



TU Dresden, Med. Fakultät, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen

z. Hd. Frau Jana Hennig
Naumannstr. 8
01309 Dresden

Prof. Dr. rer. nat.

Michael Gelinsky, FBSE

Leiter des Zentrums für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung

Telefon: 0351 458 6695

Telefax: 0351 458 7210

E-Mail: michael.gelinsky@tu-dresden.de

WWW: <http://tu-dresden.de/med/tfo/>

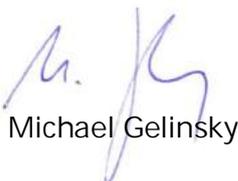
Dresden, 28. April 2022

Abschlussbericht zu unserem Projektantrag „Nachbildung des natürlichen Trommelfells durch Kombination innovativer additiver Fertigungsverfahren“

Sehr geehrte Frau Hennig,
bitte finden Sie anbei den Abschlussbericht zu unserem Forschungsvorhaben „Nachbildung des natürlichen Trommelfells durch Kombination innovativer additiver Fertigungsverfahren“. Für die durch die Roland Ernst-Stiftung gewährte Förderung möchten wir uns nochmals sehr herzlich bedanken!

Für Rückfragen stehen wir Ihnen natürlich sehr gerne zu Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen,
auch von Herrn Professor Neudert aus der HNO,


Michael Gelinsky

Technische Universität Dresden

NATROM

Abschlussbericht des Projekts zur Nachbildung des natürlichen Trommelfells durch die Kombination innovativer additiver Fertigungsverfahren

Projektleitung:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Prof. Dr. med. Marcus Neudert

Projektbearbeitung:

Max v. Witzleben, M. Sc. Physik

Dipl.-Ing. Thomas Stoppe

Dr. -Ing. Zhaoyu Chen

Dr. rer. med. Dipl.-Ing. Matthias Bornitz

Projektlaufzeit: 01.02.2021 – 31.03.2022

Ziel

Im Projekt sollten die additiven Fertigungsverfahren des Melt Electrowriting und Solution Electrospinning verbunden werden, um sowohl die Form, als auch den strukturellen Aufbau des humanen Trommelfells (*tympanic membrane*, TM) bestmöglich nachzubilden. Hierdurch sollte ein neuartiges, biokompatibles Implantat geschaffen werden, welches die akusto-mechanischen Eigenschaften des Trommelfells imitiert. Dementsprechend sollten die Funktionsweisen der gefertigten Membranen anhand etablierter akusto-mechanischer Untersuchungen analysiert werden. Die Biokompatibilität sollte mittels des Wachstums von Trommelfell-typischen Zellen wie Keratinozyten und Fibroblasten auf den Konstrukten charakterisiert werden.

AP1 - Herstellung und Optimierung der Scaffolds

Dauer: 01. Mai - 31. August 2021

Basierend auf Versuchen war bekannt, dass mit Melt Electrowriting gefertigte Gitterstrukturen die mechanischen und akustischen Eigenschaften des TM gut reproduzieren können. Hierbei zeigte das Design bestehend aus 4 Lagen Polycaprolacton-Fasern (PCL) mit einem Faserabstand von 250 μm und einem Faserdurchmesser von 10 μm die besten akustischen Eigenschaften, während die mechanischen Eigenschaften geringer als die des Trommelfells ausfielen. Zusätzlich wiesen die Netze aufgrund der geringen Lagenanzahl eine Fragilität im Handling auf, wodurch ein möglicher klinischer Einsatz erschwert wäre. Als entgegenwirkende Maßnahmen sollte die Kollagenfaserstruktur und die Morphologie des nativen Trommelfells durch die Ablage von zirkulären und radialen PCL-Fasern über Opferstrukturen nachgeahmt werden. Durch Drucken eines PCL-Ringes um die Faserstruktur sollte das Handling verbessert werden. Abschließend sollten die Netze mit elektrogewebtem Kollagen verstärkt werden. Zur Kontrolle wurden die so gefertigten Netze mit der zuvor evaluierten Gitterstruktur verglichen.

Die neuen synthetischen Strukturen wurden schrittweise durch vier unterschiedliche Druckprozesse hergestellt (vgl. Abbildung 1):

1. Das Drucken eines Ringes aus PCL mit einem Durchmesser von 10 mm mittels Fused Deposition Modelling (FDM) zur Stabilisierung und Erhöhung der Handhabbarkeit der Scaffolds.
2. Die Fertigung einer Opferpyramide mittels Extrusionsdrucks aus Silikon, um unter Ausnutzung des Shape Memory Effekts des PCL die Morphologie des TM nachzuahmen.
3. Melt Electrowriting der PCL-Fasern über die Opferstrukturen; die Fasern wurden dazu in der zuvor untersuchten Gitterstruktur oder in radialer und zirkulärer Orientierung abgelegt.
4. Final wurde die Verstärkung der Scaffolds durch Electrospinning von in Essigsäure gelöstem Kollagen zur weiteren mechanischen Optimierung der Scaffolds untersucht.

Zur Herstellung einer luftdichten Membran mit einer hohen Biokompatibilität wurden die Scaffolds abschließend mit Kollagen beschichtet.

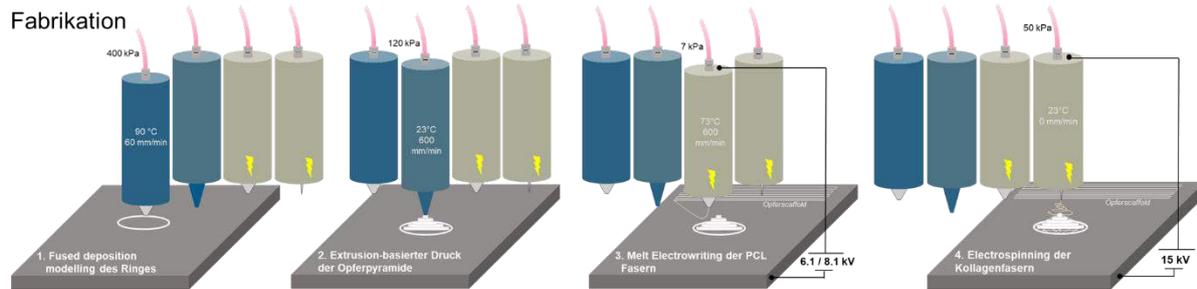


Abbildung 1: Darstellung der einzelnen Druckschritte zur Fertigung der Trommelfellersatzstrukturen. Abschließend wurden die Scaffolds manuell mit Kollagen beschichtet um eine luftdichte, biokompatible Membran zu erzeugen.

Die einzelnen Prozessschritte beeinflussten die akusto-mechanischen Eigenschaften der Ersatzstrukturen auf unterschiedliche Weise und wurden im Folgenden einzeln untersucht. Neben den unterschiedlichen Faserstrukturen wurden auch unterschiedliche Opferpyramiden-Designs untersucht, um deren Einfluss auf das elektrische Feld und damit auf die Faserablage zu überprüfen. Da die akusto-mechanischen Eigenschaften ebenso von der Faserablage beeinflusst wurden, wurde dieser Einfluss ebenfalls evaluiert.

1. Ring:

Der Durchmesser des Rings wurde auf eine Trommelfell-typische Größe von 10 mm festgelegt, mit dem Ziel das Handling der dünnen Strukturen zu vereinfachen ohne die akusto-mechanischen Eigenschaften negativ zu beeinflussen. Flache Netze beider Faserstrukturen zeigten eine höhere mechanische Belastbarkeit im Vergleich zu den Membranen ohne Ring und somit eine leichte Versteifung. Dies wurde in der akustischen Analyse bestätigt, da die Resonanzfrequenz von den angestrebten 300 Hz auf über 1000 Hz erhöht wurde. Auf Scaffolds mit konischer Morphologie hatte der Ring dagegen keinen Einfluss auf die akusto-mechanischen Eigenschaften. Viel mehr hatte der Ring Einfluss auf die Morphologie der Scaffolds während und nach der Kollagenbeschichtung. Bei einem Strangdurchmesser von 100 μm und geringer zeigte sich deutlich ein „Sombbrero“-Effekt bei dem sich die Ränder der Netze stark wölbten (vgl. Abbildung 2). Bei einem höheren Strangdurchmesser $> 300 \mu\text{m}$ trat dieser Effekt deutlich seltener auf und konnte durch Anfeuchten der Scaffolds egalisiert werden. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass während der Kollagentrocknung Spannungen im Scaffold induziert wurden, welche die Biegesteifigkeit der Scaffolds im Vergleich zu jenen in den Vorversuchen erhöhten. Damit die Spannungen keinen Einfluss auf die Analyse der akusto-mechanischen Eigenschaften ausübten, wurden die Ringe durchgeschnitten und die Scaffolds vor den Messungen befeuchtet. Beides simulierte einen chirurgischen Einsatz im Mittelohr, denn auch dort müssen die Scaffolds an den Defekt angepasst und durch Wasseradhäsion fixiert werden.

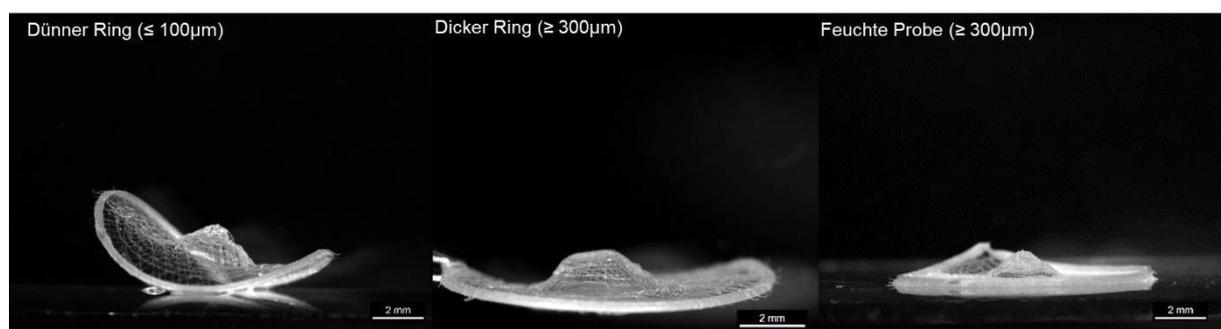


Abbildung 2: Darstellung des Einflusses des Strangdurchmessers des Ringes auf die Wölbung der Scaffolds nach der Kollagentrocknung. Ein Strangdurchmesser von 100 μm und geringer führte zu einem Sombbrero-Effekt, während eine Strangbreite von 300 μm und mehr diesen Effekt nahezu unterband. Durch ein Anfeuchten der Probe mit Wasser löste sich die restliche Spannung im Scaffold.

2. Silikonpyramide:

Ziel der Opferstruktur war es, anhand des Shape Memory Effektes von PCL die natürliche Morphologie des Trommelfells bei gleichmäßiger Faserablage und Faserdicke zu imitieren.

Um ein bestmögliches Resultat zu erzielen mussten verschiedene Faktoren im Druckprozess berücksichtigt werden. Ein erster Entwurf der Opferstruktur, angelehnt an die Morphologie des Trommelfells zeigte, dass die Faserablage durch die Anzahl an Silikonlagen und die Exaktheit dieser stark beeinflusst wurde (Abbildung 3 A+B). So erzeugten Silikonspitzen ein stärkeres elektrisches Feld, wodurch die Fasern lokal von ihrem angedachten Weg abgelenkt wurden. Zusätzlich lenkten die Silikonlagen vor allem die zirkulären Fasern derart um, dass diese nur auf den einzelnen Silikonlagen abgelegt wurden, wodurch anstelle des vorgesehenen, regelmäßigen Faserabstands von 250 μm unterschiedliche Faserabstände auftraten (Abbildung 3B). Dies hatte zur Folge, dass auf den Scaffolds ausgesiedelte Fibroblasten einen ungleichmäßigen Zellrasen auf dem Scaffold ausbildeten (Abbildung 3C). Zusätzlich führte die unregelmäßige Ablenkung zu einer kurzzeitigen Streckung der Faser, wodurch stärkere Schwankungen in der Faserdicke auftraten. Deswegen wurde parallel zu einer Imitation der TM-Morphologie (TM-Mimikry) ein Pyramidendesign gewählt, welches durch eine gleichmäßigere Steigung der Pyramide ein homogeneres elektrisches Feld erzeugt (Feld-Design, Abbildung 3D). Dieses Design bestand aus 8 Silikonlagen mit einer Schichtdicke von jeweils 250 μm , welches genau dem angedachten Faserabstand von 250 μm entsprach.

