

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
Univ.-Prof. Dr. med. Frank Timo Beil

Multiskalige Charakterisierung des Incus bei Patienten mit Cholesteatom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Paul Bonik
aus Bensheim

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.06.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Mark Praetorius

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Dr. Tim Rolvien

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	4
2 Originalpublikation	5
3 Zusammenfassende Darstellung sowie Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext	14
3.1 Einleitung	14
3.2 Methodik	16
3.3 Ergebnisse	18
3.4 Diskussion	20
Literaturverzeichnis	24
4 Kurzfassungen	
Kurzfassung deutsch	27
Kurzfassung englisch	28
5 Erklärung des Eigenanteils	29
6 Danksagung	30
7 Lebenslauf	31
8 Eidesstaatliche Erklärung	32

1 Abkürzungsverzeichnis

PMMA: Polymethylmethacrylat

qBEI: Quantitative Backscattered Electron Imaging (Quantitative Elektronenmikroskopie)

ASBMR: American Society for Bone and Mineral Research

BMDD: Bone Mineral Density Distribution (Verteilung der knöchernen Mineralsalzdichte)

Mean Ca-Wt% / CaMean: Mittlerer Kalziumgehalt

CaWidth: Heterogenität des Mineralisationsmusters

GPa: Gigapascal

OV/BV: Osteoidvolumen pro Knochenvolumen

Ob.S/BS: Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche

Oc.S/BS: Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche

N.Ot.Lc/B.Ar: Anzahl der Osteozytenlakunen pro Knochenfläche

Fr.Emp.Lc: Anteil leerer Lakunen

N.Mn.Lc/B.Ar: Anzahl mineralisierter Lakunen pro Knochenfläche

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

2 Originalpublikation

Calcified Tissue International
https://doi.org/10.1007/s00223-023-01144-6

ORIGINAL RESEARCH



Cholesteatoma Severely Impacts the Integrity and Bone Material Quality of the Incus

Maximilian M. Delsmann^{1,2} · Paul Bonik¹ · Ana Ocokoljic¹ · Sophia M. Häussler³ · Klaus Püschel⁴ · Mark Praetorius³ · Michael Amling² · Jonathan Peichl³ · Tim Rolvien¹

Received: 13 September 2023 / Accepted: 18 September 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Cholesteatoma can lead to progressive destruction of the auditory ossicles along with conductive hearing loss but precise data on the microstructural, cellular, and compositional aspects of affected ossicles are not available. Here, we obtained incus specimens from patients who had cholesteatoma with conductive hearing loss. Incuses were evaluated by micro-computed tomography, histomorphometry on undecalcified sections, quantitative backscattered electron imaging, and nanoindentation. Results were compared with two control groups taken from patients with chronic otitis media as well as from skeletally intact donors at autopsy. The porosity of incus specimens was higher in cholesteatoma than in chronic otitis media, along with a higher osteoclast surface per bone surface. Histomorphometric assessment revealed higher osteoid levels and osteocyte numbers in cholesteatoma incuses. Incuses affected by cholesteatoma also showed lower matrix mineralization compared with specimens from healthy controls and chronic otitis media. Furthermore, the modulus-to-hardness ratio was higher in cholesteatoma specimens compared with controls. Taken together, we demonstrated increased porosity along with increased osteoclast indices, impaired matrix mineralization, and altered biomechanical properties as distinct features of the incus in cholesteatoma. Based on our findings, a possible impact of impaired bone quality on conductive hearing loss should be further explored.

Keywords Bone · Mineralization · Cholesteatoma · Auditory ossicles · Hearing

Introduction

Cholesteatoma is a benign, destructive, squamous keratinizing epithelial lesion in the middle ear [1]. With peaks in prevalence among Caucasian populations, the incidence

has been estimated at 9.2 per 100,000 adults with a slight predominance in males, making it a common encounter in clinical practice [2]. Likely originating from the lateral epithelium of the tympanic membrane, cholesteatoma forms in the pneumatized aspects of the temporal bone, where it tends to grow into expansive and destructive masses leading to erosion of local bone and soft tissue structures [3]. Resulting complications include conductive hearing loss, osseous destruction of the ossicular chain, and perforation of the tympanic membrane. Other complications such as facial nerve palsy, intracranial abscess, cerebral sinus thrombosis, labyrinthitis, and destruction of inner ear structures may also occur [4, 5].

In acquired cholesteatoma, the ossicular chain is usually among the first damaged structures. If damage is found, the incus is involved in nearly all the cases, presumably due to its size and exposed setting inside the tympanic cavity [2]. Previous studies have reported increased osteoclastic resorption of auditory ossicles, which has been associated with low pH, bacterial colonization, and cytokine expression [6]. The

Maximilian M. Delsmann and Paul Bonik contributed equally to this work.

✉ Tim Rolvien
t.rolvien@uke.de

- ¹ Division of Orthopaedics, Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany
- ² Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
- ³ Department of Otorhinolaryngology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
- ⁴ Department of Legal Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

main objective of current research is to identify the factors that drive the rate of cholesteatoma growth and lead to the osseous destruction process. The growth rate displays a high interindividual variance, likely depending on the stage of inflammation, paracrine interaction, and microbial coinfection. Several cytokines have been detected in cholesteatoma tissue and proliferation markers have been linked to progression [7, 8]. Especially increased receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) expression has been linked to increased bone resorption in cholesteatoma [9]. Lipopolysaccharides, as they naturally occur in Gram-negative bacteria, have been proven to accelerate keratinocyte proliferation and inflammation [6, 10, 11]. Recent findings from a single-cell RNA sequencing analysis of human cholesteatoma specimens suggest that unique activin A-producing fibroblasts are responsible for bone destruction by inducing local osteoclast formation [12].

In deciphering the mechanisms that lead to erosion of the ossicles (malleus, incus, and stapes), it is important to recognize that they differ from other bones in several ways. The extracellular matrix is highly mineralized, with ossicles generally displaying low porosity and a low number of osteocyte lacunae with a high proportion of empty and hypermineralized (micropetrotic) lacunae [13, 14]. This is closely related to the near absence of bone resorption by osteoclasts under normal conditions, accompanied by premature osteocyte apoptosis observed shortly after completion of ossicular ossification [13, 14]. This distinctive pattern may be the result of low mechanical stimuli, while a preserved morphology, hardness, density, and physical capacity for vibration seems beneficial for unaltered conduction of sound throughout life [13, 15–18].

Detailed histopathologic analyses can provide important insights into both pathophysiology and surgical management of cholesteatoma [19]. However, detailed studies on the skeletal integrity of affected ossicles are scarce. In addition to the microstructure and cellular resorption processes, the bone quality of affected ossicles seems to be of particular interest due to their unique function in sound conduction. Therefore, the aim of this study was to perform a high-resolution multiscale characterization of the microstructure and material quality of incus specimens affected by cholesteatoma.

Methods

Study Cohort and Specimens

Consecutive incus specimens were obtained during middle ear surgery (tympanoplasty) in patients with chronic otitis media with or without the presence of a cholesteatoma. If

cholesteatoma was detected intraoperatively and the incus was found to be eroded, it was removed and subsequently replaced by a prosthesis (primarily or in a second-look operation). In all patients, clinical characteristics were obtained by retrospective chart review. The indication for surgery was made by a senior otolaryngologist. Next to the clinical specimens, a group of $n=8$ incus specimens from skeletally healthy individuals collected in the context of a previous postmortem study were reanalyzed [13, 20]. This way, a total of 31 individuals were included (control $n=8$; chronic otitis media $n=9$, cholesteatoma $n=14$). The mean age of the cholesteatoma cohort was 33.7 years (ranging from 7.1 years to 64.6 years), and the sex distribution was approximately even, with 8 men (57.1%) and 6 (42.9%) women. The mean age ($p=0.65$) and sex distribution ($p=0.076$) did not differ between the three cohorts. Apart from two patients without detectable hearing loss, all cholesteatoma patients presented with hearing loss in the preoperative examination. Namely, pure-tone audiometry revealed the presence of conductive hearing loss in nine (64.3%) and mixed hearing loss in three patients (21.4%).

Micro-Computed Tomography (μ -CT)

To visualize the incus three-dimensionally and to quantify the porosity, specimens were imaged using a Scanco μ CT 42 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). The scans were performed at a resolution of 15 μ m at 55 kV and 145 μ A. The porosity (%) was defined as the fraction of non-osseous volume within the total bone volume as described previously [21].

Sample Preparation, Histology and Histomorphometry

Specimens were fixed in 3.7% formaldehyde, dehydrated in an ascending ethanol series, and embedded undecalcified in polymethyl methacrylate (PMMA). The embedded samples were cut into 4 μ m sections using a rotary microtome (CVT 4060E, microTec, Walldorf, Germany). Staining was performed with von Kossa-van Gieson, trichrome Goldner, and toluidine blue according to previously described protocols [22]. In accordance with ASBMR guidelines [23], histomorphometric analysis was performed using a light microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss Vision GmbH, Germany) equipped with Osteomeasure Software (OsteoMetrics Inc., Atlanta, USA).

Quantitative Backscattered Electron Imaging (qBEI)

The embedded incus specimens were polished to a coplanar surface, carbon-coated, and analyzed using a scanning

electron microscope (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd.; Cambridge, UK) with a backscattered electron detector (Type 202; K.E. Developments Ltd.; Cambridge, UK). Quantitative backscattered electron imaging (qBEI) was performed to determine the bone mineral density distribution (BMDD) and osteocyte lacunar characteristics according to standard procedures at 20 kV and 680 pA at a constant working distance [24, 25]. The generated gray values correlate with the mean calcium content (mean Ca-Wt%) of the cross-sectioned bone [26]. Brightness and contrast of the qBEI images were calibrated with carbon (gray value: 4.8) and aluminum standards (gray value: 222). The qBEI images were acquired at 120× magnification, before being analyzed using ImageJ (ImageJ 1.42, National Institutes of Health, Bethesda, USA) [27] and a custom MATLAB-based script (TheMathWorks, Inc., Natick, USA).

Nanoindentation

Nanoindentation was performed using an iMicro nanoindenter (KLA instruments, CA, USA) equipped with a Berkovich diamond tip. The dehydrated, PMMA-embedded specimens were polished and mounted on a platform. With a Poisson's ratio of 0.3, the surface was approached at a speed of 100 nm/s, while the depth limit was set at 3000 nm and the strain target rate was set at 0.05 1/s. Thirty indents were placed in a peripheral bone region. All valid indents per ossicle were averaged to calculate the mean hardness and the Young's modulus (GPa). Furthermore, the modulus/hardness ratio, a surrogate measure for fracture toughness, was calculated [28].

