układ nieregularny. Pod względem funkcjonalnym powstała blizna jest więc znacznie mniej odporna na zmiany ciśnienia wewnątrz ucha środkowego.

Perforacje powstałe w wyniku ostrych infekcji ucha środkowego są zazwyczaj niewielkie i goją się samoistnie. Również perforacje pourazowe, w większości przypadków (54-94%) zamykają się bez interwencji w przeciągu 3 miesięcy [4, 5]. Tendencja do samoistnego gojenia się jest jednak znacznie mniejsza w błonach bębenkowych zmienionych na skutek nawracających i przewlekłych stanów zapalnych ucha środkowego. W populacji europejskiej częstość występowania trwałych perforacji oceniana jest na 0,45-4,1% u osób dorosłych [6]. W tych przypadkach leczenie chirurgiczne – myringoplastyka z wykorzystaniem różnych materiałów – powięź mięśnia skroniowego, chrząstka, zapewniają wysoki odsetek powodzeń (80% do 95%). Jednakże ten zabieg chirurgiczny wiąże się z wysokimi kosztami ponieważ wymaga wyszkolonej kadry, odpowiedniej anestezji i instrumentarium. Konieczność pobrania materiału do przeszczepu, niekiedy wymaga dodatkowych cięć, a przy reoperacjach może tego materiału brakować. Stąd też stałe poszukiwania metod mniej inwazyjnych, które pozwalałyby na wykonanie zabiegu w znieczuleniu miejscowym, bez potrzeby otwierania ucha środkowego [7]. W pracy pragniemy przedstawić stan zaawansowania prac badawczych

w tej dziedzinie. Wiele wskazuje, że w przyszłości metody z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej mogą stać się konkurencyjne w stosunku do tradycyjnych.

Pod koniec dziewiętnastego wieku Blake użył papieru do pokrywania ubytków w błonie bębenkowej w celu przyspieszenia jej gojenia. Metoda ta opierała się na słusznym założeniu, że skrawek papieru będzie służył do ukierunkowania komórek migrujących od brzegów ubytku. Metoda ta, do której wykorzystywano w okresie późniejszym różnego rodzaju folie lub gąbki żelowe, okazała się pomocna w gojeniu perforacji pourazowych. Jednakże we wszystkich tych metodach regeneracja błony bębenkowej następuje poniżej położonego na jej powierzchni materiału, a on sam musi być po wygojeniu usunięty, ponieważ zwykle nie ulega biodegradacji lub jest ona bardzo powolna.

W ostatnich latach podejmowane są próby zastosowania metod inżynierii tkankowej do leczenia trwałych ubytków błony bębenkowej. Koncepcja inżynierii tkankowej powstała ponad 20 lat temu, jako dziedzina łącząca zasady inżynierii materiałowej i nauk przyrodniczych, w celu wytworzenia materiałów biologicznych, które mogłyby być wykorzystywane do zastąpienia bądź przywrócenia ciągłości oraz prawidłowej czynności tkanek lub narządów [8]. Metoda ta wymaga odpowiedniego sterowania trzema zasadniczymi składowymi: komórkami (somatycznymi lub macierzystymi), odpowiednim rusztowaniem dla odtwarzającej się tkanki oraz czynnikami stymulującymi ten proces [8]. Elementy te są również wykorzystywane w próbach zastosowania inżynierii tkankowej do odtwarzania błon bębenkowych [7].

### Elementy komórkowe

W większości dotychczasowych prób zastosowania technik inżynierii tkankowej w gojeniu błon bębenkowych komórki pokrywające i wypełniające egzogenne rusztowanie były pochodzenia endogennego, miejscowego [7]. Potencjał proliferacyjny i migracyjny nabłonka zewnętrznego błony bębenkowej pobudzany poprzez skaryfikację brzegów ubytku jest bardzo duży i w większości przypadków wystarczający. Chociaż większość materiałów stosowanych do odtworzenia szkieletu pozakomórkowego błon bębenkowych cechuje się warunkami do dobrej adhezji i kinetyki wzrostu komórek to rzadko są one stosowane w połączeniu z nimi. Deng i wsp. [9] wykorzystali matryce pozbawione elementów komórkowych ze skóry i opony twardej świni, z allogennymi fibroblastami pochodzącymi z błony bębenkowej do odtwarzania jej ubytków

u świnek morskich. Matrycę bez fibroblastów użyto w grupie kontrolnej. Nie wykazano przewagi matrycy z obecnymi w nich fibroblastami [9].