Einen weiteren Faktor für die mechanische Analyse der Scaffolds stellte die Verwendung eines Stempels dar, welcher mit konstanter Geschwindigkeit mittig durch die Netze verfahren wurde und deren Widerstandskraft aufnahm. Die daraus erhaltenen Ergebnisse waren von dem verwendeten Stempeldurchmesser (3 mm) abhängig. Da die Spitze beider Pyramiden genau der Hälfte des Stempeldurchmessers betrug, bestand die Möglichkeit, dass der Stempel keine gleichmäßige Auflage durch die Netze erfuhr, wodurch die Widerstandskraft auf eine kleinere Fläche hätte wirken können. Um diesen Effekt untersuchen zu können, wurde zusätzlich eine Opferstruktur geschaffen, deren zentrale Fläche der des Stempels entsprach (Stempel-Design). Um eine Vergleichbarkeit zwischen den drei Designs zu ermöglichen wurden alle mit 8 Silikonlagen gedruckt, wobei das TM-Mimikry und das Stempel-Design die gleiche Steigung aufwiesen. Zudem wurden in den nachfolgenden Versuchen zuerst gedruckte und getrocknete Silikonpyramiden untersucht, um mit gleichbleibenden Eigenschaften die Einflüsse der nachfolgenden Untersuchungen abschätzen zu können. Durch den Trocknungsschritt schrumpften die $8 \times 0,25 \mu\text{m} = 2 \text{ mm}$ hohen Pyramiden auf die angedachte und ans Trommelfell angelehnte Höhe von 1,7 mm.

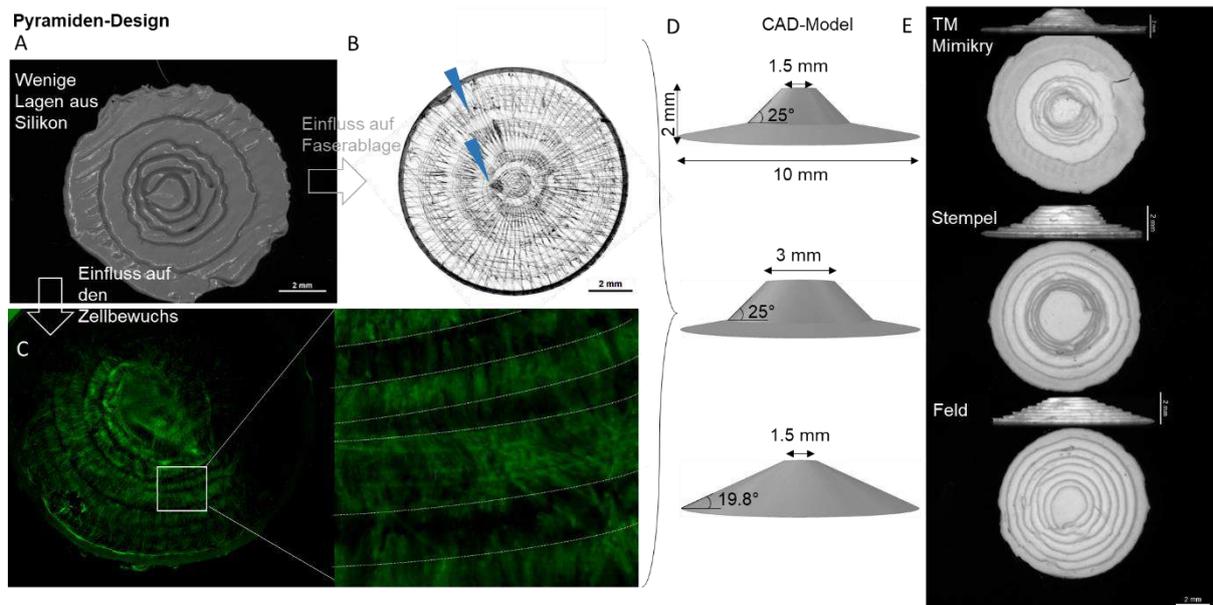


Abbildung 3: Einfluss der Opferstruktur (A) auf den resultierenden PCL-Scaffold mit irregulärer Faserablage (B) und den ungleichmäßigem Zellbewuchs (C). Diese vorläufigen Untersuchungen führten zur Fertigung dreier unterschiedlicher Pyramidenstrukturen, dem TM-Mimikry, dem Stempel-Design und dem Feld-Design (D), um so die unterschiedlichen Effekte einschätzen zu können. Die resultierenden gedruckten Strukturen mit jeweils 8 Lagen sind in E gezeigt, einmal von oben und einmal von der Seite.

Laut Literatur^{1,2} ist eine weitere Optimierung der Faserablage über unebene Untergründe möglich, wenn der Abstand der Düse zum Ablageort stets konstant bleibt, die Düse also der Kontur der Opferstruktur folgt. Dies war jedoch mit der Software des zu Verfügung stehenden MEW-Druckers nicht möglich, weshalb mit der Software Python eigens entsprechende G-codes programmiert wurden. Basierend auf dem jeweiligen Pyramidendesign konnte so der Abstand der Düse zum Ablageort stufenweise bzw. schrittweise angepasst und so konstant gehalten werden (Abbildung 4A, z-Schritte). Da der verwendete Drucker keine simultane z-Achsen-Änderung parallel zu einer x-y-Achsenänderung durchführen konnte, pausierte der Druckprozess bei jeder z-Änderung für einige hundert Millisekunden und veränderte so den Druckprozess. Dies führte zu einer unregelmäßigen Faserdicke, welche durch eine entsprechende Erhöhung der Druckgeschwindigkeit ausgeglichen werden sollte (z- & v-Schritte). Als Kontrolle wurden Scaffolds mit einem konstanten Düse-Druckbett-Abstand gefertigt (z konst.). Die unterschiedlichen Druckparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Faserdicke (Abbildung 4A), sodass für die Fertigung ein konstanter Düsen-Druckbett-Abstand ausreichend ist.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht in wie weit die Faserdicke variiert, wenn anstatt über bereits getrocknete Pyramiden über frisch gedruckte, also feuchten, Pyramiden MEW-Fasern abgelegt wurden (Abbildung 4B). Aufgrund der Feuchtigkeit wiesen die Opferstrukturen eine andere Leitfähigkeit auf und modifizierten so das elektrische Feld im Druckprozess. Bei einer Spannung von 8.1 kV führte dies zu einer signifikanten Zunahme der Faserdicken bei allen untersuchten Gruppen bis auf die TM-Mimikry mit radialen und zirkulären Fasern. Durch eine Reduzierung der Spannung auf 6.1 kV konnte dem jedoch entgegengewirkt werden.

¹ Saha, U., Nairn, R., Keenan, O. and Monaghan, M.G. (2021), A Deeper Insight into the Influence of the Electric Field Strength When Melt-Electrowriting on Non-Planar Surfaces. *Macromol. Mater. Eng.*, 306: 2100496. <https://doi.org/10.1002/mame.202100496>

² Peiffer, Q. C., de Ruijter, M., van Duijn, J., Crottet, D., Dominic, E., Malda, J., Castilho, M. (2020), Melt electrowriting onto anatomically relevant biodegradable substrates: Resurfacing a diarthrodial joint, *Materials & Design*, 195, 109025, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109025>

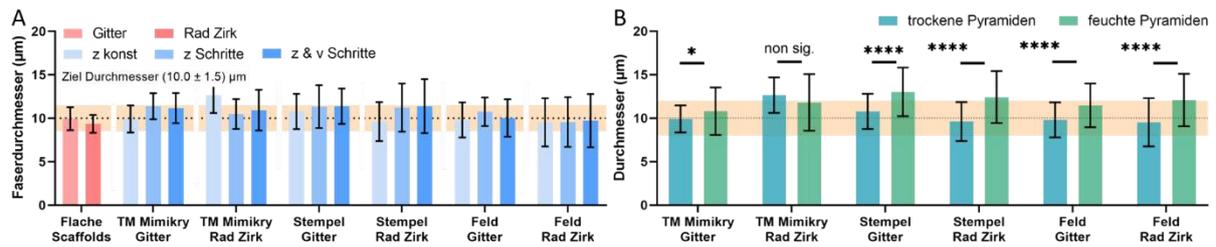


Abbildung 4: Darstellung des Einflusses der unterschiedlichen Fabrikationsschritte auf die abgelegte Faserdicke. In A zeigte die Unterteilung des Druckprozesses in unterschiedliche z-Abstände und Geschwindigkeiten keinen signifikanten Einfluss, weshalb für die nachfolgenden Untersuchungen stets ein konstanter z-Abstand gewählt wurde. Wurden die PCL-Fasern über frisch gedruckte Silikonpyramiden anstatt über trockene abgelegt, zeigte sich eine signifikante Verschiebung des Faserdurchmessers zu höheren Faserdicken, jedoch immer noch im angedachten Zielbereich von $10 \pm 1,5 \mu\text{m}$, bis auf das Stempel-Gitter-Design. ($n=3$ Scaffolds pro Kondition; für die Bestimmung der Faserdurchmesser wurden 30 Messpunkte pro Scaffold verwendet)

Diese Erkenntnisse wurden in die Herstellung der Scaffolds für die finale akusto-mechanische Analyse eingebracht, deren Faserdurchmesser und Porosität in Abbildung 5A-C gezeigt und deren Auswertung in AP2 - Mechanische und Schwingungsanalyse dargestellt ist. Das Drucken über die Opferstrukturen führte zu einem leichten Anstieg und einer stärkeren Schwankung des Faserdurchmessers. Durch die Anpassung des Pyramiden-Designs an das elektrische Feld konnte die Faserdickenzunahme egalisiert werden, jedoch nahm die Faserdickenschwankung zu. Ebenso konnte die Schwankungen der Faserabstände (Porosität) nicht messbar optimiert werden. Wie in Abbildung 5A gezeigt, wiesen die Faserabstände eine gewisse Regelmäßigkeit im äußeren Bereich auf und wurden zur Mitte hin, also zur Spitze der Opferstruktur hin, unregelmäßiger. Dies liegt an der Geometrie der Opferstrukturen, die Pyramidenspitze wies ein leicht höheres elektrisches Feld auf und verkürzte lokal den Abstand zwischen Düse und Druckbett. Diese beiden Faktoren ließen sich auch nicht durch eine Anpassung der Opferstruktur an das elektrische Feld ausgleichen, wodurch die Faserablage gestört wurde.

Für eine optimale Schallübertragung war die abschließende Beschichtung der Scaffolds mit Kollagen notwendig, um so Luftdruck-dichte Membranen zu fabrizieren. Hierzu wurden die Scaffolds mit $150 \mu\text{L}$ einer 1 mg/mL Kollagenlösung bedeckt, welche anschließend bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ fibrillierte. Überschüssiges Kollagen wurde durch die Auflage von Filterpapier abgetragen. Anschließend wurden die noch feuchten Scaffolds auf mittlerweile ausgehärtete Silikonpyramiden gelegt, um in ihrer konischen Form zu trocknen, bevor die Pyramiden wieder entfernt wurden. Dieser letzte Schritt verhinderte die Egalisierung der konischen Form durch auftretende Spannungen im Trocknungsprozess. Dennoch verringerte sich die Kegelhöhe der Scaffolds durch die Kollagenbeschichtung leicht (Abbildung 5D- F). Scaffolds mit radialen und zirkulären Fasern zeigten eine signifikant höhere Kegelhöhe nach der Kollagenbeschichtung als Scaffolds mit Gitterstruktur, was vor allem bei dem für das elektrische Feld optimierten Design sichtbar war (Abbildung 5F). Zwischen den unterschiedlichen Pyramiden-Designs mit radialen und zirkulären Fasern konnten aber keine Unterschiede festgestellt werden.