Statistical Analysis

GraphPad Prism software (version 9.0, GraphPad Software, La Jolla, USA) was used for statistical analysis. Continuous variables are given as absolute values or as mean \pm standard deviation (SD). To evaluate the normal distribution of the data, the Shapiro–Wilk test was used. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test was used to compare normally distributed data between three groups, while the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test was performed for nonparametric data. To compare two groups, the Student's *t* test was used for normally distributed data and the Mann–Whitney *U* test was used for nonparametric data. The level of significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Incus Porosity in Cholesteatoma is Accompanied by Increased Osteoclast Indices

Microstructural analysis of the incus by μ -CT revealed resorption zones (i.e., porosity) in a subset of cholesteatoma specimens (Fig. 1 A, B), which were not detected in any of the specimens from the other two groups. Accordingly, the mean porosity was higher in cholesteatoma ($14.1 \pm 6.9\%$) compared to chronic otitis media ($9.6 \pm 2.5\%$; $p = 0.036$) (Fig. 1 C). A subgroup analysis showed that the incus porosity was higher in patients with intraoperative macroscopic affection of more than one ossicle (Fig. 1 D). Backscattered electron microscopy and undecalcified histologic sections confirmed the porosity and the eroded surfaces with visible osteoclasts, respectively (Fig. 2 A, B). Histomorphometry revealed a higher osteoid volume per bone volume (OV/BV) in the incus of cholesteatoma patients ($1.6 \pm 2.2\%$) compared to controls ($0.2 \pm 0.1\%$; $p = 0.037$; Fig. 2 C). However, there was no difference in OV/BV between cholesteatoma and chronic otitis media. While the osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS) was similar in all groups (Fig. 2 D), the osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS) was higher in cholesteatoma ($1.56 \pm 1.61\%$) compared to chronic otitis media ($0.15 \pm 0.49\%$, $p = 0.012$) and control ($0.0 \pm 0.0\%$, $p = 0.019$) incudes (Fig. 2 E).

Analysis of osteocyte properties (Fig. 3 A) revealed a higher number of total osteocyte lacunae (N.Ot.Lc/B.Ar) in cholesteatoma (329.7 ± 78.8 1/mm²) compared to chronic otitis media (203.4 ± 118.4 1/mm²; $p = 0.018$) (Fig. 3 B) as well as a lower fraction of empty lacunae (Fr. Emp.Lc, $43.6 \pm 21.1\%$ vs. $67.1 \pm 16.3\%$; $p = 0.016$) (Fig. 3 C). However, no differences between the groups could be detected in the number of mineralized lacunae per bone area (N.Mn.Lc/B.Ar) or the osteocyte lacunar area (Ot.Lc.Ar) (Fig. 3 D, E).

Matrix Hypomineralization as a Distinct Phenomenon in Cholesteatoma

High-resolution imaging of the incus by qBEI indicated an impaired bone mineralization of cholesteatoma incudes (Fig. 4 A). BMDD histograms indicated a leftward shift with a wider calcium distribution curve in cholesteatoma compared to both chronic otitis media and controls (Fig. 4 B). The mean calcium content (CaMean) was lower in cholesteatoma ($26.3 \pm 1.6\text{Wt}\%$) compared to chronic otitis media ($27.9 \pm 1.1\text{Wt}\%$; $p = 0.0376$) and control incudes ($29.1 \pm 1.3\text{Wt}\%$; $p = 0.0007$) (Fig. 4 C). However,

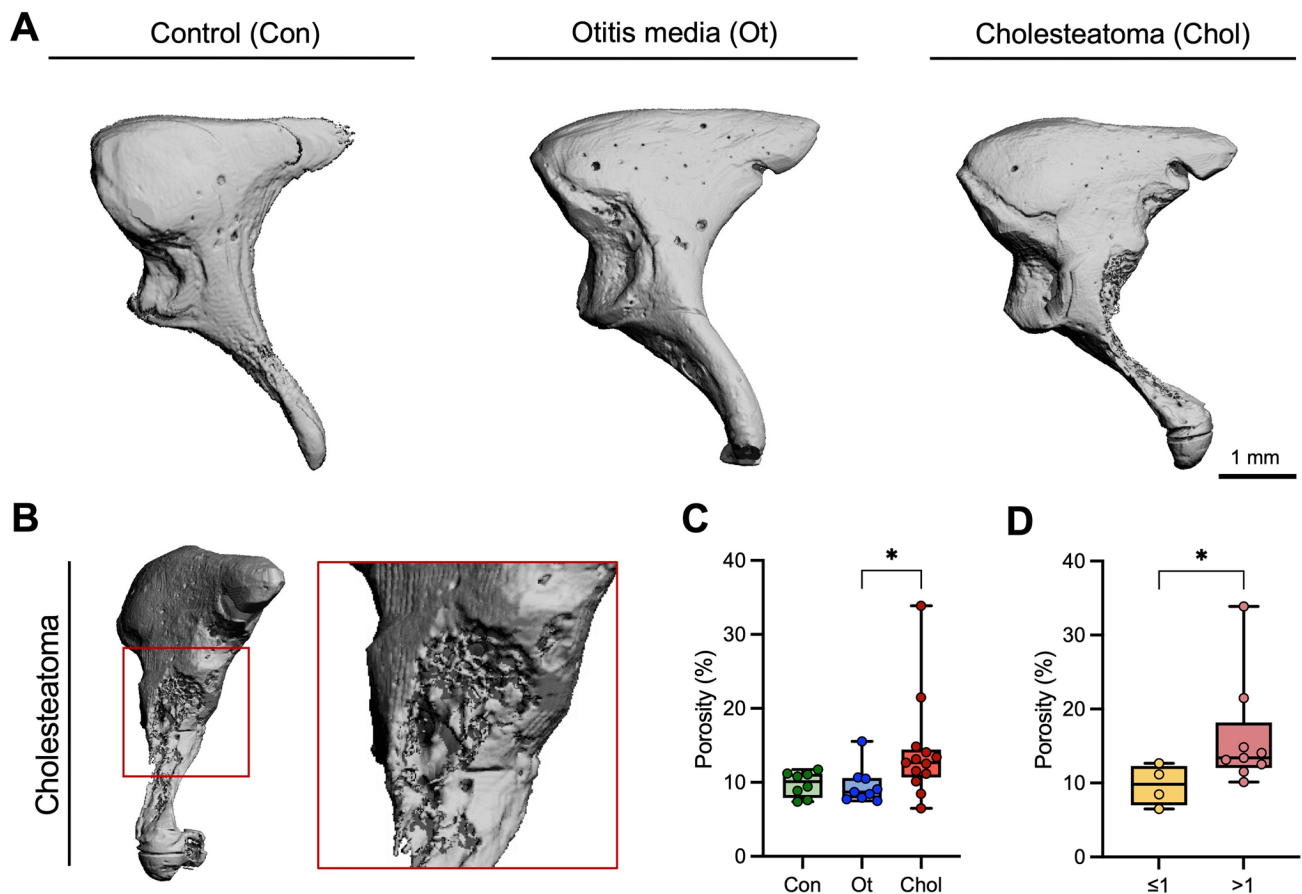


Fig. 1 Eroded surfaces and increased porosity characterize the incus of cholesteatoma patients. **A** Representative three-dimensional μ CT reconstructions of the incus in control (left panel), chronic otitis media (middle panel) and cholesteatoma patients (right panel). **B** Higher magnification of the resorption zone (eroded surface) of a

cholesteatoma incus, lateral view with corresponding magnification (red box). **C** Evaluation and comparison of the porosity between the groups. Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test. **D** Comparison of the porosity according to the number of macroscopically affected ossicles. Mann–Whitney U test. $*p < 0.05$

no differences in the heterogeneity of the mineralization (CaWidth) could be detected between the groups (Fig. 4 D).

Differences in Mineralization are Paralleled by Increased Modulus/Hardness Ratio

Nanoindentation was used to study the biomechanical properties of the ossicles. Although tissue hardness showed a similar trend to the CaMean values from the qBEI analysis, both hardness (Fig. 5 A) and Young's modulus (Fig. 5 B) showed no significant differences between the study groups. However, the modulus/hardness ratio was higher both in cholesteatoma (22.68 ± 0.64 ; $p = 0.0048$) and chronic otitis media (22.08 ± 1.48 ; $p = 0.0252$) incudes compared to controls (19.53 ± 3.41) (Fig. 5 C). No differences could be detected regarding the comparison of the modulus/hardness ratio between the cholesteatoma and chronic otitis media specimens.

Discussion

In this study, we performed a comprehensive investigation of incus specimens obtained from cholesteatoma patients, focusing on microstructural, cellular, and compositional alterations. To gain insights into the osseous destruction processes, we took advantage of an ex situ, multiscale imaging approach, comparing the findings with incus specimens from a clinical cohort of patients with otitis media without cholesteatoma and a postmortem cohort of skeletally intact controls. Resorption zones and porosity were found in a subset of cholesteatoma incudes, along with increased osteoclast indices compared to controls and chronic otitis media. In addition, the incus of cholesteatoma patients showed a lower degree of matrix mineralization, higher osteoid volume, and higher osteocyte numbers. Notably, the number of ossicles macroscopically affected by bone destruction, based on intraoperative assessments, appeared to be associated with the porosity

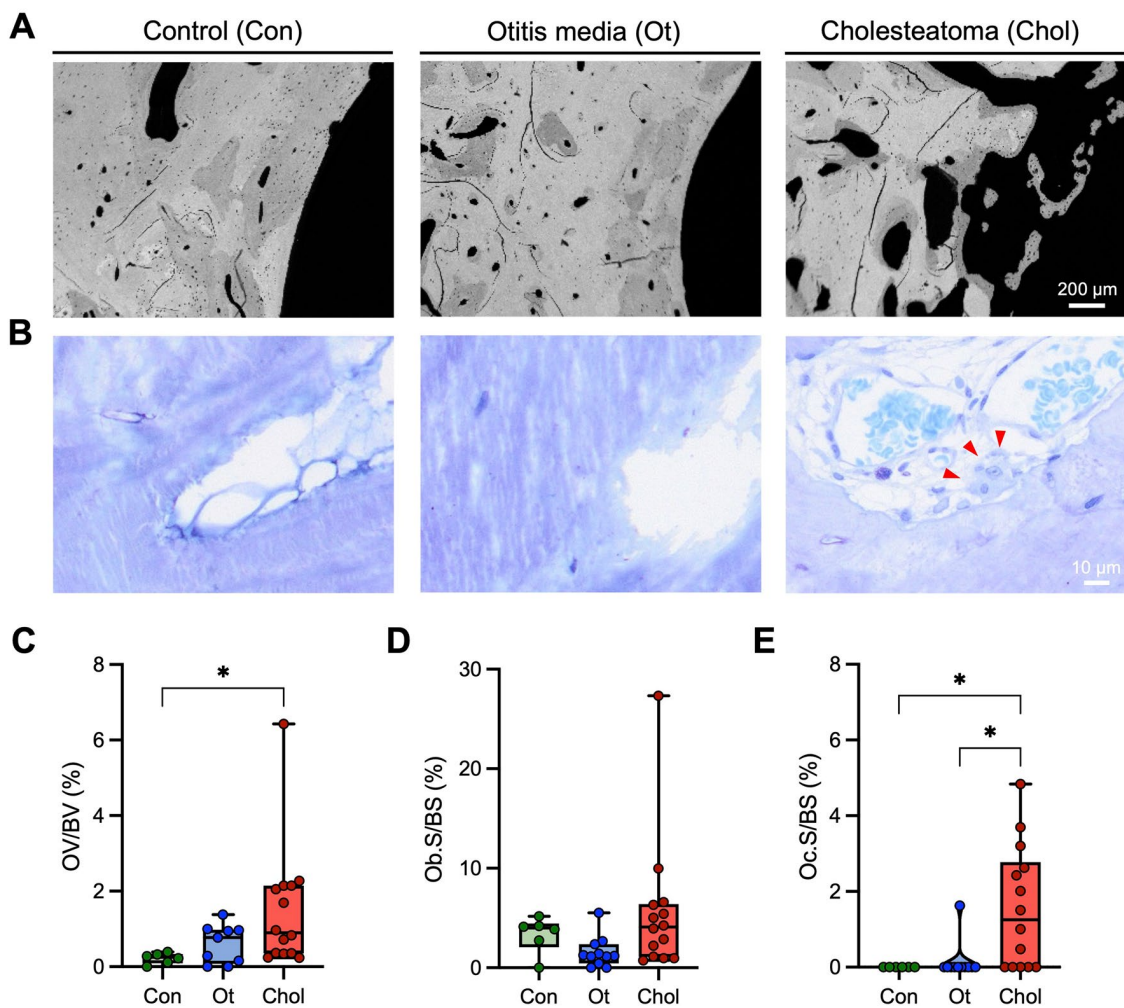


Fig. 2 Increased osteoid indices and abundance of osteoclasts in cholesteatoma. **A** Overview images of the incus obtained by back-scattered electron microscopy. **B** Representative histological images of toluidine blue stained sections. Red arrowheads indicate a multinucleated osteoclast. **C** Quantification of the osteoid volume per

bone volume (OV/BV), **D** osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS), and **E** osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS). Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test was performed in panels C–E. * $p < 0.05$

of the incus, presumably reflecting the progression of the disease.