Wyniki badań nad zastosowaniem komórek macierzystych do przyśpieszenia gojenia błon bębenkowych nie są spójne. W pierwszych badaniach wykonanych na niewielkiej grupie zwierząt – myszokoczkach, w których podawano zawieszinę komórek bezpośrednio na uszkodzoną błonę bębenkową wykazano, że embrionalne komórki macierzyste pozostawały wbudowane w wygojoną błonę bębenkową. Ponadto gojenie następowało szybciej, a odtworzona błona była bardziej oporna na wywierane ciśnienie [10]. Kolejne badania tej samej grupy badaczy przeprowadzone na szczurach, u których ubytek w błonie pokrywano żelatyną, na której następnie umieszczano zawieszinę komórek macierzystych nie potwierdziły tych korzystnych wyników w dłuższym okresie obserwacji [11]. W badaniach przewlekłych perforacji na modelu zwierzęcym stwierdzono, że mezenchymalne komórki macierzyste co prawda nieco przyśpieszały gojenie, ale wywoływały również reakcję zapalną w jamie bębenkowej, prawdopodobnie w efekcie zakażenia [12].

### **Materiały wykorzystywane jako rusztowanie dla gojącej się błony**

Materiały stosowane jako rusztowanie dla odtwarzanej tkanki muszą stanowić odpowiednie środowisko umożliwiające migrację, proliferację i różnicowanie komórek, pełnić złożoną funkcję macierzy pozakomórkowej polegającą na umożliwieniu dyfuzji składników odżywczych i niezbędnych do wzrostu biomolekuł, jak również posiadać odpowiadające odtwarzanej tkance cechy mechaniczne i fizykochemiczne. Ponadto stosowany materiał powinien ulegać biodegradacji, nie wywoływać reakcji zapalnej czy immunologicznej, a szybkość absorpcji powinna odpowiadać okresowi odnowy własnej tkanki. Materiały stosowane w uszkodzeniach skóry mają zwykle porowatą strukturę aby umożliwić migrację komórek. Normalna błona bębenkowa jest strukturą ubogokomórkową, szczególnie jej wewnętrzna warstwa składająca się głównie z włókien kolagenowych. Jednakże w okresie jej odtwarzania niezbędna jest prawdopodobnie większa liczba komórek, na co wskazują wyniki badań histologicznych gojących się błon bębenkowych [1, 2].

Liczne materiały wykorzystywano jako rusztowanie do odtworzenia błony bębenkowej, głównie w badaniach eksperymentalnych. Należą do nich matryce pozakomórkowe, naturalne polimery białkowe (kolagen, fibryna, fibroina jedwabna)

i polisacharydowe (chitozan, pochodne kwasu hialuronowego i alginowego) oraz wytwarzane syntetycznie matryce pozakomórkowe (matryce hydrożelowe i poliglicerolowe) [7]. Większość z tych badań potwierdziła ich użyteczność i właściwe cechy zarówno w sensie biologicznym jak i mechanicznym.

### **Matryce pozakomórkowe**

Matryce pozakomórkowe są to materiały pochodzące z naturalnych źródeł (kseno lub allogenne), pozbawione komórek a zawierające jedynie macierz pozakomórkową, która stanowi szkielet dla odbudowującej się tkanki, a następnie ulega przebudowie i degradacji. Najczęściej są to allogenne macierze skórne (skóra acellularna) wytworzone ze skóry pobranej ze zwłok, w których w następstwie odpowiedniego preparowania pozostawiono nieaktywną immunologicznie substancję pozakomórkową złożoną głównie z kolagenu, zachowującą swoją strukturę przestrzenną, z nieuszkodzonym kompleksem błony podstawnej – AlloDerm [13]. W podobny sposób przygotowuje się materiały xenogeniczne – skóra (Xenoderm), pęcherz moczowy lub warstwa podśluzówkowa jelita cienkiego świni [13]. Zaletą tych materiałów jest brak reakcji immunologicznych po ich zastosowaniu, możliwość przechowywania i natychmiastowa dostępność. Ujemną stroną, ryzyko przeniesienia zakażenia, aczkolwiek obecnie znacznie zminimalizowane [13].

Próby wykorzystania skóry acellularnej pochodzenia ludzkiego przeprowadzono zarówno na zwierzętach, w badaniach eksperymentalnych, jak i w próbach klinicznych u ludzi. Badania eksperymentalne wykonane na królikach z przewlekłymi perforacjami błon bębenkowych wykazały, że materiał ten może być alternatywą dla materiałów tradycyjnych [14-16]. W porównaniu do powięzi mięśnia skroniowego wyniki anatomiczne i otoskopowe były podobne, natomiast w ocenie histopatologicznej błony odtwarzanej z użyciem tego materiału wykazywały bardziej nasiloną neowaskularyzację i naciekanie fibroblastów przy podobnym odczynie zapalnym [14]. Podobne wyniki uzyskali Qin i wsp. [17] wykonując badania na świnkach morskich.