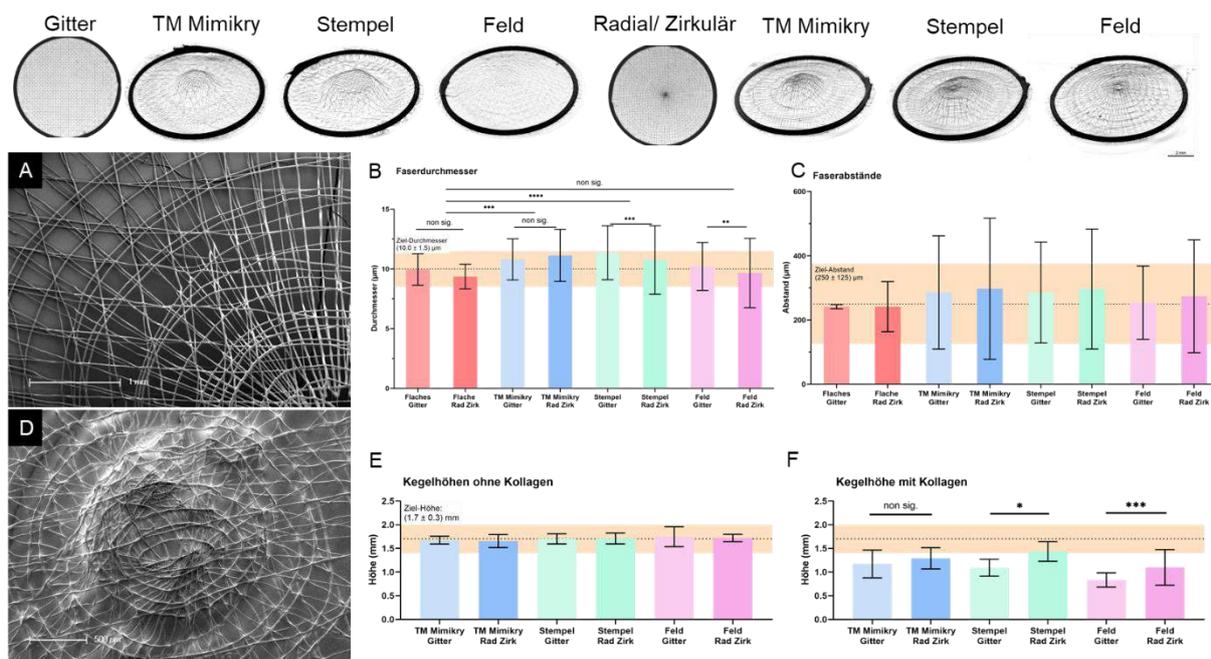


Abbildung 5: Darstellung der finalen morphologischen und strukturellen Eigenschaften der Scaffolds abhängig vom jeweiligen Design. Ein Beispiel der Ablage der radialen und zirkulären Fasern ist in A gezeigt, die Faserdurchmesser der unterschiedlichen Designs in B, die Porosität in C und ein Kollagen beschichteter Scaffold in D. Unbeschichtete Scaffolds zeigten eine gute Übereinstimmung der Kegelhöhe mit dem des durchschnittlichen Trommelfells. Durch die Beschichtung reduzierte sich diese jedoch signifikant (F). Das Einbringen von radialen und zirkulären Fasern wirkte dem Effekt jedoch messbar entgegen. ($n=3$ Scaffolds; für den Faserdurchmesser wurden 30 Messpunkte und für die Porosität 20 Messpunkte pro Scaffold verwendet)

Aufgrund der in AP 2.2 Akustische Analyse festgestellten optimalen akusto-mechanischen Eigenschaften der Scaffolds mit dem ans elektrische Feld angepassten Design, wurde dieses ausgewählt, die Einflüsse von darauf elektrogewonnenem Kollagen zu untersuchen. Hierzu wurden 250 mg gereinigtes Kollagen in 1 mL 50-prozentiger Essigsäure über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde das Kollagen bei einer Raumfeuchte von 30-35 % und einer Temperatur von 25 ± 1 °C für 10 min über die Scaffolds auf den Opferpyramiden gesponnen (Abbildung 6). Ohne getrocknete Opferpyramiden verflachten die Scaffolds durch die Auftragung des Kollagens. Bei anderen Bedingungen war ein Spinnen des Kollagens nicht möglich. So verstopfte die Düse bei einer trockeneren Umgebung als 30 %, während eine Luftfeuchte von mehr als 35% für einen Übergang des Elektrosplinnings in das Elektrospraying von kleinen Tröpfchen sorgte. Durch einen max. Abstand der Düse zum Druckbett (15 mm), einer Hochspannung von 15 kV und einem Druck von 45 kPa konnte in den 10 min Druckzeit eine sichtbare Schicht an Fäden auf den Scaffolds abgelegt werden. Die Zeit reichte jedoch nicht aus, um eine messbare Dicke an Kollagenfasern aufzutragen (Abbildung 6A). Der durchschnittliche Faserdurchmesser von $0,47 \pm 0,12$ µm wurde mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der Scaffolds ermittelt. Dazu wurde eine Gaußkurve an die Anzahl der gemessenen Faserdurchmesser gefittet (Abbildung 6C). Nach dem Elektrosplinning-Prozess wurden die gesponnenen Fasern mittels Formaldehyd-Dampf vernetzt. Dazu wurden sie für 4 Tage einem verdunstenden Formaldehyd-Reservoir (4 %) ausgesetzt. Die Vernetzung wurde durch eine einstündige Immersion der Scaffolds in Wasser überprüft. Die Vernetzung war funktional, wenn die Fasern sich nicht auflösten. Parallel zu der Behandlung mit Formaldehyd-Dampf wurden eine Vernetzung mit UV-Licht und Glutaraldehyd-Dampf untersucht. Beide wurden nicht weiter angewendet, da UV-Licht alleine nicht genügte und 30 % Glutaraldehyd toxischer ist als die 4 %ige Formaldehyd-Verdünnung. Abschließend wurden die Scaffolds wieder mit der Kollagenlösung (1 mg/mL) beschichtet (Abbildung 6B).

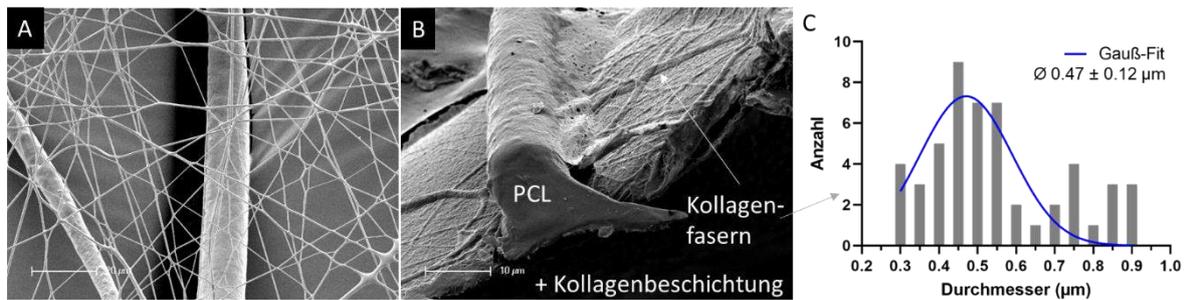


Abbildung 6: Darstellung der elektrogenesponnenen Kollagenschicht auf einen unbeschichteten Scaffold (A), nach der Kollagenbeschichtung (B) und der Verteilung der Durchmesser der elektrogenesponnenen Kollagenfasern (C) mit im Mittel $0,47 \pm 0,12 \mu\text{m}$.

AP2 - Mechanische und Schwingungsanalyse

Dauer: 01. Juni - 31. September 2021

2.1 Mechanische Analyse

Die verschiedenen Designs wurden mit einer universellen Prüfmaschine (ZwickRoell) untersucht. Hierbei wurde das zuvor etablierte und publizierte Verfahren angewendet³, bei dem ein kreisförmiger Stempel mit einem Durchmesser von 3 mm durch die fixierten Membranen mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min verfahren wurde, während die entgegenwirkende Kraft der Scaffolds aufgenommen wurde. Aus den resultierenden Kraft-/Auslenkungskurven wurden Spannungs-/Dehnungskurven ermittelt, woraus die Biegesteifigkeiten und die Streckgrenzen bestimmt wurden (Abbildung 7A+B). Als Vergleich wurden drei unterschiedliche humane Trommelfelle und Faszien untersucht. Faszien gelten als Goldstandard in der Behandlung chronisch entzündeter Mittelohren. Die Biegesteifigkeit der Scaffolds konnte durch die Hinzunahme des Ringes im Vergleich zu den vorigen Untersuchungen erhöht werden, wie an flachen Scaffolds gezeigt wurde. Der Effekt der radialen und zirkulären Fasern wurde erst signifikant, als auch die konische Form imitiert wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen mit radialen und zirkulären Fasern konnte nicht festgestellt werden. Im Vergleich zum humanen Trommelfell mit $3,5 \pm 1,4 \text{ kPa}$ erreichten die Scaffolds eine bessere Imitation der Biegesteifigkeit als die untersuchten Faszien, bei denen Werte von $25,76 \pm 0,44 \text{ kPa}$ gemessen wurden. Wie zu erwarten war bildeten die Faszien bei der Untersuchung der Streckgrenzen die Trommelfelleigenschaften am besten ab, während die Scaffolds deutlich geringere Streckgrenzen aufwiesen (Abbildung 7C). Dies wurde durch die starken Dickenunterschiede zwischen Faszien mit $300 \mu\text{m}$ und den Scaffolds mit ca. $40 \mu\text{m}$ hervorgerufen. Außerdem sollten die PCL-Fasern lediglich ein Gerüst darstellen, welches idealerweise schnell von Zellen überwachsen wird und dass sich neu bildende Gewebe mechanisch nur unterstützt.

Abschließend konnte die Biegesteifigkeit der Scaffolds durch die Hinzunahme des elektrogenesponnenen Kollagens signifikant gesteigert und die Lücke zum Trommelfell nahezu geschlossen werden.