Theoretically, the inflammatory environment in cholesteatoma causes porosity by activating bone resorption. Increased porosity and osteoclastic bone resorption were detected to varying degrees in cholesteatoma incudes studied here. Previous studies confirmed that the resorptive process in cholesteatoma is driven by activated osteoclasts. In a scanning electron microscopy study on the morphometry of erosions in auditory ossicles affected by cholesteatoma, osteoclastic resorptive lacunae appeared similar to those in osteoporotic femoral necks [29]. Furthermore, osteoclasts have been shown to be activated by paracrine secretion of RANKL by fibroblasts and lymphocytes located in the peri-matrix and triggered by inflammation [9, 30, 31]. Whereas Imai and colleagues demonstrated a significantly

higher number of osteoclasts in their study [30], Koizumi et al. failed to find osteoclasts on affected bone structures [32]. These divergent results could be due to possible stage-specific effects and the fact that osteoclasts are characterized by a transient presence and short life span (1–25 days) [33]. Overall, our data reveal a heterogeneous pattern of resorption-associated porosity in cholesteatoma.

In addition to the increased porosity, which could be quantitatively measured and compared with adequate control groups for the first time, the detected matrix hypomineralization by qBEI was the second important result of our study. In a previous study, inflammatory incudes also showed lower mineralization, although this quantification was limited to bone mineral density via μ -CT [34]. Since hypomineralization of auditory ossicles has been associated with conductive hearing loss in the context of genetic bone diseases [18], it

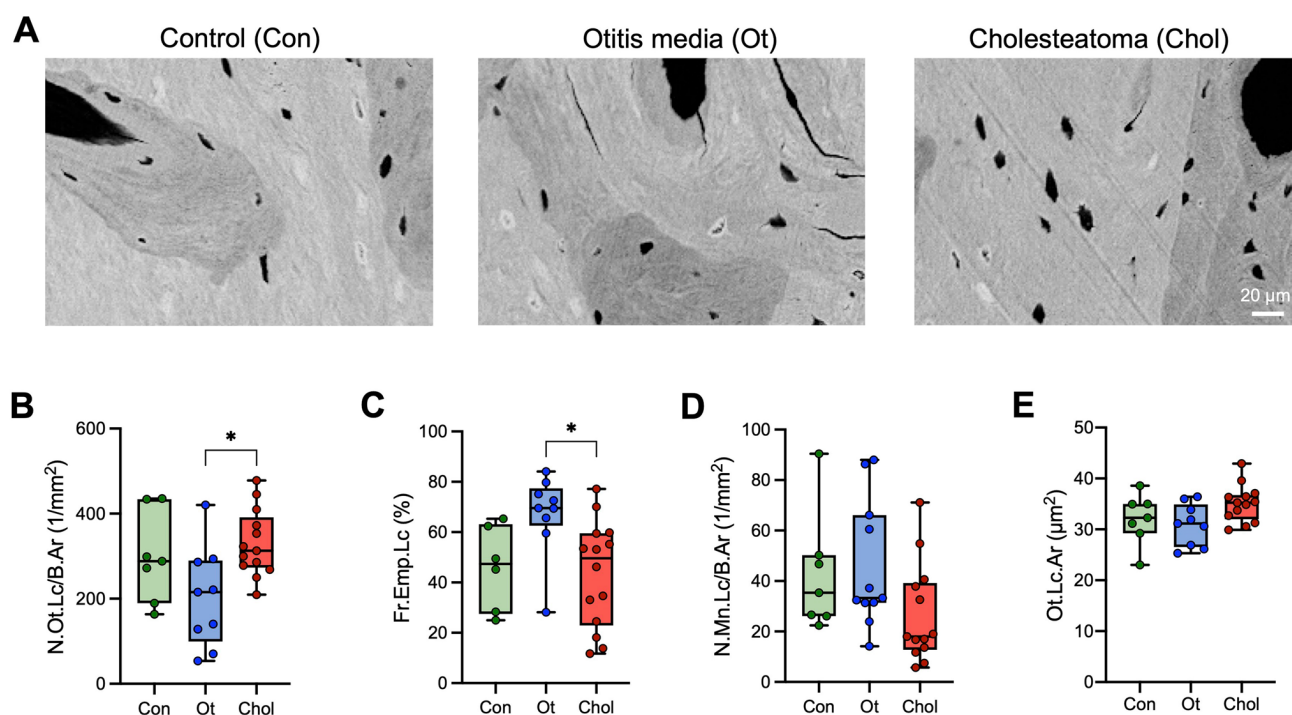


Fig. 3 Increased osteocyte lacunar numbers with signs of higher viability in cholesteatoma. **A** Representative high magnification qBEI images showing an overall high frequency of mineralized lacunae. **B** Quantification of the number of the osteocyte lacunae (N.Ot.Lc/B.Ar), **C** fraction of empty lacunae per total number of lacunae

(Fr.EMP.Lc), **D** number of mineralized lacunae per bone area (N.Mn.Lc/B.Ar), and **E** osteocyte lacunar area (Ot.Lc.Ar). ANOVA with Tukey's multiple comparison tests were performed in panels **B–E**. * $p < 0.05$

may also contribute to conductive hearing loss in cholesteatoma. The mechanisms leading to ossicular hypomineralization in cholesteatoma remain unclear, although our data suggest a possible link to higher bone remodeling, consistent with the higher osteocyte numbers observed. It is interesting to note that the trend of higher numbers of osteocyte lacunae with decreased rates of empty lacunae was not fully recapitulated by decreased numbers of mineralized lacunae. As a high number of mineralized osteocyte lacunae has been previously reported as a sign of overall low bone remodeling and premature aging of the bone matrix in auditory ossicles [13], our results suggest that this condition can be partially reversed in the case of the cholesteatoma.

In almost all affected patients, we detected conductive hearing loss, which is generally caused by ossicular damage, loss of continuity of the ossicular chain, but also due to the mere presence of cholesteatoma matrix in the middle ear [35]. In this context, an association between cholesteatoma-related ossicular erosions and conductive hearing loss has been demonstrated in 158 patients with chronic otitis media [35]. While we were not able to investigate such associations in detail in our study due to the high frequency of affected patients with conductive hearing loss, we found an association between the number of affected ossicles according to intraoperative findings and incus porosity. This suggests that

the spread of the chronic inflammatory process may influence the extent of resorption. Interestingly, we also found an increased modulus-to-hardness ratio in cholesteatoma includes using nanoindentation. This ratio was reported as a surrogate marker for fracture toughness, suggesting improved mechanical competence. However, as the function of ossicles in the context of sound conduction in the middle ear is fundamentally different from other bones, an increased modulus-to-hardness ratio, indicating higher elasticity, could also portend impaired sound conduction due to altered ossicular vibrational capacity.

As there is no pharmacological treatment for cholesteatoma available today, the standard procedure mainly relies on the surgical removal of the affected tissue with subsequent reconstruction of potentially damaged structures such as the tympanic membrane and ossicular chain (tympanoplasty). With a more profound understanding of the molecular patterns and overall mechanisms that drive the pathogenesis and progression of cholesteatoma, pharmaceutical intervention may become a valid alternative to surgery in the early stages and prophylaxis for the high rate of recurrence after surgery. In preventing bone destruction, medications commonly used in the treatment of osteoporosis may be a possible treatment option, possibly through topical application. Evidence from an in vitro study with

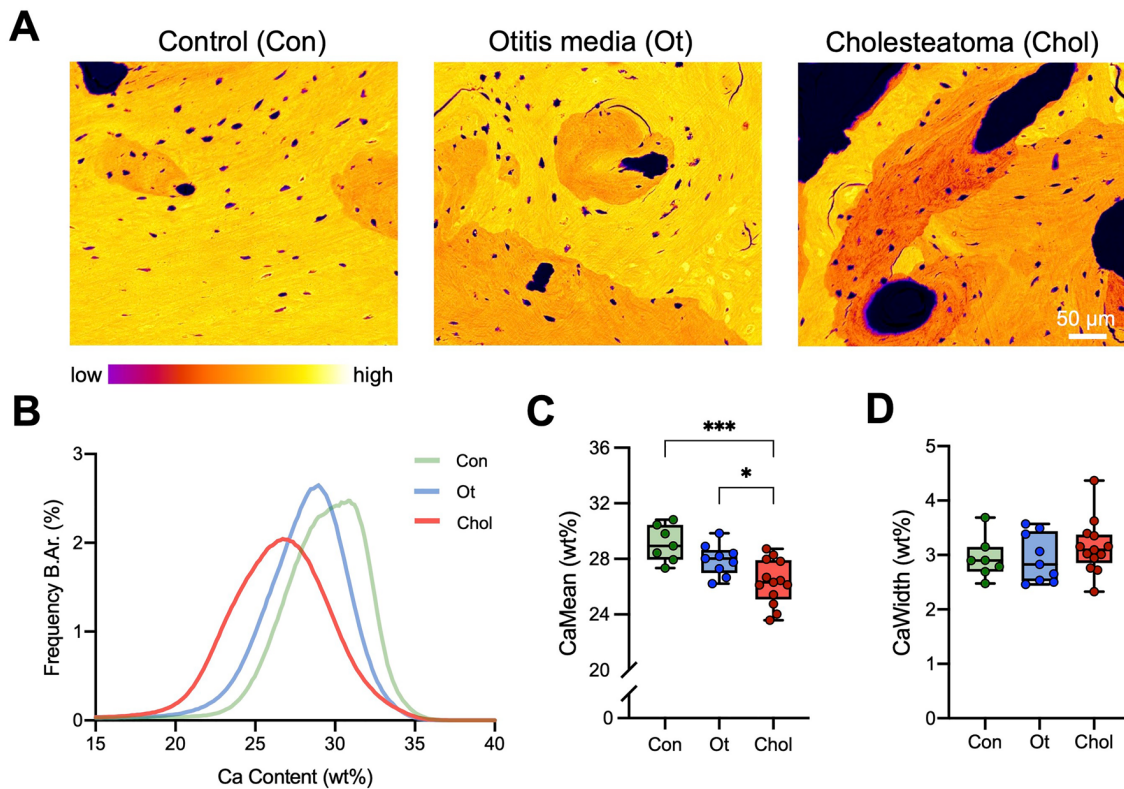
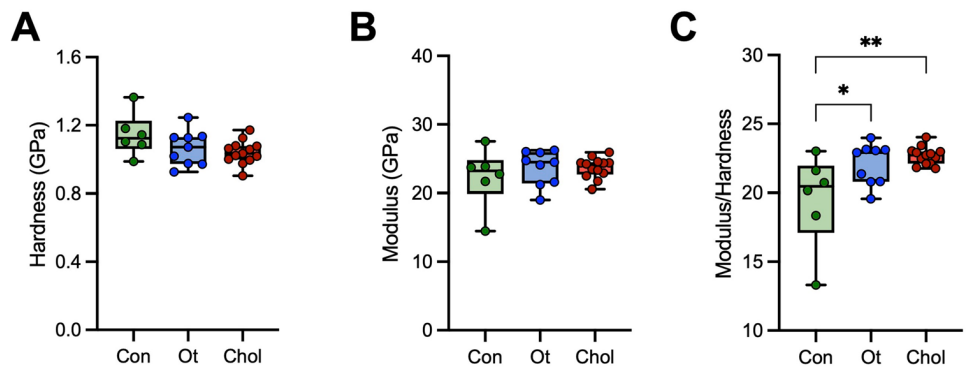