AlloDerm jest dostępną na rynku i dopuszczoną do stosowania matrycą pozakomórkową pochodzącą ze skóry ludzkiej. Ze względu na jej dostępność jest to w chwili obecnej najczęściej stosowany materiał. Wyniki myringoplastyk z zastosowaniem tego materiału założonego techniką „podkładania” u chorych z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego były równie dobre jak przy technikach z użyciem autoprzyszczepów [18, 19]. Odsetek powodzeń wynosił od 87,5% do 100% [18-21]. Nawet

u chorych reoperowanych na skutek poprzedniego niepowodzenia uzyskano zadowalające wyniki słuchowe i anatomiczne [21]. Odsetek powodzeń nie zależał od wielkości i lokalizacji perforacji [20].

Lai i wsp. [22] porównali wyniki myringoplastyk u dzieci z użyciem AlloDermu założonego na błonę bębenkową z wykonanymi techniką klasyczną (powieź mięśnia skroniowego założona pod błonę bębenkową). Chociaż dzieci z tej pierwszej grupy miały większe perforacje, to wyniki zarówno anatomiczne jak i słuchowe w obu grupach były podobne [22].

Raj i wsp. [19] przedstawili randomizowane badania chorych z suchymi, centralnymi perforacjami porównujące wyniki przezprzewodowych myringoplastyk wykonywanych techniką podkładania z użyciem powięzi lub skórnej matrycy pozakomórkowej pochodzenia ludzkiego. Wyniki słuchowe i odsetek zamkniętych błon bębenkowych był podobny w obu grupach chorych (90% v 95%). Wszyscy autorzy podkreślają, że allogenne matryce pozakomórkowe pozwalają na skrócenie zabiegu i mogą się przydać szczególnie w przypadkach gdy brak jest materiału autogenego lub jest go zbyt mało.

Jako matryce pochodzenia zwierzęcego w badaniach eksperymentalnych nad uzupełnianiem ubytków błony bębenkowej wykorzystywane były: ściana pęcherza moczowego [23], tkanka podśluzówkowa jelita cienkiego [24] i otrzewna świni [25, 26]. Chociaż oba z tych badań zostały przeprowadzone na małej liczbie zwierząt – królików, badania histologiczne wykazały, że przy zastosowaniu materiału z pęcherza moczowego świni odtworzona błona wykazywała grubszą warstwę włóknistą z dobrze uporządkowaną warstwą włókien kolagenowych [23]. Mimo tych zachęcających wyników i faktu, że xenografty np. ściana żyły wołu [27], były z powodzeniem stosowane w warunkach klinicznych, obecne obawy przed zakażeniami powodują, że materiały te są rzadko stosowane w praktyce.

Z powyższych względów trwają badania nad opracowaniem matryc zbudowanych z naturalnych polimerów białkowych lub polisacharydowych.

### **Kolagen**

Kolagen, główna składowa warstwy wewnętrznej błony bębenkowej wydaje się być idealnym kandydatem do stworzenia odpowiedniego rusztowania dla odtworzenia błony bębenkowej. Kolagen odznacza się odpornością na rozciąganie i elastycznością. Wykazuje również znacznie mniejsze zróżnicowanie międzygatunkowe niż inne białka zwierzęce, dzięki czemu cechuje się małą immunogennością. Ograniczeniem jest jednak ograniczona

kontrola nad przyjmowanym przez niego kształtem – porowatością, wielkością tych porów i połączeń pomiędzy nimi [28]. Jang i wsp. [28] opracowali metodę wytwarzania matryc kolagenowych o kontrolowanej strukturze. Badania wykonane na świnkach morskich z przewlekłymi perforacjami wykazały przydatność tego materiału w odtwarzaniu błon bębenkowych [28]. Inną formą kolagenu, wykorzystywaną w odtwarzaniu błon bębenkowych są błony złożone z atelokolagenu i silikonu dostępne komercyjnie [29-31]. Atelokolagen jest pochodną kolagenu typu I, w którym na skutek trawienia pepsyną usunięto telopeptydy odpowiedzialne w głównej mierze za immunogenność białka [32]. Hakuba i wsp. [29-31] wykorzystują ten materiał w połączeniu z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów do odtwarzania błon bębenkowych u ludzi od ponad 10 lat.