³von Witzleben, M., Stoppe, T., Ahlfeld, T., Bernhardt, A., Polk, M.-L., Bornitz, M., Neudert, M., Gelinsky, M., (2021), Biometric Tympanic Membrane Replacement Made by Melt Electrowriting. *Adv. Healthcare Mater.* 7, 10, 2002089. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002089>

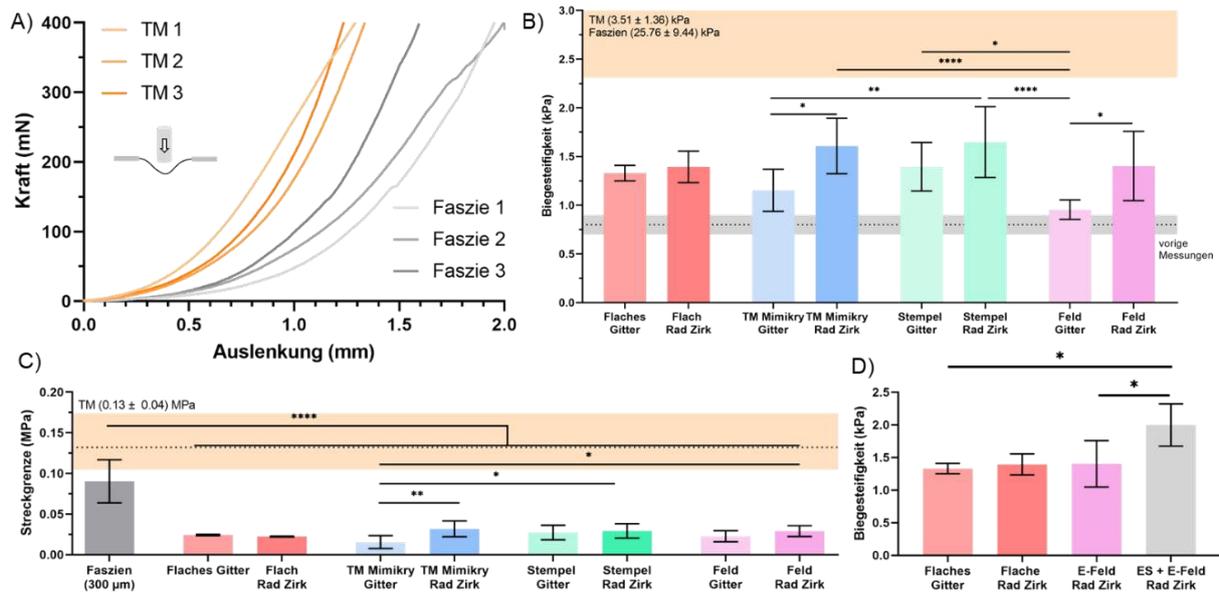


Abbildung 7: Darstellung des Messprinzips (A) und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften. Die fixierten Scaffolds wurden mit dem Konus nach unten zeigend eingespannt und dann mit einem Stempel ausgenickt, während die entgegenwirkende Kraft aufgenommen wurde, welches hier für drei verschiedene humane Trommelfelle und Faszien gezeigt ist (A). Die daraus messbare Biegesteifigkeit der synthetischen Strukturen ist abhängig vom Design (aufgezeigt in B); das gleiche gilt für die Streckgrenze (C). Das Einbringen der elektrogesponnenen Kollagenfasern verstärkte die mechanischen Eigenschaften signifikant (D); (n= 5; bis auf TM und Faszie).

2.2 Akustische Analyse

Mittels des Versuchsstands wurden die Schallübertragungsfunktionen feuchter Scaffolds gemessen (Abbildung 8A). Der Versuchsstand wurde für Proben mit einem effektiven Durchmesser von 8 mm (plus ca. 2-3 mm für die Einspannung) ausgelegt. Die Proben hatten in der Regel einen Gesamtdurchmesser von 11 mm. Für die dynamischen Schwingungsanalysen wurden die Proben mit einem multisinusförmigen Signal im Frequenzbereich zwischen 100 Hz und 5 kHz bei einem Schalldruckpegel von ca. 90 dB SPL angeregt. Dafür wurde ein Einsteckhörer als Schallgeber verwendet. Die Sonde eines Messmikrofons wurde etwa 1 mm vor der Mitte der Membran platziert, um den anliegenden Schalldruck zu messen. Um die Schwingung der Probe zu charakterisieren, wurde die Schwinggeschwindigkeit mit einem Laser-Doppler-Vibrometer (LDV) (CLV 700, CLV 1000 mit den Modulen M300L, M100, M010 sowie M003, Polytec, Deutschland) gemessen und anschließend mathematisch integriert, um die Auslenkung zu erhalten. Zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden Glaskugeln an der Messstelle (Mittelpunkt der Proben) aufgebracht. Für das dynamische Schwingungsverhalten der Proben erhielt man somit eine Übertragungsfunktion als Auslenkung des Probenmittelpunktes in Abhängigkeit zum Anregungsschalldruck. Diese Übertragungsfunktion wird als Amplitude über die Frequenz dargestellt.

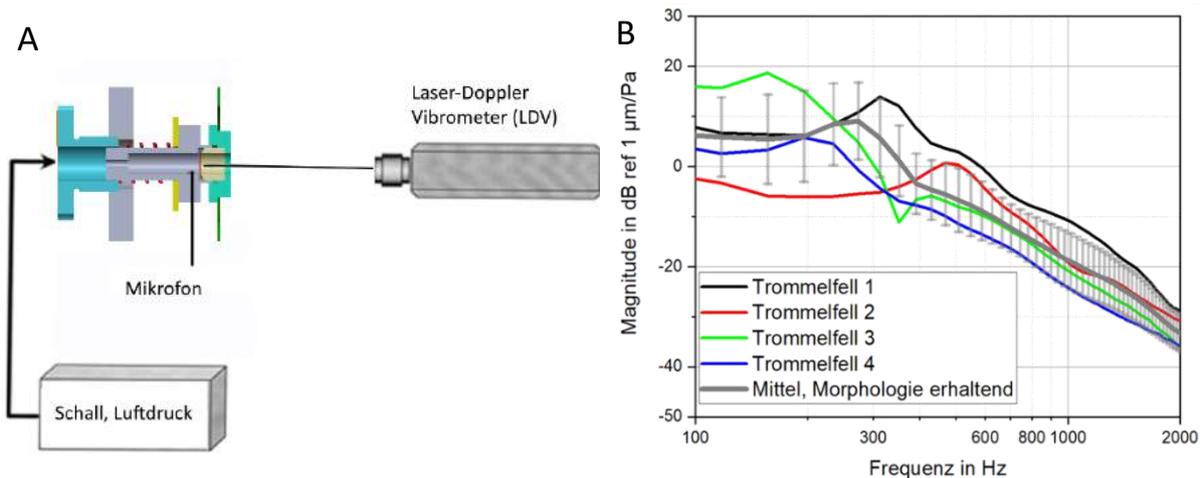


Abbildung 8: Setup für Messungen im Messstand (A): Schallgeber: Einsteckhörer ER-2, Mikrofon: Sondenmikrofon Etymotic ER-7C (inkl. Vorverstärker), Laser Doppler Vibrometer (LDV) von Polytec GmbH CLV 700 mit Controller CLV 1000 und den Modulen M300L, M100, M010 sowie M003. Einzelmessung und Mittelung humaner Trommelfelle (B; n=4) ohne Malleus im Messstand als Referenz für die MEW-Scaffold. Die Kurvenmorphologie der gemittelten Kurve wurde durch einen Algorithmus nach (Gladine 2018⁴) erhalten.

Bei den Schwingungs-Tests wurden die experimentellen Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5$) für jeden Probentyp erfasst. Die Messungen wurden dreimal für jede Probe durchgeführt. Dabei wurde die Probe jedes Mal neu eingespannt, mit einer Rotation zur vorherigen Messung, um die Einflüsse von Positionierung und Einspannung zu minimieren. Die Proben wurden mit der Klemmteil-Baugruppe und dem Stellrad fixiert. Die aufgebrachte Fixierkraft war die Summe aus dem Gewicht der Klemmteile und einer zusätzlichen Spannkraft, die durch ein Stellrad gesteuert wurde. Die gesamte Fixierkraft wurde durch die Radialspannung definiert, die durch den Fixiermechanismus am Probenrand verursacht wurde. Da die Radialspannung einen starken Einfluss auf die akustischen Schwingungen hatte, war es notwendig, für alle Untersuchungen den gleichen Wert einzuhalten. Die Radialspannung wurde mit Dehnungsmessstreifen-Halbbrücken, die an den drei Trägern des Spannmechanismus einer PMMA-Kreisscheibe angebracht wurden, bestimmt, um zunächst die verursachte Dehnung ξ zu messen. Dann konnte die Gesamtbefestigungskraft aus $F_{\text{total}} = 3 \cdot F = 3 \cdot (E \cdot \xi \cdot W/L)$ berechnet werden (E : der E-Modul von PMMA, 3200 MPa; W : der Widerstand des Moments an einem der Balken, 0.002 mm³; L : durchschnittliche Biegelänge, 5.5 mm). Die Größe der Dehnung konnte durch Drehen des Stellrads eingestellt und für alle Versuche auf dem gleichen Wert von 0.0003 gehalten werden. Das Schwingungsverhalten der Scaffolds und der menschlichen Trommelfellmembranen wurden anhand ihrer Schallübertragungsfunktionen verglichen. Die Daten der Trommelfelle stammen aus Vorversuchen. Die erste Resonanzfrequenz der untersuchten humanen Trommelfelle lag im Bereich von ca. 150 bis 470 Hz (Abbildung 8B).

Die Schallübertragungsfunktionen der unterschiedlichen Scaffolds ist in Abbildung 9 gezeigt, wobei die radialen/zirkulären Strukturen direkt mit den Gitter-Strukturen verglichen werden können. Deutlich erkennbar waren die hohen Resonanzfrequenzen der flachen Scaffolds aufgrund der induzierten Spannungen während der Kollagentrocknung. Ebenso wurde die Erhöhung der Biegesteifigkeit durch die Hinzunahme des elektrogenesponnenen Kollagens in der Verschiebung der Resonanzfrequenz um 100 Hz sichtbar. Ein Vergleich der Resonanzfrequenzen mit dem Trommelfell (Abbildung 10) zeigte, dass bis auf die flache Strukturen alle Scaffolds im Bereich des Trommelfells schwingen. Das für das elektrische

⁴ Gladiné K, Dirckx JJJ (2018) Average middle ear frequency response curves with preservation of curve morphology characteristics. *Hearing Research* 363:39–48.

Feld beim MEW-Prozess optimierte Scaffold-Design wies die engste Übereinstimmung mit der mittleren Resonanzfrequenz der Trommelfelle auf, weswegen es für das Bespinnen mit Kollagen ausgewählt wurde. Die signifikant höhere Amplitude der Scaffolds ist für eine mögliche Implantation der Scaffolds nicht relevant, da diese bspw. durch den Bewuchs mit Zellen reduziert werden könnte.

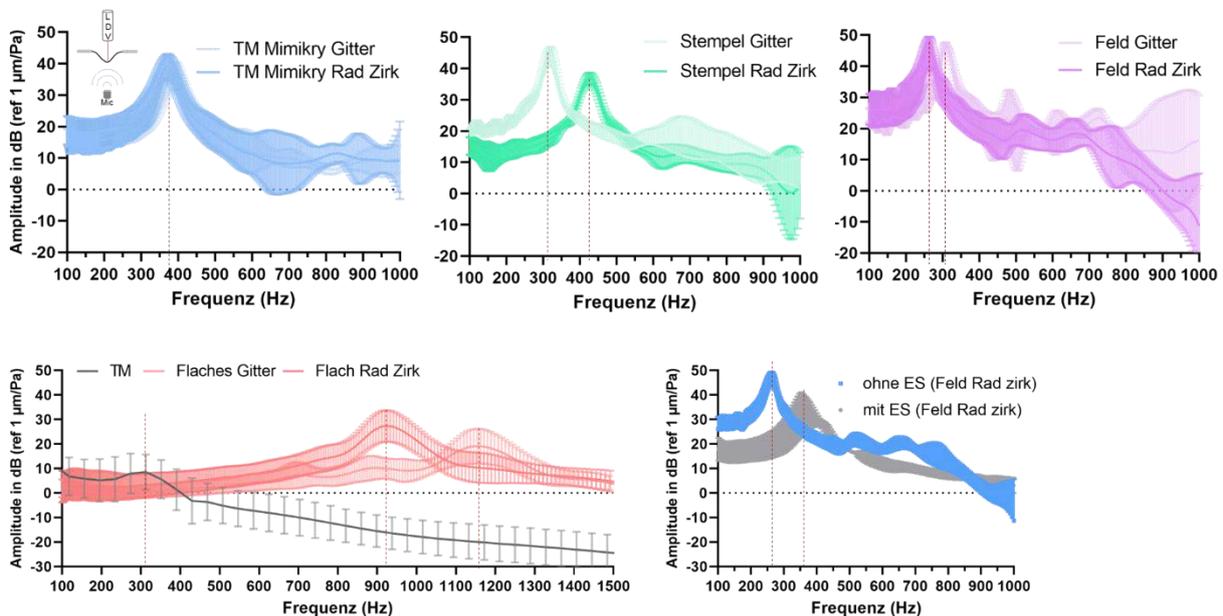


Abbildung 9: Darstellung des Schwingungsverhaltens der unterschiedlichen Designs. Dazu wurde die Amplitude in Abhängigkeit zur Anregungsfrequenz aufgetragen. Deutlich sind die Peaks der ersten Resonanzfrequenz erkennbar.