Fig. 4 Lower matrix mineralization in incuses obtained from cholesteatoma compared to control and otitis media patients. **A** Representative, pseudocolored qBEI images of the incus in controls, chronic otitis media and cholesteatoma. **B** BMDD histograms of the incus of control (green curve), chronic otitis media (blue curve), and chole-

steatoma patients (red curve). **C** Quantification of the mean calcium content (CaMean). **D** Quantification of the mineralization heterogeneity (CaWidth). ANOVA with Tukey's multiple comparison tests were performed in panels **C** and **D**. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Fig. 5 Increased modulus/hardness ratio as a biomechanical feature of incuses affected by cholesteatoma. **A** Quantification of hardness, **B** modulus, and **C** modulus/hardness ratio. ANOVA with Tukey's multiple comparison tests were performed in all panels. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$



cultured keratinocytes from cholesteatoma showed that the bisphosphate pamidronate inhibited bone resorption [36]. As the resorptive process appears to be driven by osteoclasts activated by RANKL, bisphosphonates or recombinant monoclonal RANKL antibodies might prevent complications and serve as a bridge to surgery. Moreover, since a high dose calcium diet prevented hypomineralization of auditory ossicles in vitamin D receptor deficient mice [37], modulation of calcium homeostasis might also be effective

as an additive measure to improve bone mineralization of ossicles in cholesteatoma.

In conclusion, we demonstrated resorption-related porosity, matrix hypomineralization and altered biomechanical properties as distinct phenomena of the incus in cholesteatoma patients. These results indicate that the low bone turnover state normally present in auditory ossicles can be activated under certain conditions, which calls for further mechanistic investigation. The possible dependence of

conductive hearing loss on ossicular quality in cholesteatoma as well as other ear and bone diseases should be further investigated.

Acknowledgements We thank Dr. Johannes Bier for his help in obtaining parts of the incus specimens. We further thank Andrea Thieke, Olga Winter, and Annette Jung for their excellent technical assistance.

Authors' Contributions Conceptualization: MMD, JP and TR; methodology: MMD, PB, SMH and TR; validation: MMD, MP, MA and TR; formal analysis: MMD, PB, AO, SMH, KP and TR; investigation: all authors; resources: KP, MP, MA and TR; data curation: MMD and TR; writing—original draft preparation: MMD, PB, JP and TR; writing—review and editing: all authors; visualization: MMD and TR; supervision: TR; project administration: MP, MA and TR.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was supported by the UKE-Stiftung (to TR).

Data Availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of Interest Maximilian M. Delsmann, Paul Bonik, Ana Ocokoljic, Sophia M. Häußler, Klaus Püschel, Mark Praetorius, Michael Amling, Jonathan Peichl and Tim Rolvien state that they have no conflict of interest.

Informed Consent Informed consent was obtained from the patients.

Human and Animal Rights The study followed the rules of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (Hamburg Chamber of Physicians) under WF-065/20.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Semaan MT, Megerian CA (2006) The pathophysiology of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am* 39:1143–1159
- Aquino JE, Cruz Filho NA, de Aquino JN (2011) Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. *Braz J Otorhinolaryngol* 77:341–347
- Yung M, Tono T, Olszewska E, Yamamoto Y, Sudhoff H, Sakagami M, Mulder J, Kojima H, İncesulu A, Tralbalzini F, Özgirgin N (2017) EAONO/JOS Joint Consensus Statements on the Definitions, Classification and Staging of Middle Ear Cholesteatoma. *J Int Adv Otol* 13:1–8
- Rosito LS, Netto LS, Teixeira AR, da Costa SS (2016) Sensorineural Hearing Loss in Cholesteatoma. *Otol Neurotol* 37:214–217
- Falcioni M, Taibah A, Rohit, (2004) Pulsatile tinnitus as a rare presenting symptom of residual cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 118:165–166
- Hamed MA, Nakata S, Sayed RH, Ueda H, Badawy BS, Nishimura Y, Kojima T, Iwata N, Ahmed AR, Dahy K, Kondo N, Suzuki K (2016) Pathogenesis and Bone Resorption in Acquired Cholesteatoma: Current Knowledge and Future Perspectives. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 9:298–308
- Marenda SA, Aufdemorte TB (1995) Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 112:359–368
- Hamed MA, Nakata S, Shiogama K, Suzuki K, Sayed RH, Nishimura Y, Iwata N, Sakurai K, Badawy BS, Inada KI, Tsuge H, Tsutsumi Y (2017) Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, and Ki-67 Expression in Human Acquired Cholesteatoma and Their Correlation With Its Destructive Capacity. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 10:213–220
- Jeong JH, Park CW, Tae K, Lee SH, Shin DH, Kim KR, Park YW (2006) Expression of RANKL and OPG in middle ear cholesteatoma tissue. *Laryngoscope* 116:1180–1184
- Peek FAW, Huisman MA, Berckmans RJ, Sturk A, Van Loon J, Grote JJ (2003) Lipopolysaccharide concentration and bone resorption in cholesteatoma. *Otol Neurotol* 24:709–713
- Schurmann M, Oppel F, Shao S, Volland-Thurn V, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Scholtz LU, Sudhoff H (2021) Chronic inflammation of middle ear cholesteatoma promotes its recurrence via a paracrine mechanism. *Cell Commun Signal* 19:25
- Shimizu K, Kikuta J, Ohta Y, Uchida Y, Miyamoto Y, Morimoto A, Yari S, Sato T, Kamakura T, Oshima K, Imai R, Liu YC, Okuzaki D, Hara T, Motooka D, Emoto N, Inohara H, Ishii M (2023) Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction. *Nat Commun* 14:4417
- Rolvien T, Schmidt FN, Milovanovic P, Jahn K, Riedel C, Butscheidt S, Puschel K, Jeschke A, Amling M, Busse B (2018) Early bone tissue aging in human auditory ossicles is accompanied by excessive hypermineralization, osteocyte death and micropetrosis. *Sci Rep* 8:1920
- Palumbo C, Cavani F, Sena P, Benincasa M, Ferretti M (2012) Osteocyte apoptosis and absence of bone remodeling in human auditory ossicles and scleral ossicles of lower vertebrates: a mere coincidence or linked processes? *Calcif Tissue Int* 90:211–218
- Kanzaki S, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K (2009) Bisphosphonate therapy ameliorates hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *J Bone Miner Res* 24:43–49
- Lysaght AC, Yuan Q, Fan Y, Kalwani N, Caruso P, Cunnane M, Lanske B, Stankovic KM (2014) FGF23 deficiency leads to mixed hearing loss and middle ear malformation in mice. *PLoS ONE* 9:e107681
- Kanzaki S, Ito M, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K (2006) Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone* 39:414–419
- Delsmann MM, Seist R, Stürznickel J, Schmidt FN, Mansour A, Kobelski MM, Broocks G, Peichl J, Oheim R, Praetorius M, Schinke T, Amling M, Demay MB, Stankovic KM, Rolvien T (2021) Conductive Hearing Loss in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia Is Accompanied by Hypomineralization of the Auditory Ossicles. *J Bone Miner Res* 36:2317–2328
- Tucci DL, Doherty JK (2019) Contributions of Contemporary Human Temporal Bone Histopathology to Clinical Otology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 161:725–733
- Pueschel K, Heinemann A, Dietz E, Hellwinkel O, Henners D, Fitzek A (2020) New developments and possibilities in the field

- of post-mortem medicine mortui vivos docent. *Rechtsmedizin* 30:425–429
21. van Lenthe GH, Hagenmuller H, Bohner M, Hollister SJ, Meinel L, Muller R (2007) Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo. *Biomaterials* 28:2479–2490
 22. Albers J, Schulze J, Beil FT, Gebauer M, Baranowsky A, Keller J, Marshall RP, Wintges K, Friedrich FW, Priemel M, Schilling AF, Rueger JM, Cornils K, Fehse B, Streichert T, Sauter G, Jakob F, Insogna KL, Pober B, Knobloch KP, Francke U, Amling M, Schinke T (2011) Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol* 192:1057–1072
 23. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28:2–17
 24. Busse B, Djonic D, Milovanovic P, Hahn M, Puschel K, Ritchie RO, Djuric M, Amling M (2010) Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell* 9:1065–1075
 25. Koehne T, Vettorazzi E, Kusters N, Luneburg R, Kahl-Nieke B, Puschel K, Amling M, Busse B (2014) Trends in trabecular architecture and bone mineral density distribution in 152 individuals aged 30–90 years. *Bone* 66:31–38
 26. Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K (1998) Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* 23:319–326
 27. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
 28. Fan ZF, Smith P, Rauch F, Harris GF (2007) Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. *Compos B* 38:411–415
 29. Relucenti M, Miglietta S, Bove G, Donfrancesco O, Battaglione E, Familiari P, Barbaranelli C, Covelli E, Barbara M, Familiari G (2020) SEM BSE 3D image analysis of human incus bone affected by cholesteatoma ascribes to osteoclasts the bone erosion and VpSEM dEDX analysis reveals new bone formation. *Scanning* 2020:9371516
 30. Imai R, Sato T, Iwamoto Y, Hanada Y, Terao M, Ohta Y, Osaki Y, Imai T, Morihana T, Okazaki S, Oshima K, Okuzaki D, Katayama I, Inohara H (2019) Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling. *J Assoc Res Otolaryngol* 20:449–459
 31. Wiatr A, Streck P, Wiatr M (2021) Patterns of bone damage in patients with chronic middle ear inflammation. *Ear Nose Throat J* 100:NP438–NP443
 32. Koizumi H, Suzuki H, Kawaguchi R, Hashida K, Hohchi N, Ohkubo JI, Tabata T, Kitamura T (2017) Presence of osteoclasts in middle ear cholesteatoma: a study of undecalcified bone sections. *Acta Otolaryngol* 137:127–130
 33. Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115–137
 34. Duboeuf F, Burt-Pichat B, Farlay D, Suy P, Truy E, Boivin G (2015) Bone quality and biomechanical function: a lesson from human ossicles. *Bone* 73:105–110
 35. Martins O, Victor J, Selesnick S (2012) The relationship between individual ossicular status and conductive hearing loss in cholesteatoma. *Otol Neurotol* 33:387–392
 36. Yoon TH, Lee SH, Park MH, Chung JW, Kim HJ (2001) Inhibition of cholesteatomatous bone resorption with pamidronate disodium. *Acta Otolaryngol* 121:178–181
 37. Delsmann MM, Peichl J, Yorgan TA, Beil FT, Amling M, Demay MB, Rolvien T (2022) Prevention of Hypomineralization In Auditory Ossicles of Vitamin D Receptor (Vdr) Deficient Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:901265

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3 Zusammenfassende Darstellung sowie Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

3.1 Einleitung

Epidemiologie, Ätiologie und klinisches Bild des Cholesteatoms

Das Krankheitsbild des Cholesteatoms (synonym Otitis media epitympanalis) beschreibt eine chronische Form der Mittelohrentzündung. Hierbei kommt es zu transtympanalem Wachstum verhornenden Plattenepithels in die pneumatisierten Anteile des Schläfenbeins, primär dem Mittelohr (Semaan and Megerian, 2006). Mit einem Maximum in der Prävalenz unter der weißen Bevölkerung wird die Inzidenz bei Erwachsenen auf 9.2 pro 100.000 geschätzt (Aquino et al., 2011). Durch Zellabschilferungen und mikrobielle Überwucherung der expansiv wachsenden Masse entsteht perifokal eine chronisch entzündliche Läsion mit inflammatorisch aktiviertem Bindegewebe der Perimatrix. In Folge kommt es neben der Verdrängung der im Mittelohr liegenden Strukturen mit der Zeit zu arrosiv-destruktiven Prozessen, die sowohl die Gehörknöchelchen (Ossikel) als auch die Schädelbasis und den Gesichtsnerv arrodieren können (Yung et al., 2017). Typische Komplikationen sind konsekutiv eine Schalleitungsschwerhörigkeit, Perforationen des Trommelfells, Fazialispareesen mit ipsilateralem Geschmacksverlust, aber auch ascendierende Infektionen der Meningen und des Gehirns sowie Sinusvenenthrombosen, Hirnherniationen in das Mastoid und Schallempfindungsschwerhörigkeit, Schwindel sowie Tinnitus bei Affektion des Innenohrs (Rosito et al., 2016, Falcioni et al., 2004, Yung et al., 2017). Unbehandelt führt das Cholesteatom also zu teils schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten.