### **Fibroina jedwabna**

W badaniach eksperymentalnych podejmowano również próby wykorzystania innego polimeru naturalnego – fibroiny jedwabnej. Fibroina jest głównym składnikiem włókien jedwabnych, cechuje się elastycznością i wytrzymałością. Biokompatybilność i biodegradacja tego włókna została potwierdzona przez wieloletnie jego stosowanie w niciach chirurgicznych. Biomateriały z fibroiny jedwabnej ulegają degradacji w ustroju szybciej niż te występujące w postaci włókien [33]. Badania *in vitro* wykazały dobrą adhezję i kinetykę wzrostu kertynocytów błony bębenkowej na tym podłożu co wykazało możliwość zastosowania tego szkieletu w odtwarzaniu błony bębenkowej [34, 35]. Kim i wsp. [36] wykorzystali ten materiał w badaniach procesu gojenia ostrych perforacji błony bębenkowej u szczurów. Stwierdzono przyśpieszenie procesu gojenia w porównaniu do uszu, w których zastosowano jedynie pokrycie ubytku papierem [36]. Shen i wsp. [25, 26] przeprowadzili porównanie gojenia się ostrych perforacji w szczurów i świnek morskich przy zastosowaniu takich materiałów takich jak fibroina jedwabna i matryca acellularna pochodząca z otrzewnej świni z gojeniem po pokryciu ubytku papierem lub gąbką żelatynową. Stwierdzono, że zarówno rusztowanie z fibroiny jak i matryca pozakomórkowa istotnie przyśpieszały proces gojenia. Ponadto odtworzona błona bębenkowa uzyskiwała optymalną i jednolitą grubość jak również zachowywała trójwarstwową strukturę z dobrze odtworzoną warstwą włóknistą [25, 26]. Wykazano również, że oba te materiały wywoływały minimalną reakcję zapalną co potwierdza ich odpowiednią biokompatybilność [37].

## Chitozan

Chitozan jest polisacharydem, uzyskiwanym w procesie deacetylacji chityny. Pod względem właściwości podobny jest do ludzkiego włókna kolagenowego. Cechuje się wysoką adhezywnością, biogodnością, nietoksycznością, działaniem mitogennym i antybakteryjnym. Próby zastosowania tego materiału w odtwarzaniu błon bębenkowych były prowadzone przez badaczy koreańskich [38-41] w modelu doświadczalnym ostrych i przewlekłych perforacji błony bębenkowej. W badaniach wykonanych na modelu perforacji ostrych, pourazowych wykorzystywano zarówno chitozan nierozpuszczalny, jak i rozpuszczalny w wodzie [38, 39]. Skrawki tego materiału nakładano na ubytek w sposób podobny do pokrywania ich folią lub papierem, tak więc miał on jedynie nadawać kierunek migracji proliferującym w sposób naturalny keratynocytom a nie zostać wbudowany w błonę bębenkową. Wykazano, że nie powodował on odczynu zapalnego i był dobrze tolerowany. Chociaż nie przyspieszało to procesu gojenia, to powstała blizna była gładsza, zawierała więcej kolagenu o lepiej zorganizowanym ułożeniu [39]. W kolejnych badaniach badacze ci użyli rusztowania złożonego z chitosanu o strukturze przestrzennej, porowatej. W badaniach *in vitro* wykazano dobrą proliferację komórek pochodzących z błon bębenkowych w jego obrębie, co potwierdzono w badaniach *in vivo* w doświadczeniach na zwierzętach. W badaniach histologicznych odtworzone w ten sposób błony wykazywały strukturę trzywarstwową i były grubsze od normalnej błony bębenkowej [40].

Również odpowiednio przygotowany alginian wapnia był wykorzystywany w badaniach eksperymentalnych gojenia przewlekłych perforacji błon bębenkowych. Alginian wapnia jest naturalnie występującym polimerem, pochodzącym z morskich wodorostów często wykorzystywanym w opatrunkach stosowanych w przewlekłych ranach z powodu działania promującego gojenie i proliferację komórek nabłonkowych. Wykorzystywany jest również w pożywkach do hodowli komórek. W zastosowaniu do ubytków błon bębenkowych nadawano mu kształt przypominający dren wentylacyjny bez otworu w środku, tak aby można go założyć do środka ubytku, a zewnętrzne brzegi wychodziły poza jego obręb. Wyniki badań wykonanych na królikach wykazały, że materiał ten oferuje bezpieczne i szybkie zamknięcie małych i średnich ubytków, przyspiesza wzrost komórek i tworzenie podścieliska [42].

Niektóre z tych materiałów takie jak chitozan, alginian wapnia czy kolagen cechują się zdolnością do wiązania i stopniowego uwalniania biomole-

kuł wpływających na proces gojenia, takich jak np. czynniki wzrostu [41]. Stwarza to możliwości wytworzenia takiego szkieletu pozakomórkowego, który będzie stopniowo uwalniał do środowiska czynniki przyspieszające gojenie.

Zastosowanie wyników przedstawionych badań w praktyce klinicznej napotyka wciąż jeszcze na szereg przeszkód. Jedną z nich jest brak dobrego i powszechnie zaakceptowanego modelu zwierzęcego przewlekłych perforacji. Perforacje u zwierząt, nawet dużych rozmiarów zwykle goją się samoistnie w krótkim okresie czasu i utrzymanie ich wymaga specjalnych zabiegów. Dlatego też doświadczenia zebrane na modelach zwierzęcych można przenieść na grunt kliniczny jedynie z dużą ostrożnością. W wielu badaniach stosowane są różne techniki zakładania „łat”, co również wpływa na ocenę wyników leczenia.