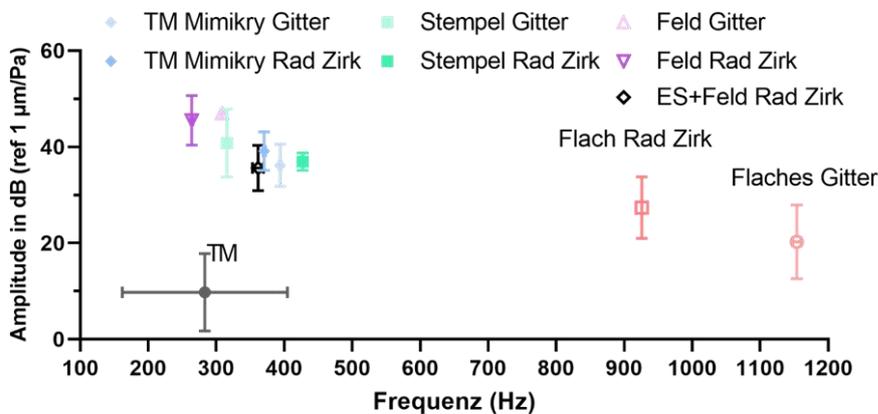


Abbildung 10: Auftragung der ersten Resonanzfrequenz für die unterschiedlichen Designs. Deutlich erkennbar ist die hohe Resonanzfrequenz der flachen Strukturen im Vergleich zu den konischen Strukturen. Der Vergleich mit dem Trommelfell zeigte, dass alle Strukturen im Bereich des Trommelfells schwingen, wobei die Struktur des Feld-Designs mit radialen & zirkulären Fasern die beste Übereinstimmung aufzeigte.

AP3 - Biokompatibilitätsuntersuchung

Dauer: 01. September – 31. Dezember 2021

Bevor die Biokompatibilität der Scaffolds anhand Trommelfell-spezifischer Zelltypen wie den primären Keratinozyten (HEKn) und den primären dermalen Fibroblasten (NHDF) analysiert werden konnte, mussten verschiedene Voruntersuchungen unternommen werden, um eine optimale Co-Kultivierung beider Zelltypen zu gewährleisten. Für eine einfache Handhabung und zur Ermöglichung einer Besiedlung der Scaffolds mit einem Zelltyp pro Scaffoldseite wurden Halterungen mit einem FDM-Drucker (Prusa)

aus Polylactid (PLA) angefertigt. Ein ähnliches kommerzielles Produkt mit dem geeigneten Durchmesser (10 mm) war nicht erhältlich (Abbildung 11A). Die Biokompatibilität dieser Halterungen wurde durch die Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen (hTERT-MSK) in Gegenwart der gedruckten Tools nach 24 h Kultivierungszeit ermittelt und anhand der DNA-Menge quantifiziert. Der Vergleich mit einer Polystrol-Kontrolle, also einer Kultivierung der Zellen ohne zusätzliche Materialproben, und der Kultivierung mit dem kommerziell erhältlichen Referenzprodukt, zeigte eine vergleichbare Biokompatibilität, sodass die Halterungen für die weiteren Untersuchungen verwendet werden konnten.

Da HEK_n und NHDF unterschiedliche Kultivierungsmedien für ein optimales Wachstum benötigen, musste in einem nächsten Schritt ein Medium entwickelt werden, in welchem beide Zelltypen proliferieren. Hierzu wurde dem HEK_n-Medium (KBM Gold, Lonza) 2 %, 5 % und 10 % fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt, welches eine notwendige Zutat für das Überleben der NHDF darstellt. Das Zellwachstum von NHDF mit den verschiedenen FCS-Mengen wurde anhand der DNA-Menge an den Tagen 1, 4 und 7 evaluiert (Abbildung 11B). 2% FCS genügte nicht für ein Wachstum der NHDF, wohingegen 10% ein sehr starkes Wachstum bewirkte. Da HEK_n geringere Proliferationsraten aufweisen als NHDF wurde die Zugabe von 5 % FCS als optimal bewertet, um so ein vergleichbares Proliferationsverhalten zu gewährleisten. Die Anwendung von FCS auf HEK_n führte zu einer morphologischen Veränderung der Zellen, aber ohne die Proliferation messbar einzuschränken (Abbildung 11C). Daraufhin wurde für alle weiteren Untersuchungen das HEK_n-Medium mit 5% FCS verwendet.

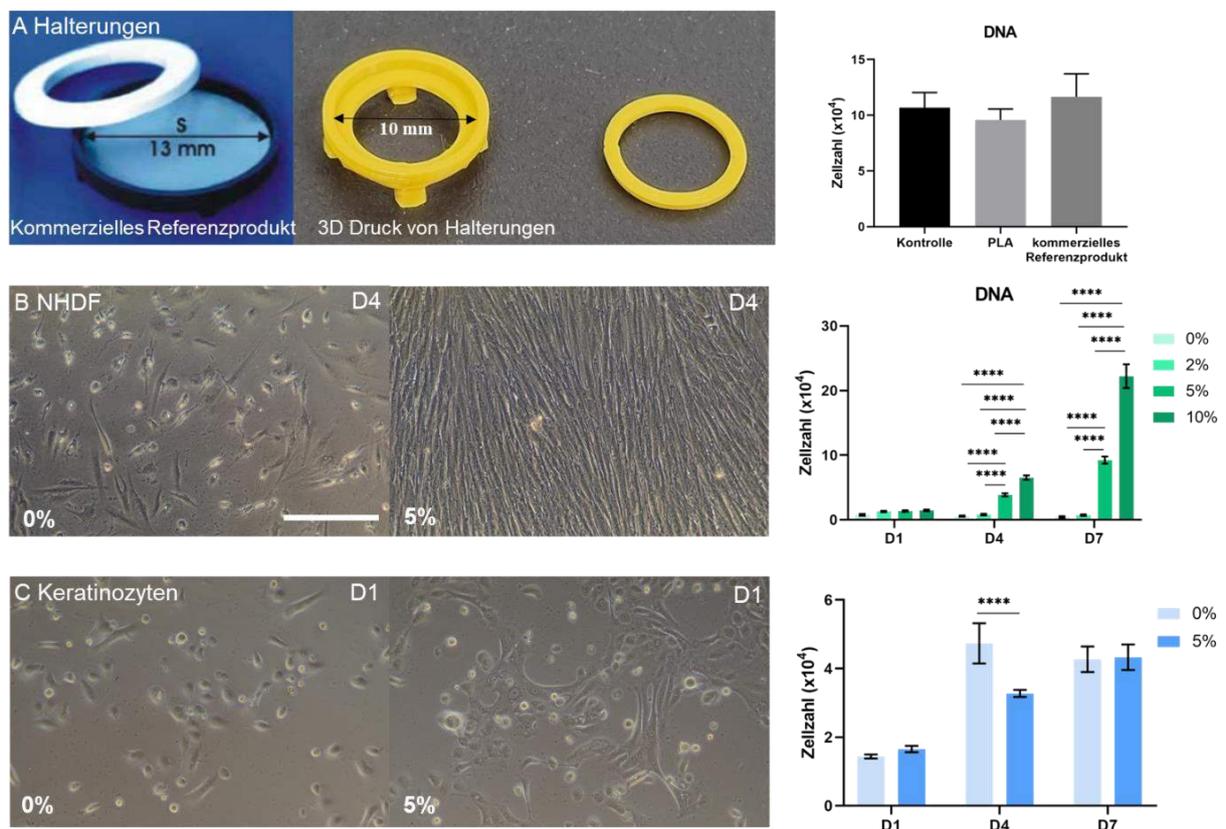


Abbildung 11: Darstellung der Voruntersuchungen zur Co-Kultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten. Aufgrund des geringen Durchmessers benötigten die Scaffolds eigens angefertigte Halterungen, welche mit Hilfe eines einfachen FDM-Druckers aus Polylactid (PLA) hergestellt wurden. Eine zu einem kommerziell erhältlichen Referenzprodukt und einer Polystrol-Kontrolle vergleichbare Biokompatibilität konnte erreicht werden (A). NHDF und HEK_n benötigen separate Kultivierungsmedien für ein optimales Wachstum, für eine Co-Kultivierung musste daher ein Medium zusammengestellt werden, in welchem beide Zellarten wachsen. Hierzu wurde dem HEK_n-Medium fötales Kälberserum (FCS) in unterschiedlichen Mengen zugefügt und der Effekt auf NHDF untersucht (B). Mit einem FCS-Gehalt von 2% und weniger starben die NHDF ab. Daraufhin wurden HEK_n mit einem für NHDF minimalen FCS-Gehalt kultiviert (C). Die Zugabe von FCS in das HEK_n-Medium änderte die Morphologie der Zellen, ohne jedoch deren Proliferation signifikant zu verändern (n=3).

Neben der räumlichen Trennung beider Zelltypen wurden zusätzlich unterschiedliche Zellzahlen im Verhältnis 1:5 verwendet, 5000 NHDF zu 25 000 HEKn pro Scaffold. Dies sollte ein ähnliches Wachstum der Zellen über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen gewährleisten. Des Weiteren wurden die NHDF am Scaffoldrand und die HEKn im Scaffoldzentrum ausgesiedelt, um so eine natürliche Migration der Zellen im Falle einer Implantation zu imitieren. Vor der Co-Kultur wurden zunächst die Monokulturen der NHDF und der HEKn durchgeführt, um die Ergebnisse der Co-Kultur einordnen zu können. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der zweimaligen Kultivierung der NHDF über einen Zeitraum von 14 Tagen dargestellt. Deutlich ist die Migration der Zellen vom Scaffoldrand zur Scaffoldmitte zu erkennen und bereits nach 7 Tagen bildete sich ein dichter Zellrasen (Abbildung 12A+B). Als Fluoreszenz-Färbungen wurden DAPI (blau) für den Zellkern, Phalloidin 488 (grün) für das Aktin-Zytoskelett und eine Antikörper-Färbung des Vimentins (rot) etabliert. Die Färbung des Vimentins ermöglichte die Markierung der NDHF in der Co-Kultur, da Phalloidin eine zellunspezifische Färbung darstellt. Neben den Fluoreszenzfärbungen wurden Rasterelektronenmikroskop (REM) -Aufnahmen der Scaffolds angefertigt, welche die bereits fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene hohe Biokompatibilität untermauerten (Abbildung 12C). Die Bestimmung des Verlaufs der DNA-Menge über den Kultivierungszeitraum verdeutlichte zusätzlich die hohe Biokompatibilität und das schnelle Wachstum der NHDF auf den Scaffolds (Abbildung 12D). Besonders in der zweiten Woche der Kultur nahm die Zellzahl signifikant zu, was auf einen schnellen Einwuchs des Scaffolds im Falle einer Implantation hindeuten könnte.