Pathogenese der knöchernen Arrosionen

Ziel gegenwärtiger Forschung ist es, die Determinanten des expansiven und destruktiven Wachstums zu entschlüsseln und die genauen Faktoren zu identifizieren, die zur knöchernen Arrosion der Gehörknöchelchen führen und die interindividuelle Varianz der cholesteatotischen Wachstumsrate begründen. Bei der knöchernen Arrosion handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess, welcher der Regulation der zugrunde liegenden entzündlichen Reaktion der Perimatrix und somit der mikrobiellen Koinfektion, dem entzündlichen Stadium, dem Mikromilieu mit niedrigem pH und Zytokinen sowie Entzündungsmediatoren unterliegt (Hamed et al., 2016, Hamed et al., 2017, Marenda and Aufdemorte, 1995). Auch das Vorhandensein von Lipopolysacchariden, explizit durch Besiedlung gramnegativer Pathogene, potenziert diesen chronisch entzündlichen Prozess (Hamed et al., 2016, Peek et al., 2003, Schürmann et al., 2021). So konnte aufgezeigt werden, dass insbesondere eine lokale entzündlich gesteigerte RANKL-Expression als Treiber der

osteoklastären Knochenresorption verantwortlich ist (Jeong et al., 2006). Neueste Daten weisen zudem darauf hin, dass in der Perimatrix ebenfalls Activin A-produzierende Fibroblasten, welche ebenfalls einer lokal entzündlichen Aktivierung unterliegen, induktiv auf die knöchernen Resorption wirken (Shimizu et al., 2023).

Mikroskopische Anatomie humaner Gehörknöchelchen

Mikroskopisch zellulär unterscheiden sich Gehörknöchelchen deutlich von den übrigen knöchernen Strukturen des menschlichen Körpers. Die knöchernen Substanz imponiert hoch mineralisiert bei gleichzeitig geringer Porosität. Es finden sich vergleichsweise wenige Osteozytenlakunen bei einem hohen Anteil leerer oder hypermineralisierter (sogenannter mikropetrotyischer) Lakunen (Rolvien et al., 2018, Palumbo et al., 2012). Zurückzuführen ist dies im Wesentlichen auf das geringe Maß an Knochenremodeling und osteoklastärer Resorption, bei rapid einsetzender Apoptose der Osteozyten kurz nach Vollendung der Ossikulogenese und Ossifikation um das erste Lebensjahr (Rolvien et al., 2018, Palumbo et al., 2012). Die Vermutung liegt nahe, dass diese Phänomene Resultat geringer Remodelingstimuli bei weitgehender mechanischer Isolation der Gehörknöchelchenkette, abseits der Konduktion von auditiven Signalen mittels Schwingungsenergie, sind. Zur Gewährleistung einer lebenslangen Konstante dieser auditiven Transmission erscheint ein unverändertes Vibrationsvermögen durch gleichbleibende Morphologie, Härte und Dichte unabdingbar (Rolvien et al., 2018, Kanzaki et al., 2009, Kanzaki et al., 2006, Lysaght et al., 2014, Delsmann et al., 2021).

Detaillierte histopathologische Analysen erlauben wichtige Einblicke in Fragen der Pathophysiologie und dem chirurgischen Management des Cholesteatoms (Tucci and Doherty, 2019). Neben der grundlagenwissenschaftlichen Entschlüsselung der mikrostrukturellen und zellulär-resorptiven Prozesse, ist die ossikuläre Knochenqualität darüber hinaus auch aufgrund ihrer schallleitenden Funktion von speziellem klinischem Interesse. Genaue Daten über die Integrität und Zusammensetzung der betroffenen Gehörknöchelchen Malleus, Incus und Stapes (dt. Hammer, Amboss und Steigbügel) auf mikroskaliger Ebene sind jedoch kaum verfügbar und so war es die Zielsetzung der vorliegenden Studie, die knochenqualitativen Merkmale von Amboss-Präparaten, welche von Cholesteatompatienten entnommen wurden, eingehend auf mikrostruktureller Ebene und nach Kriterien der Materialqualität zu charakterisieren. Als Referenzossikel wählten wir hierfür Incudes, da diese bei vorliegendem chronisch entzündlichem Schaden im Falle eines Cholesteatoms regelhaft involviert sind. Die Gründe hierfür liegen mutmaßlich in der Größe des Ossikels und seiner exponierten Lage innerhalb des Tympanons (Aquino et al., 2011).

3.2 Methodik

Studienkohorte und Probengewinnung

Die Studienkohorte umfasste 14 Patienten mit Cholesteatom, 9 mit chronischer Otitis media ohne Cholesteatom und 8 Kontrollen (insgesamt n=31 Proben). Während die Ossikel der ersten beiden Gruppen intraoperativ Hals-Nasen-Ohren-ärztlich im Rahmen einer Tympanoplastik entnommen wurden, handelte es sich bei der Kontrollgruppe um Ossikel von skelettal intakten Spendern, welche im Kontext vorheriger Studien während rechtsmedizinischer Autopsien entnommen worden sind (Rolvien et al., 2018, Püschel et al., 2020). Diese Kontrollen waren hierbei geschlechts- und altersspezifisch zu denen durch Otitis media (epitympanalis) affizierten Ossikeln abgestimmt. Demografische, klinische und krankheitsspezifische Daten wurden aus den Krankenakten entnommen. So lag das mittlere Alter der Cholesteatom-Patientenkohorte bei 33.7 Jahren (zwischen 7.1 – 64.6 Jahren), die Geschlechterverteilung war nahezu gleich mit 8 männlichen (57.1%) und 6 weiblichen (42.9%) Individuen. Das mittlere Alter ($p=0.65$) und die Geschlechterverteilung ($p=0.076$) unterschied sich zwischen den drei Kohorten nicht. Weiter konnte bei allen Cholesteatompatienten bis auf zwei ein Hörverlust in der präoperativen Untersuchung festgestellt werden. So zeigte sich in der Reintonaudiometrie in neun Patienten (64.3%) eine Schalleitungsschwerhörigkeit und in drei Patienten (21.4%) eine gemischte Schwerhörigkeit mit zusätzlich sensorineuralem Hörverlust im Sinne einer Beteiligung des Innenohres.

Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die Mikro-Computertomografie erlaubte uns die dreidimensionale Darstellung der Ossikel und Quantifizierung ihrer Porosität. Verwendet wurde hierfür ein Scanco μ CT 42 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz). Die Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von $15\mu\text{m}$ bei 55 kV und $145\mu\text{A}$ durchgeführt. Die angegebene Porosität in Prozent ist definiert als Anteil des nicht knöchernen Volumens am Gesamtvolumen des Ossikel (van Lenthe et al., 2007).

Aufbereitung der Proben, Histologie und Histomorphometrie

Die Proben wurden in 3.7% Formaldehydlösung fixiert, in Sequenz einer aufsteigenden Ethanollösung dehydriert und in nicht entkalkter Form in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet. Für die Histologie wurden daraufhin Schnitte ($4\mu\text{m}$) mittels eines Mikrotoms (CVT 4060E, microTec, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Gefärbt wurden diese mit von Kossavan Gieson, Trichrom-Goldner und Toluidinblau anhand vorbeschriebener Protokolle (Albers et al., 2011). Im Einklang mit den ASBMR Richtlinien (Dempster et al., 2013) wurde die

histomorphometrische Analyse durch das Lichtmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland), ausgestattet mit der Software Osteomeasure (OsteoMetrics Inc., Atlanta USA), vorgenommen.

Rasterelektronenmikroskopie

Die eingebetteten Amboss-Präparate wurden zu einer planparallelen Oberfläche poliert, mit Kohlenstoff besputtert und mittels Rasterelektronenmikroskop (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd.; Cambridge, UK) mit einem Detektor für zurückstreuende Elektronen (Typ 202; K.E. Developments Ltd.; Cambridge, UK) ausgewertet. Diese quantitative Elektronenmikroskopie (quantitative backscattered electron imaging; qBEI) wurde vorgenommen, um die Verteilung der knöchernen Mineralsalzdichte (bone mineral density distribution; BMDD) und Charakteristika der Osteozytenlakunen zu detektieren. Dies wurde standardisiert bei 20 kV und 680 pA, bei einheitlicher Arbeitsdistanz durchgeführt (Busse et al., 2010, Koehne et al., 2014). Die generierten Graustufen des Bildes korrelieren hierbei mit dem mittleren Kalziumgehalt (mean Ca-Wt%) des Ossikelschnitts (Roschger et al., 1998). Helligkeit und Kontrast der qBEI-Bilder wurden kalibriert durch standardisierte Kohlenstoff- (Graustufe: 4.8) und Aluminiumoberflächen (Graustufe: 222). Die qBEI-Bilder wurden mit einer 120-fachen Vergrößerung aufgenommen, bevor sie mit ImageJ (ImageJ 1.42, National Institutes of Health, Bethesda, USA) (Schneider et al., 2012) und einem individuellem MATLAB-basierten Skript (TheMathWorks, Inc., Natick, USA) ausgewertet wurden.

Nanoindentation

Die Nanoindentation wurde mittels eines iMicro Nanoindenters (KLA instruments, CA, USA), ausgestattet mit einer Berkovich Diamantspitze durchgeführt. Die dehydrierten, in PMMA-eingebetteten Proben wurden hierfür poliert und auf einen Träger montiert. Mit einer Poissonzahl von 0.3 wurde sich der knöchernen Oberfläche mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/s genähert, wobei die Penetrationstiefe auf 3000 nm und die Verformungszielgeschwindigkeit auf 0.05 1/s voreingestellt wurde. 30 Indentationen wurden daraufhin in peripheren Arealen der Ossikel gesetzt. Folgend wurden die Ergebnisse aller adäquat durchgeführten Indentationen je Ossikel gemittelt, um die durchschnittliche Härte und das Elastizitätsmodul (Young's Modulus; GPa) zu bilden. Schließlich wurde auch das Elastizitätsmodul-zu-Härte-Verhältnis (modulus/hardness ratio) bestimmt. Dieses ist ein Surrogatparameter für die Bruchfestigkeit eines Materials (Fan et al., 2007).