## Czynniki wspomagające gojenie

W badaniach eksperymentalnych i klinicznych jako biomolekuły wpływające na przyspieszenie gojenia najczęściej wykorzystywane są pochodne kwasu hialuronowego [43-45] i czynniki wzrostu.

Kwas hialuronowy jest jednym z głównych składników macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej i jego istotna rola na każdym z etapów w gojeniu ran została dobrze poznana [46]. Pochodne kwasu hialuronowego są stosowane od szeregu lat jako opatrunki po zabiegach otologicznych (MeroGel). Ozturk i wsp. [43] przeprowadzili badania na szczurach z ostrą perforacją porównując ten opatrunek z codziennym podawaniem 1% kwasu hialuronowego. W porównaniu z grupą nieleczoną, w grupach leczonych pochodnymi kwasu hialuronowego stwierdzono większy odsetek zamkniętych perforacji w 7 dobie leczenia. Badania histologiczne wykazały w błonach bębenkowych tych zwierząt wyższą ekspresję VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego), bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów) i kolagenu [43]. Z estrów kwasu hialuronowego tworzone są również błony – EpiDisc wykorzystywane do leczenia ostrych perforacji błon bębenkowych lub jako opatrunek po zabiegach otologicznych. Saliba i wsp. [44] przedstawili bardzo dobre wyniki leczenia dużych, również całkowitych, ubytków błony bębenkowej u ludzi przeszczepem tkanki tłuszczowej pokrytym błoną EpiDisc. Zastosowana przez nich technika pozwalała na przeprowadzenie zabiegu w znieczuleniu miejscowym i na znaczne jego skrócenie w stosunku do technik klasycznych [44]. W badaniach eksperymentalnych na świnkach morskich ci sami autorzy wykazali, że zastosowane tu pochodne kwasu hialuronowego powodowały wzrost ekspresji szeregu endogennych czynników wzrostu [45].

Spośród wielu czynników wzrostu biorących udział w gojeniu ran, do chwili obecnej tylko nieliczne (bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu, KGF – czynnik wzrostu keratynocytów, PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu) zostały poddane próbom wykorzystania ich do leczenia perforacji błon bębenkowych w warunkach eksperymentalnych (tab. I). Badania eksperymentalne z zastosowaniem bFGF wykazały skrócenie czasu gojenia i bardziej wartościową bliźnię po ubytku, w ocenie histologicznej – grubsza warstwa kolagenowa. Czynnik ten został również

wykorzystany w badaniach klinicznych do leczenia przewlekłych perforacji. Chociaż wyniki tych badań są obiecujące, nawet w dłuższym okresie obserwacji, to problemem jest czasem konieczność wielokrotnych zabiegów i powstawanie pereł perlaka w odtworzonej błonie bębenkowej (tab. II). Wyniki dotychczasowych badań eksperymentalnych i klinicznych nad wykorzystaniem czynników wzrostu w gojeniu błon bębenkowych zostały podsumowane odpowiednio w tabeli I i tabeli II. Wyniki są często niespójne ze względu na różne modele doświadczalne, różne stężenia i czas podawania czynników wzrostu.

Tabela I. Badania eksperymentalne nad wykorzystaniem czynników wzrostu w gojeniu błon bębenkowych

Autor; rok	Model	Rodzaj perforacji	Materiał badany	Grupa kontrolna	Sposób oceny	Wyniki
Mondain 1991 [47, 48]	szczur	ostra	bFGF	sól fizjologiczna	ocena histologiczna	szybsze gojenie, hipertrofia tkanki łącznej, lepiej zorientowane włókna
Fina 1993 [49]	świnka morska	ostra i podostra	bEGF	placebo-stabilizatory	otoskopia, ocena histologiczna	szybsze gojenie, hipertrofia tkanki łącznej
Vrabec 1994 [50]	szczur	ostra	bFGF	glicerol	otoskopia, tympanometria, ocena histologiczna	skrócenie czasu gojenia o 4 dni $p < 0,0001$ , struktura i funkcja jak w kontroli
Hakuba 2014 [51]	świnka morska	ostra, totalna, laser CO <sub>2</sub>	bFGF/hydrożel, przedłużone uwalnianie	hydrożel, bez interwencji	otoskopia, ocena histologiczna	indukcja regeneracji, bez interwencji – żadna nie zagojona, bEGF+hydrożel – 100%, regeneracja warstwy włóknistej
O'Daniel 1990 [52]	kot	ostra	EGF	podłoże	ocena histologiczna	zmniejszenie perforacji $p < 0,05$ , hiperplazja tkanki nabłonkowej i łącznej
Lee 1994 [53]	królik	przewlekła	EGF/gąbka żelatynowa/bez skaryfikacji	gąbka żelatynowa/ PBS	otoskopia, ocena histologiczna	80 vs 20% $p < 0,01$ , bliźnia grubości normalnej błony, w kontroli dwukrotnie cieńsza
Dvorak 1995 [54]	królik	przewlekła	EGF/długotrwałe podawanie	PBS	otoskopia, ocena histologiczna	100 vs 80% $p = 0,25$ , reperforacje, perlaki, hiperplazja wszystkich warstw, nierekomendowane
Güneri 2003 [55]	szczur	ostra	EGF	bez interwencji	otoskopia, ocena histologiczna	krótszy czas gojenia $p = 0,04$ , bez różnicy w obrazie histologicznym
Ramalho 2006 [56]	królik	podostra	EGF	pentoksyflina doustna, woda destylowana	otoskopia, ocena histologiczna	EGF przyspiesza gojenie $p < 0,001$
Clymer 1996 [57]	szczur	ostra	KGF	glicerol	otoskopia, ocena histologiczna, tympanometria	bez wpływu na czas i odsetek wygojenia, lepsze gojenie w ocenie histologicznej
Ishimoto 2002 [58]	szczur	ostra/przewlekła, sterydoterapia	KGF, bFGF, TGF $\alpha$		ocena histologiczna, BrdU immunohistochemia	KGF hiperplazja nabłonka na brzegu perforacji, bFGF i TGF $\alpha$ hiperplazja nabłonka i warstwy włóknistej przy młoteczku i annulus
Yeo 2000 [59]	szczur	ostra	PDGF	PBS	otoskopia, ocena histologiczna	szybsze gojenie błony, większy odsetek wygojenia, poprawa wzrostu tkanki łącznej