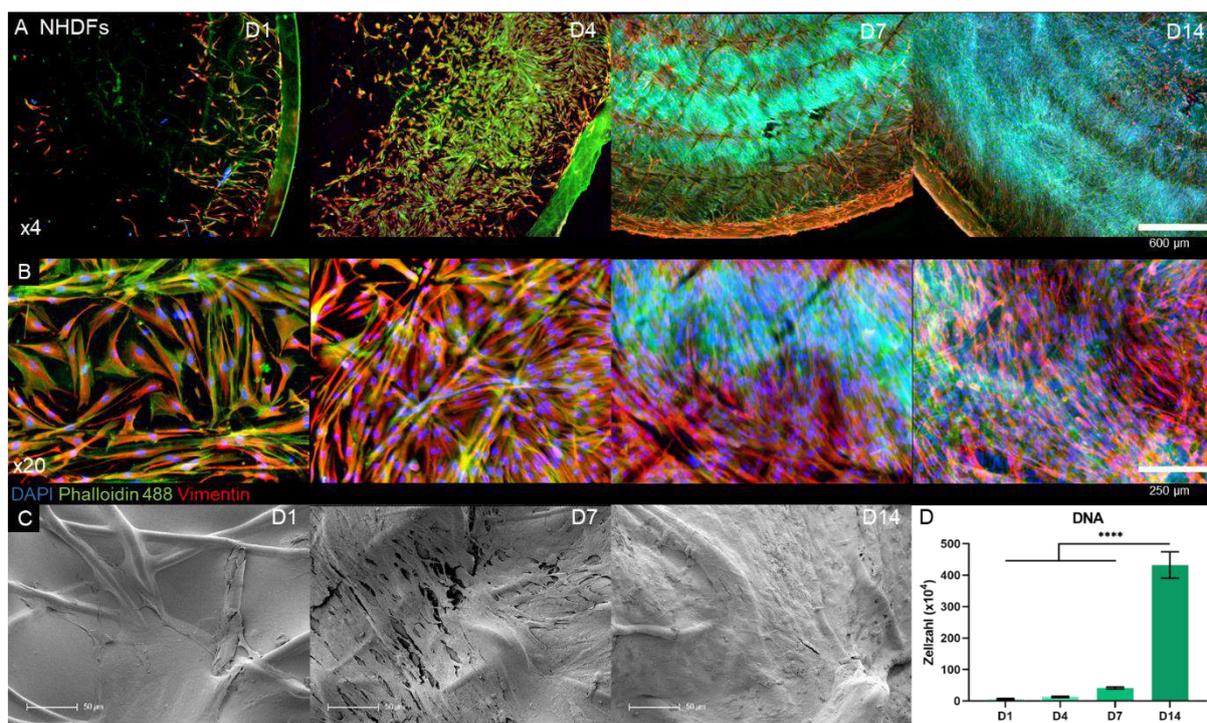


Abbildung 12: Darstellung der Kultivierung primärer, humaner, dermaler Fibroblasten (NHDF) auf den Scaffolds über einen Zeitraum von 14 Tagen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen (A & B) sowie Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (C). Die Zellen wurden am Rand ausgesiedelt, um ein Einwachsen im Falle einer Implantation zu simulieren; deutlich ist der schnelle Bewuchs innerhalb von 7 Tagen zu sehen. Die mikroskopischen Bilder wurden dabei von den Daten einer DNA-Analyse unterstützt (D) (n = 2x3 Scaffolds).

Neben einem schnellen Bewuchs der Scaffolds durch die NHDF war die Menge an exprimiertem Kollagen für die Regeneration des Trommelfells interessant, da dieses maßgeblich aus Kollagen und nur wenigen Zellen besteht. Hierzu wurde eine Sirius Rot Färbung angewendet bei welcher die Menge an gebundenem Sirius Rot direkt mit dem Kollagengehalt der Scaffolds korrelierte (Abbildung 13). Eine

stärkere Färbung bedeutet eine größere Menge an Kollagen. Das gebundene Sirius Rot konnte anschließend gelöst werden und dessen Menge mittels Photometrie bestimmt werden. Insgesamt wurde so eine stetige Zunahme des Kollagengehaltes sichtbar.

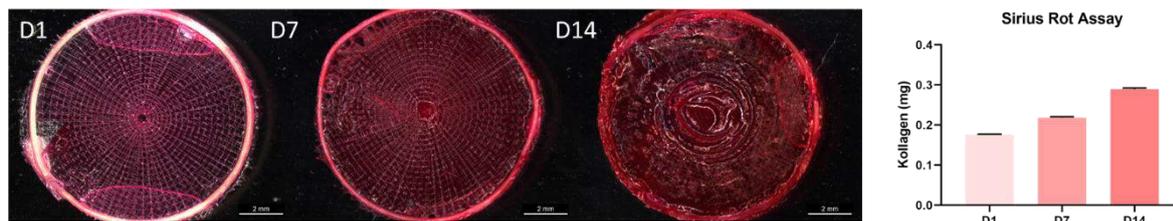


Abbildung 13: Darstellung der Kollagenzunahme über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen anhand einer Sirius Rot-Färbung und anschließender Bestimmung des gefärbten Kollagengehaltes ($n = 2$).

Die Ergebnisse der zweimal durchgeführten Monokultur der HEKn ist in Abbildung 14 dargestellt. Als Fluoreszenzfärbung wurden die Zellkern mit DAPI (blau), das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin 488 (grün) und das Panzytokeratin (rot) gefärbt (Abbildung 14A+B). In den Mikroskop-Aufnahmen wurden der Zellwuchs und die morphologischen Änderungen sichtbar. Im Gegensatz zu den NHDF konnte kein dichter Zellrasen innerhalb der 14 Tage erreicht werden. Dennoch bestätigten die REM-Aufnahmen (Abbildung 14C) und die Quantifizierung des DNA-Gehaltes (Abbildung 14D) einen stetigen Zuwachs der Zellzahlen.

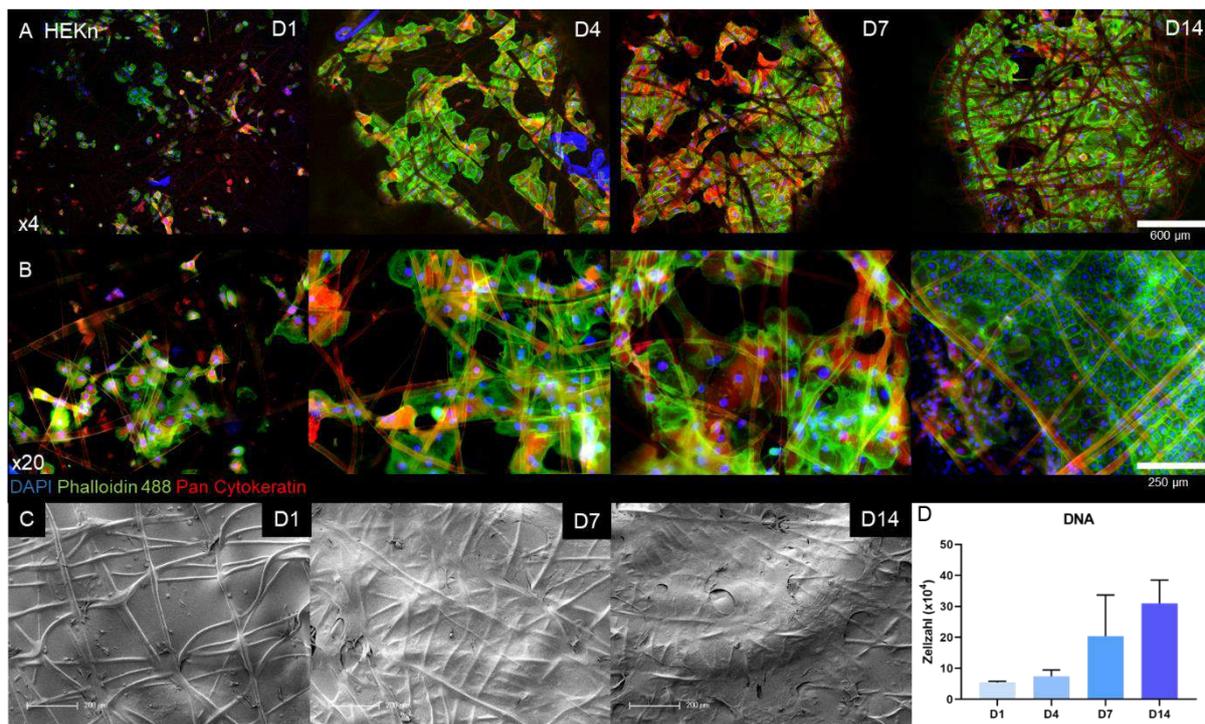


Abbildung 14: Darstellung der Kultivierung primärer, humaner Keratinozyten (HEKn) auf den Scaffolds über einen Zeitraum von 14 Tagen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen (A & B) sowie Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (C). Die Zellen wurden mittig ausgesiedelt, um ein Einwachsen der Keratinozyten im Falle einer Implantation zu simulieren; deutlich ist der schnelle Bewuchs innerhalb von 7 Tagen zu sehen. Die mikroskopischen Bilder wurden dabei von den Daten einer DNA-Analyse unterstützt (D) ($n=2 \times 3$ Scaffolds).

Anschließend an die Monokulturen wurde die Co-Kultur beider Zelltypen zweimal durchgeführt; die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Aufgrund der deutlich geringeren Zunahme der Zellzahlen der HEKn im Vergleich zu den NHDF, wurden die HEKn 48 h eher auf den Scaffolds ausgesiedelt und in

ihrem Medium ohne FCS-Zusatz kultiviert. Nach den ersten 48 h wurden für die Mikroskopie-Aufnahmen NHDF am Scaffoldrand auf der anderen Scaffoldseite ausgebracht. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes sollte abhängig vom Zelltyp erfolgen, weswegen zwei Scaffolds in die gedruckten Halterungen eingebracht und mit einem Trennring aus PLA voneinander separiert wurden. So konnten HEKn und NHDF auf zwei verschiedenen Scaffolds, aber doch in direkter Nachbarschaft ausgebracht werden. Als Tag 1 wurden die 24 h nach der Besiedlung mit den NHDF gewertet. Die Fluoreszenzfärbungen in Abbildung 15 A+B zeigen das Zellwachstum beider Zellarten. Blau stellt die DAPI-Färbung der Zellkerne, grün das Vimentin der NHDF und rot das Panzytokeratin der HEKn dar. Ähnlich zu den Monokulturen war das rasche Zellwachstum der NHDF beobachtbar, welches in der zweiten Woche der Kultur das der HEKn übertraf. Die Analyse der REM-Aufnahmen belegte die hohe Biokompatibilität der Scaffolds weiter und zeigte außerdem, dass innerhalb der ersten vier Kultivierungstage die räumliche Trennung der Zelltypen für die DNA-Bestimmung funktionierte, jedoch ab Tag 7 NHDF auch auf den HEKn-Scaffolds wuchsen. In der Quantifizierung des DNA-Gehaltes der HEKn wurde dies dann anhand der stark zunehmenden Zellzahlen ab Tag 7 deutlich, welche sich signifikant von den Zahlen der Monokultur unterschieden.