Statistik

Für die statistische Auswertung unserer Datensätze nutzten wir die Software GraphPad Prism (Version 9, GraphPad Software, La Jolla, USA). Stetige Variablen wurden als absolute Werte oder als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur Bewertung der Normalverteilung der Daten wurde der Shapiro-Wilk Test angewandt. Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde mit dem Turkey Mehrfachvergleichstest genutzt, um normal verteilte Datensätze zwischen drei Gruppen zu vergleichen, während der Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn Mehrfachvergleichstest für nicht parametrische Daten genutzt wurde. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde für normal verteilte Daten der T-Test und für nicht parametrische Daten der Mann-Whitney U Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0.05$ definiert.

3.3 Ergebnisse

Histomorphometrie sowie multimodale Charakterisierung der Resorptionszonen und Porosität der Amboss-Präparate

Mikro-computertomographisch ließen sich in der Cholesteatomkohorte erwartungsgemäß und im Kontrast zur Otitis media mesotympanalis sowie Kontrollkohorte Resorptionszonen darstellen. Passend hierzu ließ sich ebenfalls eine insgesamt gesteigerte Porosität der Cholesteatomossikel nachweisen. So lag die mittlere Porosität bei der Cholesteatomgruppe ($14.1 \pm 6.9\%$) deutlich über der der chronischen Otitis media mesotympanalis ($9.6 \pm 2.5\%$; $p = 0.036$). In einer Subgruppenanalyse konnte weiter gezeigt werden, dass die Porosität der Incudes in solchen Patienten stärker gesteigert war, bei denen sich intraoperativ eine makroskopische Beteiligung von mehr als einem Ossikel zeigte. Die Ergebnisse konnten gestützt werden durch eine ebenfalls im Rasterelektronenmikroskop und der Histologie detektierten erhöhten Porosität. Zudem konnten in der histologischen Aufarbeitung die Resorptionszonen klar definiert und vermehrt Osteoklasten gefunden werden. Die Histomorphometrie zeigte ein höheres Osteoidvolumen pro Knochenvolumen (OV/BV) in den Incudes von Cholesteatompatienten ($1.6 \pm 2.2\%$) verglichen mit denen der Kontrollgruppe ($0.2 \pm 0.1\%$; $p = 0.037$). Zwischen OV/BV der Cholesteatom- bzw. chronischen Otitis media mesotympanalis Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Während die Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Ob.S/BS) in allen Gruppen ähnlich war, zeigte sich die Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Oc.S/BS) in der Cholesteatomgruppe ($1.56 \pm 1.61\%$) verglichen mit der Gruppe der chronisch-mesotympanalen Mittelohrentzündungen ($0.15 \pm 0.49\%$, $p = 0.012$) und den Kontrollen ($0.0 \pm 0.0\%$, $p = 0.019$) deutlich gesteigert.

In der Analytik der Osteozyteneigenschaften zeigte sich eine höhere Anzahl der gesamten Osteozytenlakunen (N.Ot.Lc/B.Ar) in der Cholesteatomgruppe (329.7 ± 78.8 1/mm²), verglichen mit den Ossikeln der Gruppe mit chronisch-mesotympanaler Otitis media (203.4 ± 118.4 1/mm²; $p=0.018$). Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls ein erniedrigter Anteil leerer Lakunen (Fr.Emp.Lc, $43.6 \pm 21.1\%$ vs. $67.1 \pm 16.3\%$; $p=0.016$). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen in der Anzahl mineralisierter Lakunen pro Knochenfläche (N.Mn.Lc/B.Ar) oder der Osteozytenlakunenfläche festgestellt werden.

Detektierte Mineralisationsmuster in der Rasterelektronenmikroskopie

Die hochauflösende Darstellung der Amboss-Präparate mittels dem Rasterelektronenmikroskop (qBEI) wies auf eine gestörte Knochenmineralisation der Cholesteatomgruppe hin. BMDD-Histogramme zeigten hier eine Linksverschiebung mit weiter Kalziumverteilungskurve im Vergleich zu den Amboss-Präparaten der chronisch-mesotympanalen Otitis media und den Kontrollossikeln. Der mittlere Kalziumgehalt (CaMean) war in der Cholesteatomgruppe ($26.3 \pm 1.6\text{Wt}\%$) niedriger als in der Gruppe der chronisch-mesotympanalen Otitis media ($27.9 \pm 1.1\text{Wt}\%$; $p=0.0376$) und der Gruppe der Kontrollincudes ($29.1 \pm 1.3\text{Wt}\%$; $p=0.0007$). Unterschiede in der Heterogenität der Mineralisationsmuster (CaWidth) zeigten sich unter den Gruppen nicht.

Evaluation der Biomechanik mittels Nanoindentation

Wir nutzen die Nanoindentation zur Bewertung der biomechanischen Eigenschaften der Ossikel. Obwohl die Härte des Gewebes einen ähnlichen Trend wie die Werte für den mittleren Kalziumgehalt (Rasterelektronenmikroskopie) aufwiesen, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in der Härte und dem Elastizitätsmodul detektiert werden. Im Verhältnis des Elastizitätsmoduls zur Härte zeigten sich jedoch höhere Werte sowohl für die Cholesteatomgruppe (22.68 ± 0.64 ; $p=0.0048$) als auch die Gruppe der mesotympanalen chronischen Mittelohrentzündungen (22.08 ± 1.48 ; $p=0.0252$) verglichen zur Kontrollgruppe (19.53 ± 3.41). Im Vergleich der beiden chronisch entzündlichen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Elastizitätsmodul-zu-Härte-Verhältnis.

3.4 Diskussion

In dieser Studie führten wir umfassende Untersuchungen an Amboss-Präparaten von Cholesteatompatienten durch. Dabei fokussierten wir uns auf die Detektion mikrostruktureller und zellulärer Alterationen sowie Veränderung der knöchernen Zusammensetzung. Verglichen wurden diese mit Ossikeln von Patienten mit chronisch-mesotympanaler Otitis media und einer skelettal intakten postmortem Kontrollkohorte, um Einblicke in die destruktive Natur des Cholesteatoms zu erhalten. Alle Proben wurden mittels Mikro-Computertomographie, Histomorphometrie an nicht entkalkten Schnitten, Rasterelektronenmikroskopie (qBEI) und Nanoindentation untersucht. Dieser multimodale Darstellungs- und Untersuchungsprozess erlaubte uns eine möglichst detaillierte Auswertung der Ossikel, ohne auf einen singulären Ansatz vertrauen zu müssen. Zudem konnten wir so ein hohes Maß interner Qualitätssicherung und Validierung unserer Ergebnisse erreichen.

Resorptionszonen und eine gesteigerte Porosität konnten in der Gruppe der Cholesteatomossikel, zusammen mit einem erhöhten Osteoklastenindex im Vergleich zu den beiden übrigen Gruppen, gefunden werden. Darüber hinaus zeigte sich in den Ossikeln der Cholesteatompatienten ein geminderter Grad der Matrixmineralisation bei erhöhtem Osteoidvolumen und einer gesteigerten Anzahl an Osteozyten.

Der Theorie folgend ist es das entzündliche Mikromilieu des Cholesteatoms, welches zur gesteigerten Porosität der Ossikel durch die Aktivierung osteoresorptiver Prozesse führt. So konnte gezeigt werden, dass der knöcherne Substanzverlust nicht wie in der Vergangenheit teils postuliert durch das azide Milieu oder gar Drucknekrosen verursacht wird. Tatsächlich ist es das Granulationsgewebe der Perimatrix, welches den resorptiven Prozess initiiert und dessen Progress sichert. In diesem inflammatorisch aktivierten Gewebe kommt es insbesondere durch T-Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten zur vermehrten Expression von RANKL. RANKL fungiert darauf als Mediator für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Jeong et al., 2006, Imai et al., 2019, Wiatr et al., 2020). Dies deckt sich mit Studienergebnissen, welche rasterelektronenmikroskopisch nachweisen konnten, dass die Morphometrie der Resorptionslakunen cholesteatotisch affektierter Ossikel jenen osteoporotisch veränderter Femurhälsen glich (Relucenti et al., 2020). Diese Erkenntnisse werden auch durch unsere Studie mit dem Befund erhöhter Porosität und osteoklastärer Knochenresorption variablen Grades in Ossikeln von Cholesteatompatienten gestützt. Während Imai et al. in ihrer Studie, wie wir auch, signifikant mehr Osteoklasten finden konnten (Imai et al., 2019), haben Koizumi et al. keine Osteoklasten auf beteiligten knöchernen Strukturen detektieren können (Koizumi et al., 2017). Diese divergenten Ergebnisse könnten sich unter anderem auf einen Resorptionsprozess, der vor der Entnahme auftrat, zurückführen

lassen. So sind Osteoklasten charakterisiert durch ihr transientes Vorkommen im Gewebe und ihrer Kurzlebigkeit (1-25 Tage) (Manolagas, 2000). In Zusammenschau weisen unsere Daten auf ein heterogenes Muster resorptionsassoziierter Porosität durch das Cholesteatom hin.

Neben der gesteigerten Porosität, welche durch uns erstmalig quantitativ gemessen und mit adäquaten Kontrollgruppen verglichen wurde, ist die festgestellte Matrixhypomineralisation durch das qBEI der zweite wichtige Endpunkt unserer Arbeit. In einer vorherigen Studie konnte zwar bereits eine geminderte Mineralisation inflammatorisch veränderter Ossikel dargelegt werden, diese Quantifizierung war jedoch durch die unimodale Auswertung der Mineralsalzgehaltichte mittels μ CT limitiert (Duboeuf et al., 2015). Da die Hypomineralisation von Gehörknöchelchen bereits mit einer Schallleitungsschwerhörigkeit im Kontext genetischer Knochenstoffwechselstörungen assoziiert wurde (Delsmann et al., 2021), könnte sie auch beim Cholesteatom eine Rolle spielen. Der Mechanismus, welcher zur Matrixhypomineralisation führt, bleibt unklar, jedoch legen unsere Daten eine Verbindung zum gesteigerten Knochenremodeling samt detektierter erhöhter Osteozytenanzahl nahe. Interessanterweise war der Trend einer höheren Anzahl an Osteozytenlakunen mit erniedrigter Fraktion an leeren Lakunen nicht vollständig gestützt durch eine verringerte Anzahl an mineralisierten Lakunen. Da eine große Anzahl an mineralisierten Lakunen als Zeichen insgesamt niedrigen Knochenremodelings und vorzeitiger Knochenalterung der Gehörknöchelchen gewertet werden kann (Rolvien et al., 2018), weisen unsere Daten darauf hin, dass dieser Zustand im Cholesteatom zumindest teilreversibel sein kann.