Tabela II. Badania kliniczne z wykorzystaniem czynników wzrostu do leczenia perforacji błon bębenkowych

Autor, rok	Rodzaj perforacji/ liczba badanych	Materiał badany	Grupa kontrolna/ liczba badanych	Sposób oceny	Wyniki
Ramsay 1995 [60]	przewlekła/8	EGF/papier ryżowy, gąbka żelatynowa	papier ryżowy, gąbka żelatynowa, PBS/9	otoskopia	bez wpływu
Rösli 2011 [61]	przewlekła/ 10	PDGF/papier	placebo/10	otoskopia, audio- metria	10% powodzeń w obu grupach, bez wpływu
Hakuba 2010, 2013 [30, 31]	przewlekła, poura- zowa/ 87	bFGF/atelokolagen + silikon	brak	otoskopia, audio- metria	92% powodzeń, 5% perły nabłonkowe
Kanemaru 2011 [62]	przewlekła/ 53	bFGF/gąbka żelatynowa + klej tkankowy	gąbka żelatynowa/ klej tkankowy/10	otoskopia, audio- metria	98,1 vs 10%, liczne powtórne zabiegi
Zhang 2012 [63]	pourazowa/ 53	bFGF	papier ryżowy gąbka żelatynowa/ 51	otoskopia, audio- metria	100 vs 77% p=0,01, skrócenie czasu gojenia 12 vs 43 dni

Przyczyną braku zadowalających efektów przy stosowaniu czynników wzrostu dla przyśpieszenia lub indukowania gojenia błon bębenkowych może być fakt, że dotychczasowe próby opierały się na znajomości działania czynników wzrostu w gojeniu ran skóry. Ponieważ przebieg gojenia błon bębenkowych jest inny, prawdopodobnie również inne czynniki wzrostu biorą w nim udział i bezpośrednio prze-

niesienie doświadczeń z gojenia ran skóry nie jest możliwe. Problem stanowi również sposób podania czynników wzrostu, zwykle jednorazowy. Być może wykorzystanie nowych materiałów do rusztowań ze zdolnością do długotrwałego uwalniania zawartych w nich cząsteczek czynników wzrostu i innych substancji rozwiąże szereg tych problemów.