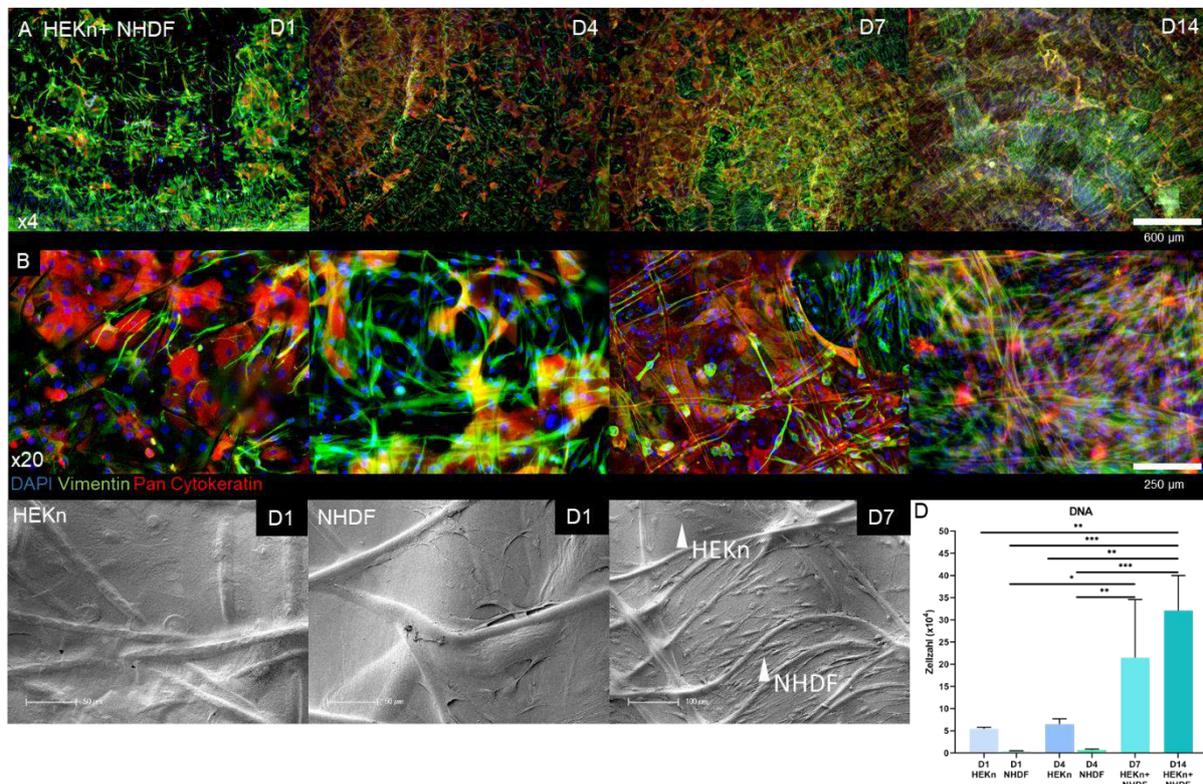


Abbildung 15: Darstellung der Co-Kultivierung von NHDF + HEKn auf den Scaffolds über einen Zeitraum von 14 Tagen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen (A & B) sowie Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen (C). Hierzu wurden die HEKn zwei Tage vor den NHDF mittig ausgesiedelt. Die NHDF wurden wieder am Rand ausgesät. Deutlich ist der schnelle Bewuchs innerhalb von 7 Tagen zu sehen. Die mikroskopischen Bilder wurden dabei von den Daten einer DNA-Analyse unterstützt (D), wobei die REM-Bilder und die dann-Quantifizierung zeigen, dass die NHDF die HEKn nach einigen Tagen überwuchsen (n=2x3 Scaffolds).

Ein Versuch, eine Co-Kultivierung an der Mediums-Luft Grenze durchzuführen um die HEKn zu differenzieren war erfolglos, da die Zellen abstarben. Aufgrund mehrerer zuvor fehlgeschlagenen Zellkulturversuche der HEKn und des engen Zeitfensters konnte dieser Versuch nicht wiederholt werden.

Abschließend wurde die Biokompatibilität der mit elektrogewebenen Kollagen versehenen Scaffolds untersucht, um eine eventuelle Interaktion der Zellen mit den Kollagen-Nanofasern festzustellen. Hierzu wurden 50.000 NHDF auf den Scaffolds ausgebracht und über 14 Tage kultiviert. Die Ergebnisse

sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und die Aktin-Zytoskelette mit Phalloidin 488 (grün) gefärbt. Auch hier bildeten sich innerhalb von 7 Tagen ein dichter Zellrasen. Nach 14 Tagen waren beide Seiten des Scaffolds dicht bewachsen, wie auch die REM-Aufnahmen zeigen (Abbildung 16C). Zusätzlich konnte wieder eine Zunahme des DNA-Gehaltes über den gesamten Zeitraum gemessen werden. Morphologische Unterschiede der Zellen zwischen Scaffolds mit und ohne elektrogenesponener Kollagenschicht konnten nicht festgestellt werden. Es wird vermutet, dass die Kollagenbeschichtung eine direkte Zellinteraktion mit den elektrogenesponenen Fasern verhinderte.

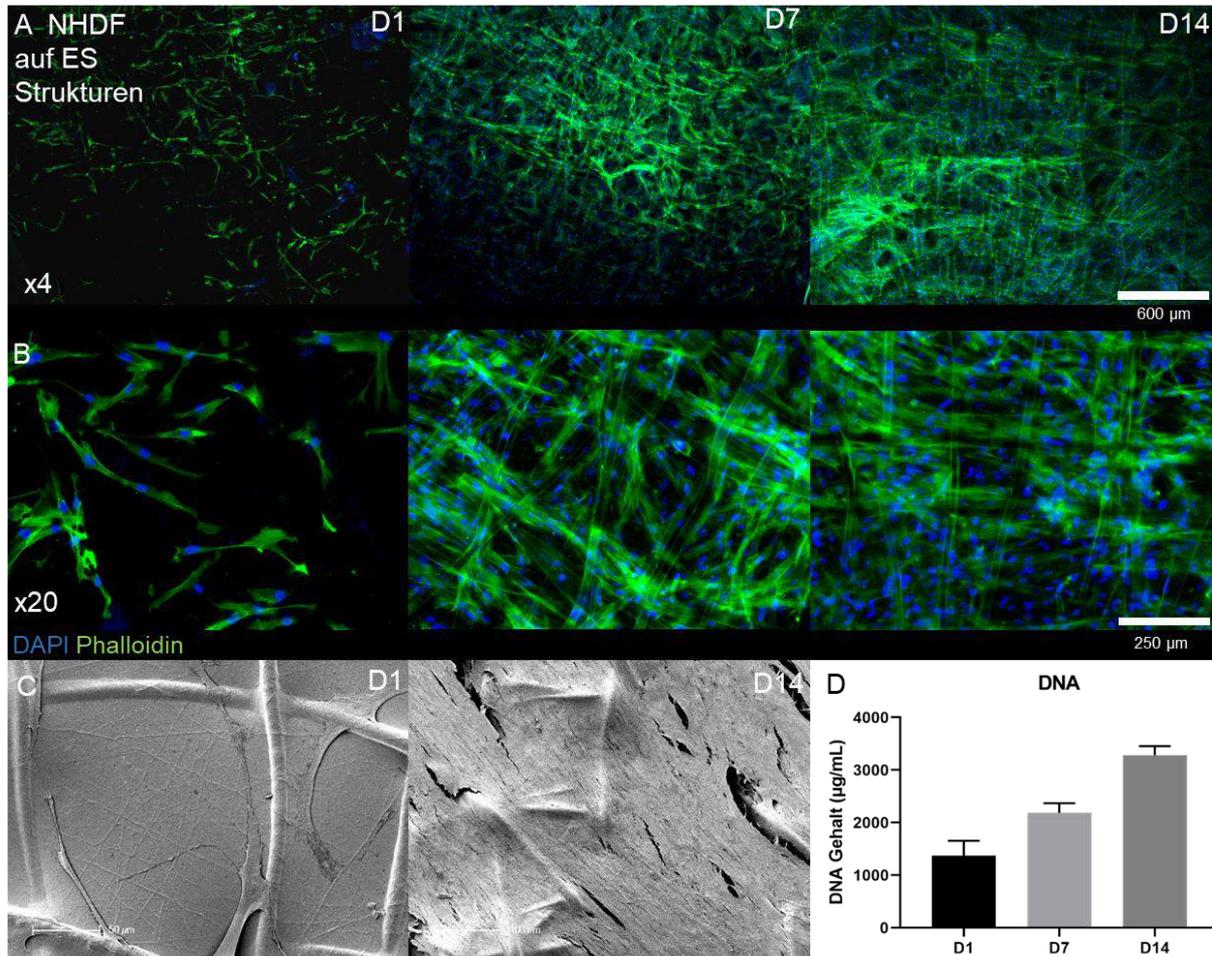


Abbildung 16: Darstellung des Wachstums von NHDF auf den Scaffolds mit elektrogenesponenem Kollagen über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen. Auch hier bildeten die NHDF einen Monolayer innerhalb der ersten 7 Tage. Ein zytotoxischer Effekt der elektrogenesponenen Kollagenfasern aufgrund der Essigsäure konnte innerhalb der 14 Tage nicht beobachtet werden, da der DNA-Gehalt stetig zunahm (D). Im Gegenteil, die Zellen nutzen die zusätzliche Nanofaserstruktur als Ankerpunkt (C, D1).

AP4 - Verwendbarkeit unter medizinischen Gesichtspunkten

Dauer: 01. November 2021 – 31. Januar 2022

4.1 Definition der operativen Randbedingungen und Anforderungen

Anforderungen und Randbedingungen bei der intraoperativen Handhabung sind vor allem Schneidbarkeit, Bearbeitbarkeit/Flexibilität und Stabilität bei normaler Handhabung mit regulärem Instrumentarium. Die dabei erarbeiteten präzisierten Anforderungen sind ausführlich in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Operative Randbedingungen und Anforderungen an biomimetische Trommelfellimplantate

Anforderungen	Beschreibung
Manuelle Greifbarkeit	<ul style="list-style-type: none">mit Nadel/spitzes Häkchen aufspießen, mit Sauger positionieren/orientieren (ohne eingesaugt zu werden)
Reißfestigkeit	<ul style="list-style-type: none">kein unkontrolliertes Einreisen beim Greifen, Schneiden, Positionieren
Vorgegebene Orientierung	<ul style="list-style-type: none">der Konus der Scaffolds muss mit der Gehörknöchelkette verbunden werden
Formstabilität	<ul style="list-style-type: none">passives Verhalten, lässt sich beliebig formen und bleibt in der gewünschten Form. Darf nicht schrumpfen oder quellen (vgl. Faszie)
Schneidbarkeit (Skalpell oder OP-Schere)	<ul style="list-style-type: none">Material muss schneidbar sein um patienten-/defektspezifisch intraoperativ anpassbar zu sein
Befestigung (Wasseradhäsion)	<ul style="list-style-type: none">Befestigung mittels Wasseradhäsion/Gewebekontakt (Gehörgangknochen)
Dicke	<ul style="list-style-type: none">einstellbare Dicke von Vorteil (vgl. Knorpel); mehrere Dicken zur Auswahl
Konische Form	<ul style="list-style-type: none">nur im Falle eines Volldefektes notwendig
Hammer-Ankopplung	<ul style="list-style-type: none">zur Orientierung des Scaffolds im Gehörgang und für eine gute Schallübertragung ist eine gute Ankopplung der Scaffolds an den Hammer notwendig
Prothesenkopplung	<ul style="list-style-type: none">falls am Patienten zusätzlich eine Prothese zum Einsatz kommt, sollten die Scaffolds ebenso an diese ankopplbar sein
Zeiteinsparung	<ul style="list-style-type: none">eine Operationszeit von ca. 15 min für die Trommelfellrekonstruktion wäre wünschenswert, um so im Vergleich zur Verwendung von autologem Gewebe Zeit zu sparen

Insgesamt genügten die optimierten Scaffolds allen Randbedingungen und zeigten eine gute Handhabbarkeit, Schneidbarkeit sowie Bearbeitbarkeit bei normaler Handhabung mit regulärem Instrumentarium.