Bei nahezu allen untersuchten Probanden konnte ein konduktiver Hörverlust festgestellt werden. Generell ist der konduktive Hörverlust in der Diskontinuität, Zerstörung, Vernarbung und Verdrängung der schallleitenden Strukturen, insbesondere des Trommelfells und der Gehörknöchelchen und somit multifaktoriell begründet (Martins et al., 2012). So konnte bereits in der Vergangenheit bei 158 Patienten gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen der Schwere der cholesteatotisch ossikulären Arrosionen und dem Grad der Schallleitungsschwerhörigkeit gibt (Martins et al., 2012). Wir konnten einer solchen Ebene in unserem kleineren Patientenkollektiv aufgrund des hohen Anteils an Patienten mit konduktiver Hörminderung nicht nachgehen. Interessanterweise konnten wir jedoch feststellen, dass die Porosität der Ossikel bei Cholesteatompatienten mit dem intraoperativen Befund korrelierte. So zeigte sich eine deutlich gesteigerte Porosität der Incudes bei solchen Patienten, bei denen schon makroskopisch der Befall mehrerer Ossikel feststellbar war. Hieraus lässt sich vermuten, dass die Porosität der Ossikel den Krankheitsprogress spiegelt und somit die Ausbreitung des chronisch entzündlichen Fokus im Mittelohr das Ausmaß der ossären Resorption beeinflusst. Weiterhin konnten wir ebenfalls ein erhöhtes Elastizitätsmodul-zu-Härte-Verhältnis in cholesteatotisch veränderten Incudes mittels der

Nanoindentation nachweisen. Dieses ist ein Surrogatparameter für die Bruchfestigkeit eines Materials und wies in unserer Auswertung auf eine verbesserte mechanische Nachgiebigkeit hin. Da sich aber die Funktionalität der Ossikel im Kontext der Schalltransmission durch das Mittelohr fundamental von der Funktionalität anderer knöcherner Strukturen unterscheidet, ist ein gesteigertes Elastizitätsmodul-zu-Härte-Verhältnis, welches auf gesteigerte Elastizität des Materials hindeutet, womöglich als kontraproduktiv zu werten, da für die Gewährleistung einer lebenslangen Konstante dieser auditiven Transmission ein unverändertes Vibrationsvermögen der Gehörknöchelchen unabdingbar erscheint.

Leider gibt es zum heutigen Forschungsstand keine nicht interventionelle, pharmakologische Maßnahme, um dem chronisch entzündlichen Krankheitsgeschehen des Cholesteatoms etwas entgegenzusetzen. Standard ist also die chirurgische Sanierung des Befundes inklusive der radikalen Entfernung des betroffenen Gewebes mit anschließender Rekonstruktion des ossikulären Schalleitungsapparates und des Trommelfells im Sinne einer Tympanoplastik. Nur durch ein vertieftes pathophysiologisches Verständnis und Observation der pathognomonischen Veränderungen auf mikroskaliger Ebene lassen sich neue therapeutische Ansätze ableiten. So könnten gezielte pharmakotherapeutische Alternativen geschaffen, oder zumindest Prophylaktika zur Reduktion der postoperativen Rezidivrate zur Verfügung gestellt werden. Da die meisten Komplikationen des Cholesteatoms direkte oder indirekte Folgen der knöchernen Schädigung der Schädelbasis und Ossikel sind, wäre die Eindämmung dieser destruktiven Kapazität von besonderem Interesse. Zur Prävention dieser knöchernen Arrosionen könnten Pharmaka, welche bereits im Kontext der Osteoporose und Prophylaxe pathologischer Frakturen bei ossären Metastasen bekannt sind, eine Rolle spielen. Dies möglicherweise durch topische, transtympanale Applikation. Evidenz hierfür ergab sich durch eine In-vitro-Studie, in der sich die osteoresorptive Kapazität des Cholesteatoms unter dem Einfluss des Bisphosphonats Pamidronat inhibieren ließ (Yoon et al., 2001). Da dieser Resorptionsprozess durch die RANKL medierte Aktivierung von Osteoklasten vermittelt scheint, könnten Bisphosphonate, oder aber auch monoklonale RANKL-Antikörper präventiv auf Komplikationen wirken und als Bridge-to-surgery bei Cholesteatompatienten zum Einsatz kommen. Zudem erwies sich eine hoch dosierte, kalziumreiche Diät als präventiv auf die Hypomineralisation von murinen Gehörknöchelchen in Vitamin D defizienten Mäusen (Delsmann et al., 2022). Somit könnte sich auch die Modulation und Optimierung der Kalziumhomöostase als effektive, additive Maßnahme erweisen, um die Mineralisation der Ossikel unter dem Einfluss des Cholestatoms zu verbessern.

Zusammenfassend konnten wir eine erhebliche, durch osteoresorptive Prozesse gesteigerte Porosität, Matrixhypomineralisation und aberrante biomechanische Eigenschaften als eindeutige Phänomene des Amboss-Gehörknöchelchens in Patienten mit Cholesteatom

nachweisen. Diese Resultate zeigen auf, dass der Zustand niedrigen Knochenremodelings, wie er physiologisch in Gehörknöchelchen vorliegt, unter bestimmten Umständen aktiviert werden kann. Weitere Untersuchungen sind nötig, um hier die genauen Mechanismen und Treiber besser zu verstehen. Auch dem Abhängigkeitsverhältnis von Schalleitungsschwerhörigkeit und knöchern-ossikulärem Qualitätsverlust in Patienten mit Cholesteatom und anderen auditiven sowie osteometabolischen Krankheiten sollte weiter nachgegangen werden.

Literaturverzeichnis

- Albers, J., Schulze, J., Beil, F. T., Gebauer, M., Baranowsky, A., Keller, J., Marshall, R. P., Wintges, K., Friedrich, F. W., Priemel, M., Schilling, A. F., Rueger, J. M., Cornils, K., Fehse, B., Streichert, T., Sauter, G., Jakob, F., Insogna, K. L., Pober, B., Knobeloch, K.-P., Francke, U., Amling, M. & Schinke, T. 2011. Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol*, 192, 1057-1072.
- Aquino, J. E., Cruz Filho, N. A. & De Aquino, J. N. 2011. Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*, 77, 341-7.
- Busse, B., Djonic, D., Milovanovic, P., Hahn, M., Püschel, K., Ritchie, R. O., Djuric, M. & Amling, M. 2010. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell*, 9, 1065-1075.
- Delsmann, M. M., Peichl, J., Yorgan, T. A., Beil, F. T., Amling, M., Demay, M. B. & Rolvien, T. 2022. Prevention of Hypomineralization In Auditory Ossicles of Vitamin D Receptor (Vdr) Deficient Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 901265.
- Delsmann, M. M., Seist, R., Stürznickel, J., Schmidt, F. N., Mansour, A., Kobelski, M. M., Broocks, G., Peichl, J., Oheim, R., Praetorius, M., Schinke, T., Amling, M., Demay, M. B., Stankovic, K. M. & Rolvien, T. 2021. Conductive Hearing Loss in the Hyp Mouse Model of X-Linked Hypophosphatemia Is Accompanied by Hypomineralization of the Auditory Ossicles. *J Bone Miner Res*, 36, 2317-2328.
- Dempster, D. W., Compston, J. E., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R. R. & Parfitt, A. M. 2013. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 28, 2-17.
- Duboeuf, F., Burt-Pichat, B., Farlay, D., Suy, P., Truy, E. & Boivin, G. 2015. Bone quality and biomechanical function: A lesson from human ossicles. *Bone*, 73, 105-110.
- Falcioni, M., Taibah, A. & Rohit 2004. Pulsatile tinnitus as a rare presenting symptom of residual cholesteatoma. *J Laryngol Otol*, 118, 165-6.
- Fan, Z. F., Smith, P., Rauch, F. & Harris, G. F. 2007. Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. *Compos B Eng*, 38, 411-415.
- Hamed, M. A., Nakata, S., Sayed, R. H., Ueda, H., Badawy, B. S., Nishimura, Y., Kojima, T., Iwata, N., Ahmed, A. R., Dahy, K., Kondo, N. & Suzuki, K. 2016. Pathogenesis and Bone Resorption in Acquired Cholesteatoma: Current Knowledge and Future Prospectives. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 9, 298-308.
- Hamed, M. A., Nakata, S., Shiogama, K., Suzuki, K., Sayed, R. H., Nishimura, Y., Iwata, N., Sakurai, K., Badawy, B. S., Inada, K. I., Tsuge, H. & Tsutsumi, Y. 2017. Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, and Ki-67 Expression in Human Acquired Cholesteatoma and Their Correlation With Its Destructive Capacity. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 10, 213-220.
- Imai, R., Sato, T., Iwamoto, Y., Hanada, Y., Terao, M., Ohta, Y., Osaki, Y., Imai, T., Morihana, T., Okazaki, S., Oshima, K., Okuzaki, D., Katayama, I. & Inohara, H. 2019. Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling. *J Assoc Res Otolaryngol*, 20, 449-459.
- Jeong, J. H., Park, C. W., Tae, K., Lee, S. H., Shin, D. H., Kim, K. R. & Park, Y. W. 2006. Expression of RANKL and OPG in middle ear cholesteatoma tissue. *Laryngoscope*, 116, 1180-4.
- Kanzaki, S., Ito, M., Takada, Y., Ogawa, K. & Matsuo, K. 2006. Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone*, 39, 414-419.
- Kanzaki, S., Takada, Y., Ogawa, K. & Matsuo, K. 2009. Bisphosphonate Therapy Ameliorates Hearing Loss in Mice Lacking Osteoprotegerin. *J Bone Miner Res*, 24, 43-49.
- Koehne, T., Vettorazzi, E., Küsters, N., Lüneburg, R., Kahl-Nieke, B., Püschel, K., Amling, M. & Busse, B. 2014. Trends in trabecular architecture and bone mineral density distribution in 152 individuals aged 30–90years. *Bone*, 66, 31-38.

- Koizumi, H., Suzuki, H., Kawaguchi, R., Hashida, K., Hohchi, N., Ohkubo, J. I., Tabata, T. & Kitamura, T. 2017. Presence of osteoclasts in middle ear cholesteatoma: a study of undecalcified bone sections. *Acta Otolaryngol*, 137, 127-130.
- Lysaght, A. C., Yuan, Q., Fan, Y., Kalwani, N., Caruso, P., Cunnane, M., Lanske, B. & Stanković, K. M. 2014. FGF23 Deficiency Leads to Mixed Hearing Loss and Middle Ear Malformation in Mice. *PLOS ONE*, 9, e107681.
- Manolagas, S. C. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocr Rev.*, 21, 115-137.
- Marenda, S. A. & Aufdemorte, T. B. 1995. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 112, 359-369.
- Martins, O., Victor, J. & Selesnick, S. 2012. The relationship between individual ossicular status and conductive hearing loss in cholesteatoma. *Otol Neurotol*, 33, 387-92.
- Palumbo, C., Cavani, F., Sena, P., Benincasa, M. & Ferretti, M. 2012. Osteocyte apoptosis and absence of bone remodeling in human auditory ossicles and scleral ossicles of lower vertebrates: a mere coincidence or linked processes? *Calcif Tissue Int*, 90, 211-8.
- Peek, F. a. W., Huisman, M. A., Berckmans, R. J., Sturk, A., Van Loon, J. & Grote, J. J. 2003. Lipopolysaccharide concentration and bone resorption in cholesteatoma. *Otol Neurotol*, 24, 709-713.
- Püschel, K., Heinemann, A., Dietz, E., Hellwinkel, O., Henners, D. & Fitzek, A. 2020. New developments and possibilities in the field of post-mortem medicine mortui vivos docent. *Rechtsmedizin*, 30, 425-429.
- Relucenti, M., Miglietta, S., Bove, G., Donfrancesco, O., Battaglione, E., Familiari, P., Barbaranelli, C., Covelli, E., Barbara, M. & Familiari, G. 2020. SEM BSE 3D Image Analysis of Human Incus Bone Affected by Cholesteatoma Ascribes to Osteoclasts the Bone Erosion and VpSEM dEDX Analysis Reveals New Bone Formation. *Scanning*, 2020, 9371516.
- Rolvien, T., Schmidt, F. N., Milovanovic, P., Jähn, K., Riedel, C., Butscheidt, S., Püschel, K., Jeschke, A., Amling, M. & Busse, B. 2018. Early bone tissue aging in human auditory ossicles is accompanied by excessive hypermineralization, osteocyte death and micropetrosis. *Sci Rep*, 8, 1920.
- Roschger, P., Fratzl, P., Eschberger, J. & Klaushofer, K. 1998. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone*, 23, 319-326.
- Rosito, L. S., Netto, L. S., Teixeira, A. R. & Da Costa, S. S. 2016. Sensorineural Hearing Loss in Cholesteatoma. *Otol Neurotol*, 37, 214-7.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-675.
- Schürmann, M., Oppel, F., Shao, S., Volland-Thurn, V., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Scholtz, L.-U. & Sudhoff, H. 2021. Chronic inflammation of middle ear cholesteatoma promotes its recurrence via a paracrine mechanism. *Cell Commun Signal*, 19, 25.
- Semaan, M. T. & Megerian, C. A. 2006. The Pathophysiology of Cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am*, 39, 1143-1159.
- Shimizu, K., Kikuta, J., Ohta, Y., Uchida, Y., Miyamoto, Y., Morimoto, A., Yari, S., Sato, T., Kamakura, T., Oshima, K., Imai, R., Liu, Y.-C., Okuzaki, D., Hara, T., Motooka, D., Emoto, N., Inohara, H. & Ishii, M. 2023. Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction. *Nat Commun*, 14, 4417.
- Tucci, D. L. & Doherty, J. K. 2019. Contributions of Contemporary Human Temporal Bone Histopathology to Clinical Otolaryngology. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 161, 725-733.
- Van Lenthe, G. H., Hagenmüller, H., Bohner, M., Hollister, S. J., Meinel, L. & Müller, R. 2007. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. *Biomaterials*, 28, 2479-2490.
- Wiatr, A., Streck, P. & Wiatr, M. 2020. Patterns of Bone Damage in Patients With Chronic Middle Ear Inflammation. *Ear Nose Throat J*, 145561320924144.