## Piśmiennictwo

- Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope* 2010, 120(10): 2061-70.
- Zajączkiewicz H, Hassmann-Poznańska E, Skotnicka B, Chyczewski L, Reszeć J, Winnicka MM. Proces gojenia perforacji błon bębenkowych u szczurów. *Otolaryngol Pol* 2014, 68(5): 244-51.
- Knutsson J, von Unge M, Rask-Andersen H. Localization of progenitor/stem cells in the human tympanic membrane. *Audiol Neurotol* 2011, 16(4): 263-9.
- Hempel JM, Becker A, Müller J, Krause E, Berghaus A, Braun T. Traumatic tympanic membrane perforations: clinical and audiometric findings in 198 patients. *Otol Neurotol* 2012, 33(8): 1357-62.
- Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol* 1992, 106(12): 1037-50.
- Browning GG, Gatehouse S. The prevalence of middle ear disease in the adult British population. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1992, 17(4): 317-21.
- Hong P, Bance M, Gratzner PF. Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of experimental and tissue engineering studies. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013, 77(1): 3-12.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993, 260(5110): 920-6.
- Deng Z, Wu J, Qiu J, Wang J, Tian Y, Li Y, Jin Y. Comparison of porcine acellular dermis and dura mater as natural scaffolds for bioengineering tympanic membranes. *Tissue Eng Part A* 2009, 15(12): 3729-39.
- von Unge M, Dirckx JJ, Olivius NP. Embryonic stem cells enhance the healing of tympanic membrane perforations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003, 67(3): 215-9.
- Rahman A, von Unge M, Olivius P, Dirckx J, Hultcrantz M. Healing time, long-term result and effects of stem cell treatment in acute tympanic membrane perforation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007, 71(7): 1129-37.
- Rahman A, Olivius P, Dirckx J, Von Unge M, Hultcrantz M. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation. *Acta Otolaryngol* 2008, 128(4): 352-9.
- Cieślik K, Witkowski W, Drukała J, Waligórska A, Puchała J. Biotechnologiczne opatrunki i żywe substytuty skóry – przegląd i współczesne możliwości zastosowania. *Leczenie Ran* 2005, 2(3): 71-83.
- Downey TJ, Champeaux AL, Silva AB. AlloDerm tympanoplasty of tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol* 2003, 24(1): 6-13.
- Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope* 2001, 111(4Pt 1): 702-7.
- Johnson A, Mixson C, Munday J. Suitability of formaldehyde-treated acellular dermis for tympanic membrane repair in chinchillas. *Otol Neurotol* 2007, 28(6): 778-81.
- Qin H, Sun J, Li X, Liu Y, Jia Z. An experimental study on tympanic membrane reconstruction with acellular dermal matrix. *Acta Otolaryngol* 2012, 132(12): 1266-70.
- Fayad JN, Bairo T, Parisier SC. Preliminary results with the use of AlloDerm in chronic otitis media. *Laryngoscope* 2003, 113(7): 1228-30.
- Raj A, Sayal A, Rathore PK, Meher R. Sutureless tympanoplasty using acellular dermis. *Am J Otolaryngol* 2011, 32(2): 96-9.
- Vos JD, Latev MD, Labadie RF, Cohen SM, Werkhaven JA, Haynes DS. Use of AlloDerm in type I tympanoplasty: a comparison with native tissue grafts. *Laryngoscope* 2005, 115(9): 1599-602.