- Yoon, T. H., Lee, S. H., Park, M. H., Chung, J. W. & Kim, H. J. 2001. Inhibition of cholesteatomatous bone resorption with pamidronate disodium. *Acta Otolaryngol*, 121, 178-81.
- Yung, M., Tono, T., Olszewska, E., Yamamoto, Y., Sudhoff, H., Sakagami, M., Mulder, J., Kojima, H., Incesul, A., Trabalzini, F. & Özgirgin, N. 2017. EAONO/JOS Joint Consensus Statements on the Definitions, Classification and Staging of Middle Ear Cholesteatoma. *J Int Adv Otol*, 13, 1-8.

4 Kurzfassungen

Kurzfassung (Deutsch)

Das Cholesteatom ist eine chronisch entzündliche, gutartige, aber destruierende verhornende Plattenepithelläsion im Mittelohr, die zu einer fortschreitenden Zerstörung der Gehörknöchelchen (Ossikel) führen kann. Genaue Daten über die Integrität und Zusammensetzung der betroffenen Gehörknöchelchen auf mikroskaliger Ebene sind jedoch kaum verfügbar. Ziel dieser Studie war es, die knochenqualitativen Merkmale von Amboss-Präparaten (Incudes), die von Cholesteatompatienten entnommen wurden, eingehend zu charakterisieren und mit den makroskopisch intraoperativen Befunden zu korrelieren. Die Studienkohorte umfasste 14 Patienten mit Cholesteatom, 9 mit chronischer Otitis media mesotympanalis ohne Cholesteatom und 8 Kontrollen. Während die Ossikel der ersten beiden Gruppen intraoperativ entnommen wurden, handelte es sich bei der Kontrollgruppe um Ossikel von skelettal intakten Spendern, die bei rechtsmedizinischen Autopsien entnommen wurden. Demografische, klinische und krankheitsspezifische Daten wurden aus den Krankenakten entnommen. Alle Proben wurden mittels Mikro-Computertomographie, Histomorphometrie an nicht entkalkten Schnitten, Rasterelektronenmikroskopie (qBEI) und Nanoindentation untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Porosität der Incudes bei vorliegendem Cholesteatom signifikant höher war als bei chronischer Otitis media vom mesotympanalen Typ ($p < 0,05$). Die histologische Beurteilung ergab einen höheren Osteoidanteil und mehr Osteozyten sowie Osteoklasten, jedoch unveränderte Osteoblastenindices. Die Amboss-Präparate von Patienten mit Cholesteatom wiesen im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,0001$) und der chronischen Otitis media mesotympanalis ($p < 0,05$) eine geringere Matrixmineralisation (CaMean) auf und auch die biomechanischen Parameter zeigten sich durch ein erhöhtes Elastizitätsmodul-zu-Härte-Verhältnis verändert. Die Incusporosität war bei Patienten mit intraoperativem, makroskopischem Befall von >1 Gehörknöchelchen höher, was möglicherweise als Referenzparameter für die Ausbreitung des chronisch entzündlichen Geschehens gewertet werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Studie eine erhöhte resorptionsassoziierte Porosität, eine gestörte Matrixmineralisation und veränderte biomechanische Parameter als eindeutige Merkmale von Gehörknöchelchen bei Cholesteatomen nachweist. Weitere Forschung ist erforderlich, um die genauen Mechanismen hinter diesen Befunden besser zu verstehen und herauszufinden, wie sie zu der zerstörerischen Natur des Cholesteatoms beitragen und wie eine gestörte ossikuläre Knochenqualität den konduktiven Hörverlust mitbedingt. Ein fundiertes Verständnis der mikrostrukturellen Veränderungen in den Gehörknöchelchen von Cholesteatompatienten könnte zur Entwicklung gezielterer und wirksamerer Behandlungsmethoden für diese Erkrankung führen.

Kurzfassung (Englisch)

Cholesteatoma is a chronic inflammatory, benign, but destructive, squamous keratinizing epithelial lesion in the middle ear that can lead to progressive destruction of the auditory ossicles. However, precise data on the integrity and composition of affected ossicles at a microscale level is scarce. The aim of this study was to deeply characterize the bone-qualitative features of incus specimens taken from cholesteatoma patients and to correlate them with the macroscopic intraoperative findings. The study cohort comprised 14 patients with cholesteatoma, 9 with chronic otitis media mesotympanalis without cholesteatoma, and 8 controls. While incus specimens in the first two groups were obtained intraoperatively, the control group consisted of ossicles from skeletally intact donors collected during autopsies conducted for other indications. Demographic, clinical, and disease-specific data were assessed from medical records. All specimens were evaluated by micro-computed tomography, histomorphometry on undecalcified sections, quantitative backscattered electron imaging (qBEI), and nanoindentation. Our results showed that the porosity of the incus specimens was significantly higher in the presence of cholesteatoma than in chronic otitis media of the mesotympanic type ($p < 0.05$). Histological assessment revealed higher osteoid levels and more osteocytes and osteoclasts, but an unaltered osteoblast index. Cholesteatoma incudes showed lower matrix mineralization (CaMean) compared to controls ($p < 0.0001$) and chronic otitis media of the mesotympanic type ($p < 0.05$). Also, biomechanical parameters were altered by an increased modulus/hardness ratio. The incus porosity was higher in patients with intraoperative, macroscopic affection of >1 ossicle, which could be interpreted as a reference parameter for the spread of the chronic inflammatory process. In conclusion, our study demonstrates increased resorption-associated porosity, impaired matrix mineralization and altered biomechanical properties as distinct features of auditory ossicles in cholesteatoma. Further research is needed to better understand the exact mechanisms behind these findings and how they contribute to the destructive nature of cholesteatoma and how impaired ossicular bone quality may contribute to conductive hearing loss. A profound understanding of the microstructural changes in the auditory ossicles of cholesteatoma patients could lead to the development of more targeted and effective treatment options for this condition.

5 Erklärung des Eigenanteils

Ein wesentlicher Anteil meines Beitrages an der vorliegenden Forschungsarbeit lag in der Durchführung der experimentellen, hochauflösenden Untersuchung von Amboss-Präparaten. Dies beinhaltet jeweils für die Mikrocomputertomografie, Histomorphometrie, Elektronenmikroskopie (qBEI) und Nanoindentation die Aufbereitung der Proben mit anschließender Ausführung der Techniken sowie der Qualitätssicherung der gewonnenen Ergebnisse. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden daraufhin von mir gesammelt, vor- und aufbereitet und dann statistisch ausgewertet. Die Literaturrecherche, die Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext sowie in die aktuelle Datenlage und das Verfassen des Originalartikels ist in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. Dr. Tim Rolvien und Dr. Maximilian M. Delsmann erfolgt.

Die klinische Korrelation unserer Ergebnisse erfolgte durch die dankenswerte Unterstützung von Dr. Jonathan Peichl aus der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, von welcher wir auch unsere Cholesteatom bzw. Otitis media mesotympanalis Proben erhielten. Die skelettal intakten Kontrollen der Gehörknöchelchen konnten wir durch eine Kooperation mit dem rechtsmedizinischen Institut der Universitätsmedizin Hamburg, aus deren forensischen Autopsien, durch Prof. Dr. Klaus Püschel, erhalten. Die finale Durchsicht und Überarbeitung des Manuskripts konnte in Abstimmung mit dem übrigen Autorenteam durch das maßgebliche Engagement von PD Dr. Dr. Tim Rolvien fertiggestellt werden.

6 Danksagung

Größter Dank gilt zuallererst der Betreuung und Förderung durch meinen Doktorvater Herr PD Dr. Dr. Tim Rolvien. Durch ihn erhielt ich nicht nur die Möglichkeit der Promotion an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie und Orthopädie in Kooperation mit dem Institut für Osteologie und Biomechanik, sondern auch einen kompetenten Ansprechpartner und Koordinator in allen Belangen rund um meine wissenschaftliche Arbeit. Er war stets ansprechbar und unterstützte mich gewissenhaft, von der Projektidee bis zur Umsetzung und dem erfolgreichen Abschluss des Projekts. Für das entgegengebrachte Vertrauen und Engagement möchte ich mich auf ganzer Linie bedanken.

Besonderer Dank gilt zudem Dr. Maximilian M. Delsmann als wissenschaftlicher Betreuer meines Promotionsvorhabens. Durch ihn erfuhr ich jederzeit kompetenten, wertvollen Rat und erhielt einen unkomplizierten Diskussionspartner. Seine Anregungen, Denkanstöße und Korrekturvorschläge haben mir maßgeblich geholfen, das Projekt erfolgreich und in angenehmer Atmosphäre abzuschließen.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Michael Amling für das Interesse und den vielseitig erteilten persönlichen Rat in jedem Stadium der Arbeit.

Zudem möchte ich den Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Orthopädie und des Instituts für Osteologie und Biomechanik danken, die nie müde wurden, mich mit technischem Rat in der erfolgreichen Durchführung der Untersuchungen zu unterstützen.

Abschließend möchte ich meine besondere Dankbarkeit und Verbundenheit zu meiner Familie ausdrücken. Erst durch ihre vielseitige und uneingeschränkte Unterstützung wurde es mir ermöglicht, meinen bisherigen Werdegang zu beschreiten.

7 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

8 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ort, Datum

Hamburg d. 20.02.2024

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paul Bonik', written over a light blue grid background.

Unterschrift:

Vorname, Nachname

Paul Bonik