21. Benecke JE Jr. Tympanic membrane grafting with alloderm. *Laryngoscope* 2001, 111(9): 1525-7.
22. Lai P, Propst EJ, Papsin BC. Lateral graft type 1 tympanoplasty using AlloDerm for tympanic membrane reconstruction in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006, 70(8): 1423-9.
23. Parekh A, Mantle B, Banks J, Swarts JD, Badylak SF, Dohar JE, Hebda PA. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. *Laryngoscope* 2009, 119(6): 1206-13.
24. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol* 2005, 26(4): 563-6.
25. Shen Y, Redmond SL, Teh BM, Yan S, Wang Y, Atlas MD i wsp. Tympanic membrane repair using silk fibroin and acellular collagen scaffolds. *Laryngoscope* 2013, 123(8): 1976-82.
26. Shen Y, Redmond SL, Teh BM, Yan S, Wang Y, Zhou L i wsp. Scaffolds for tympanic membrane regeneration in rats. *Tissue Eng Part A* 2013, 19(5-6): 657-68.
27. Makowski A, Zieliński A. Zastosowanie żyły wołu do myringoplastyki ucha. *Otolaryngol Pol* 1998, 52(3): 311-5.
28. Jang CH, Cho YB, Yeo M, Lee H, Min EJ, Lee BH, Kim GH. Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using 3D collagen with topical umbilical cord serum. *Int J Biol Macromol* 2013, 62: 232-40.
29. Hakuba N, Hato N, Okada M, Mise K, Gyo K. Preoperative Factors Affecting Tympanic Membrane Regeneration Therapy Using an Atelocollagen and Basic Fibroblast Growth Factor. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2015, 141(1): 60-6.
30. Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M i wsp. Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. *Otol Neurotol* 2010, 31(1): 118-121.
31. Hakuba N, Hato N, Omotehara Y, Okada M, Gyo K. Epithelial pearl formation following tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen/silicone membrane and basic fibroblast growth factor: our experience from a retrospective study of one hundred sixteen patients. *Clin Otolaryngol* 2013, 38(5): 394-7.
32. Wysocki T, Sacewicz I, Wiktorska M, Niewiarowska J. Atelokolagen jako potencjalny nośnik terapeutyków. *Post Hig Med Dośw (online)* 2007, 61: 646-54.
33. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, 65(4): 457-70.
34. Ghassemifar R, Redmond S, Zainuddin, Chirila TV. Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes. *J Biomater Appl* 2010, 24(7): 591-606.
35. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Atlas MD, Marano RJ. Utilising silk fibroin membranes as scaffolds for the growth of tympanic membrane keratinocytes, and application to myringoplasty surgery. *J Laryngol Otol* 2013, 127(Suppl 1): S13-20.
36. Kim J, Kim CH, Park CH, Seo JN, Kweon H, Kang SW i wsp. Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. paper patch. *Wound Repair Regen* 2010, 18(1): 132-8.
37. Shen Y, Redmond SL, Papadimitriou JM, Teh BM, Yan S, Wang Y, Atlas MD i wsp. The biocompatibility of silk fibroin and acellular collagen scaffolds for tissue engineering in the ear. *Biomed Mater* 2014, 9(1): 015015.
38. Kim JH, Bae JH, Lim KT, Choung PH, Park JS, Choi SJ i wsp. Development of water-insoluble chitosan patch scaffold to repair traumatic tympanic membrane perforations. *J Biomed Mater Res A* 2009, 90(2): 446-55.
39. Kim JH, Choi SJ, Park JS, Lim KT, Choung PH, Kim SW i wsp. Tympanic membrane regeneration using a water-soluble chitosan patch. *Tissue Eng Part A* 2010, 16(1): 225-32.
40. Kim J, Kim SW, Choi SJ, Lim KT, Lee JB, Seonwoo H i wsp. A healing method of tympanic membrane perforations using three-dimensional porous chitosan scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2011, 17(21-22): 2763-72.
41. Seonwoo H, Kim SW, Kim J, Chunje T, Lim KT, Kim YJ i wsp. Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using an EGF-releasing chitosan patch. *Tissue Eng Part A* 2013, 19(17-18): 2097-107.
42. Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations. *Laryngoscope* 2006, 116(5): 700-4.
43. Ozturk K, Yaman H, Cihat Avunduk M, Arbag H, Keles B, Uyar Y. Effectiveness of MeroGel hyaluronic acid on tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 2006, 126(11): 1158-63.
44. Saliba I, Woods O. Hyaluronic acid fat graft myringoplasty: a minimally invasive technique. *Laryngoscope* 2011, 121(2): 375-80.
45. Saliba I, Alzahrani M, Zhu T, Chemtob S. Growth factors expression in hyaluronic acid fat graft myringoplasty. *Laryngoscope* 2014, 124(6): E224-30.
46. Gałęcka M, Szachta P. Rola kwasu hialuronowego we współczesnej medycynie. *Zakażenia* 2012, 2: 130-4.
47. Mondain M, Saffiedine S, Uziel A. Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1991, 111(2): 337-41.
48. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope* 1993, 103(3): 312-18.
49. Fina M, Baird A, Ryan A. Direct application of basic fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. *Laryngoscope* 1993, 103(7): 804-9.
50. Vrabec JT, Schwaber MK, Davidson JM, Clymer MA. Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. *Laryngoscope* 1994, 104(9): 1059-64.
51. Hakuba N, Tabata Y, Hato N, Fujiwara T, Gyo K. Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. *Otol Neurotol* 2014, 35(3): 540-4.
52. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC, Zogg J, Martinez SA, Nolph MB i wsp. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990, 99(1): 80-4.
53. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM, Scott NM. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol* 1994, 15(1): 10-18.
54. Dvorak DW, Abbas G, Ali T, Welling DB. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. *Laryngoscope* 1995, 105(12Pt1): 1300-4.
55. Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, Erdağ TK, İkiz AO i wsp. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003, 24(3): 371-6.



56. Ramalho JR, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol* 2006, 27(5): 720-7.
57. Clymer MA, Schwaber MK, Davidson JM. The effects of keratinocyte growth factor on healing of tympanic membrane perforations. *Laryngoscope* 1996, 106(3Pt1): 280-5.
58. Ishimoto S, Ishibashi T, Bottaro DP, Kaga K. Direct application of keratinocyte growth factor, basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-alpha during healing of tympanic membrane perforation in glucocorticoid-treated rats. *Acta Otolaryngol* 2002, 122(5): 468-73.
59. Yeo SW, Kim SW, Suh BD, Cho SH. Effects of platelet-derived growth factor – AA on the healing process of tympanic membrane perforation. *Am J Otolaryngol* 2000, 21(3): 153-60.
60. Ramsay HA, Heikkinen EJ, Laurila PK. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: a clinical trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995, 113(4): 375-9.
61. Rösli C, von Büren T, Gassmann NB, Huber AM. The impact of platelet-derived growth factor on closure of chronic tympanic membrane perforations: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Otol Neurotol* 2011, 32(8): 1224-9.
62. Kanemaru S, Umeda H, Kitani Y, Nakamura T, Hirano S, Ito J. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2011, 32(8): 1218-23.
63. Zhang Q, Lou Z. Impact of basic fibroblast growth factor on healing of tympanic membrane perforations due to direct penetrating trauma: a prospective non-blinded/controlled study. *Clin Otolaryngol* 2012, 37(6): 446-51.