4.2 Initiale Risikoanalyse

Entsprechend der Medizinprodukterichtlinie ist sicherzustellen, dass ein Medizinprodukt unter den definierten Anwendungsbedingungen die spezifizierten Leistungsmerkmale erreicht und dass das Risiko für Patienten, Anwender und Dritte so gering wie möglich gehalten wird. Für das Trommelfellimplantat wurde eine initiale Risikoanalyse durchgeführt, um mögliche Probleme im späteren Einsatz zu identifizieren und mit zielgerichteten Maßnahmen hinsichtlich der Designauslegung zu adressieren. In der initialen Risikoanalyse wurden nur die wichtigsten Risiken berücksichtigt und in Tabelle 2 aufgeführt. Das aktuelle optimierte Design weist keine Risiken auf, die nicht akzeptabel sind. Durch weitere Maßnahmen bzw. Änderungen am Design könnte das Risiko in einigen Punkten weiter reduziert werden., ggf. wären Neubewertungen notwendig. Relevante Maßnahmen und Designänderungen wären u.a. Änderungen der Form und Stützstruktur, zusätzliche Funktionselemente zur Ankopplung für Mittelohr-Prothesen oder lokale Verstärkung der Schichtdicke

Tabelle 2: Initiale Risikoanalyse --- Identifikation und Analyse (Schweregrad des Schadens S1-S5 (sehr gering, gering, mittel, hoch, sehr hoch); Auftretenswahrscheinlichkeit W1-W5 (unwahrscheinlich, gering, gelegentlich, häufig, sehr häufig))

Nr. nach Kategorie	Ursache	Gefährdungssituation	mögliche Schäden	Schaden (S1-S5)	Häufigkeit (W1-W5)	Bewertung
Mechanische-/akustische Einflüsse						
1	Druck	→ Steifigkeit der TM-Implantate nicht hoch genug, kein Druckregelmäßigkeit des Mittelohrs	→ Re-perforation/Riss des TM, Funktionsminderung der Schallübertragung der Mittelohr	3	1	Keine Gefährdung
2	Schalldruck	→ Steifigkeit der TM-Implantate zu hoch	→ nicht vollständige Schallübertragung des TM, Funktionsminderung	2	2	weitere Maßnahmen prüfen
Chemische, physikalische und biologische Eigenschaften						
1	Nicht bioinkompatibel	→ Immunreaktion	→ Entzündung im Mittelohr	4	1	Keine Gefährdung
2	Systemische Toxizität	→ Vergiftung des Menschen	→ Verletzung des Gewebes	5	1	Keine Gefährdung
3	Allergische Reaktion	→ Allergischer Schock	→ Allergische Reaktion	5	3	weitere Maßnahmen prüfen
4	Reinfektion	→ nicht sterilisierte Scaffolds	→ Entzündung im Gehörgang; Erneute Operation	4	2	weitere Maßnahmen prüfen
5	Zytotoxizität	→ Kein Bewuchs der Scaffolds	→ Keine Einheilung	3	1	Keine Gefährdung
6	Wechselwirkung mit Medikamenten/Abbauprodukten	→ Beschleunigt den Abbau und Resorption des TM-Implantats	→ Re-perforation/Riss des Trommelfells, Funktionsminderung	3	2	weitere Maßnahmen prüfen
Konstruktion, und Umgebungsbedingungen						
1	Verlust der mechanischen Integrität	→ TM-Implantate nicht leicht befestigt mit Wasseradhäsion, im Betrieb leicht beschädigt	→ Keine Adhäsion des Implantat-Materials, Re-perforation, Funktionsminderung	3	2	weitere Maßnahmen prüfen
2	Falsche Zusammensetzung des Materials	→ Steifigkeit und Dicke der TM-Implantate nicht einstellbar, die TM-Implantate nicht formstabil und nicht schneidbar	→ Verschlechterte Schallübertragung und Funktionsminderung des Trommelfells	2	3	weitere Maßnahmen prüfen
3	Inkompatibilität mit anderen Produkten	→ Schlechte Hammer-Ankoppelung und oder Prothesenkoppelung der biomimetische TF-Implantate	→ Verschlechterte Schallübertragung und Funktionsminderung des Trommelfells	2	3	weitere Maßnahmen prüfen
4	Unzureichende Qualität von Zubehörteilen	→ Schlechte Hammer-Ankoppelung und/oder Prothesenkoppelung der biomimetische TM-Implantate; Verlust der post-operativen mechanischen Integrität	→ Verschlechterte Schallübertragung und Funktionsminderung des Trommelfells	2	2	weitere Maßnahmen prüfen

4.3 Erprobung der Implantate in humanen Felsenbeinpräparaten

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Fähigkeit der synthetischen Strukturen zum Verschluss der Perforation und zur Wiederherstellung des Hörvermögens durch Simulation der TM-Rekonstruktion im Felsenbeinpräparat zu prüfen. Weiterhin war es wichtig, die operative Handhabung der entwickelten (elektrogesponnenen) Membrane möglichst realitätsnah zu testen. Die Untersuchungen unter der Verwendung menschlicher Felsenbeinpräparate entsprach allen relevanten nationalen Vorschriften und institutionellen Richtlinien. Sie wurden in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Eine Stellungnahme der Ethikkommission der TU Dresden liegt vor (Nr. EK59022014).

Der Zugang zur Mittelohrhöhle erfolgte über einen Mastoidzugang und eine erweiterte hintere Tympanotomie (mit Resektion des *nervus facialis* zur besseren Sicht auf die Steigbügel Fußplatte). Der Gehörgang, die Gehörknöchelchen sowie deren Bänder und Sehnen und die Innenohrstrukturen wurden nicht verletzt. In die vordere Seite des knöchernen äußeren Gehörgangs, gegenüber dem TM, wurde ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 1 mm gebohrt. Darüber wurde die Sonde eines Messmikrofons etwa 1-2 mm vor dem TM-Mittelpunkt (Umbo) eingeführt, um den Schalldruck vor der TM zu

messen. Die Schallanregung erfolgte über einen Einsteckkopfhörer im Gehörgang mit einem multisinusförmigen Signal von 0.1-6 kHz bei einem Schalldruckpegel von ca. 90 dB SPL. Eine reflektierende Folie mit einer Größe von ca. 0.5 mm² wurde in der Mitte der Steigbügel Fußplatte platziert, um deren Schwingungsgeschwindigkeit mit einem Laser-Doppler-Vibrometer (LDV) zu messen. Die gemessene Geschwindigkeit wurde mathematisch integriert, um den Schwingungsweg bzw. die Verschiebung der Steigbügel Fußplatte zu erhalten. Die METF (engl. *Middle Ear Transfer Function*) wurde dann bestimmt als Verschiebung der Steigbügel Fußplatte bezogen auf den Anregungsschalldruck vor dem Trommelfell.

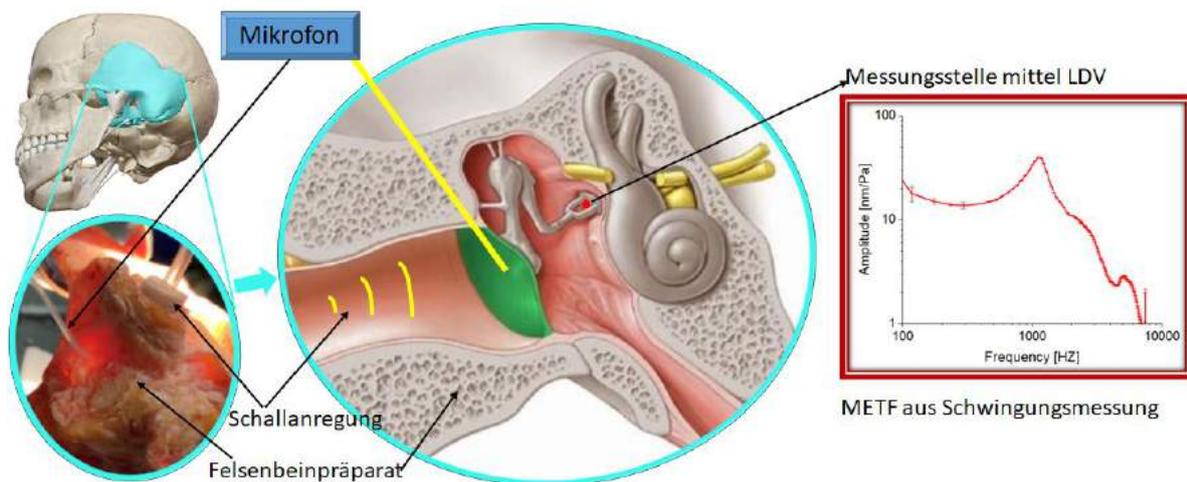


Abbildung 17: Das Schema Messung der Mittelohrübertragungsfunktion (METF) im Felsenbeinpräparat.

Die METF ist die Standard-Messgröße zur funktionellen Beurteilung des Trommelfells und wurde aus statistischen Messungen an menschlichen Felsenbeinpräparate gewonnen. Weiterhin wird es als Standardverfahren zum Nachweis der Wiederherstellung des Hörvermögens für Mittelohrimplantaten verwendet. Sie wurden auch in dieser Studie als Referenz verwendet. Zunächst wurde die METF des Präparates mit intaktem TM gemessen und mit Referenzwerten verglichen, um funktionell abnorme Präparate auszuschließen. Anschließend wurden Defekte mit unterschiedlichem Durchmesser (1 mm, 3 mm und 50 % der TM) im der TM gesetzt, um verschieden große Perforationen zu simulieren (Abbildung 18). Die Kollagen beschichteten PCL Membrane mit radialen/zirkulären Fasern (vgl. Flaches Rad Zirk in Abbildung 19) oder mit einer Gitterstruktur (vgl. Flaches Gitter in Abbildung 19) wurden für den Test ausgewählt. Für jede Perforation wurde die METF gemessen, jeweils ohne und mit Rekonstruktion mit einer Membran.

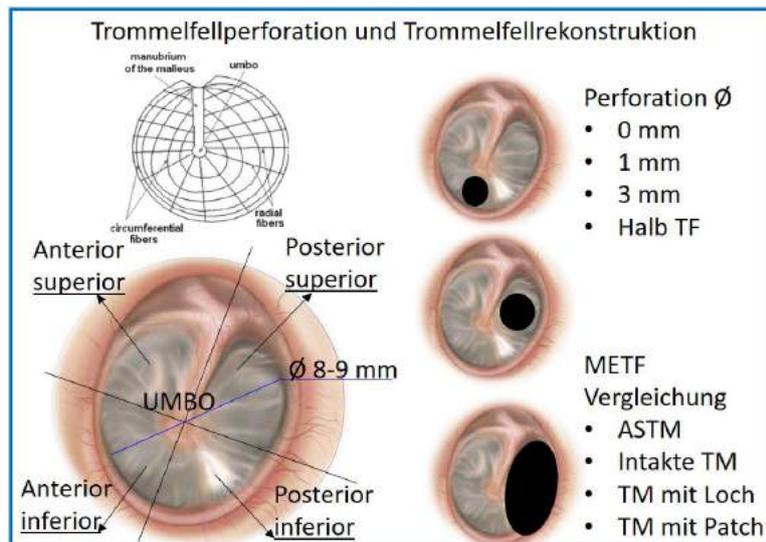


Abbildung 18: Darstellung des Aufbaus der TM und der Perforationsgrößen. Die schematische Faserstruktur des Trommelfells ist links oben gezeigt; ein intakte TM mit Bezeichnung der Quadranten links unten; Lage und Größe der untersuchten TM Perforationen und deren ungefähre Lokalisation ist rechts gezeigt.

Die Perforation des Trommelfells führt abhängig von der Größe zu unterschiedlich ausgeprägten Verlusten der Schwingungsamplitude und ab dem halben perforierten Trommelfell sind ebenfalls Verschiebungen der Resonanzfrequenzen zu beobachten (Abbildung 19). Durch Rekonstruktion von kleinen Perforationen (\varnothing 1-2 mm) mit den Scaffolds konnte das natürliche Schwingungsverhalten nahezu perfekt wiederhergestellt werden (Abbildung 19B). Zwar kommt es mit steigender Perforationsgröße zu wachsenden Abweichungen, jedoch stimmen mindestens die METF des gesamten Testfrequenzbereichs in allen Fällen gut mit dem ASTM-Bereich überein (Abbildung 19BC+D). Die METF bei rekonstruiertem TM war für beide flachen Scaffolds vergleichbar, die Faserstruktur hatte somit keinen Einfluss auf die Rekonstruktion. Die operative Handhabung der Membranen dagegen wurde von den durchführenden Chirurgen als sehr positiv bewertet, da sich das Material nach der Befeuchtung vergleichbar mit dem natürlichen Trommelfell handhaben lässt. Die Membranen waren schneidbar und mit Hilfe von Wasser und Blut über Adhäsion fest mit dem natürlichen Gewebe verbunden.

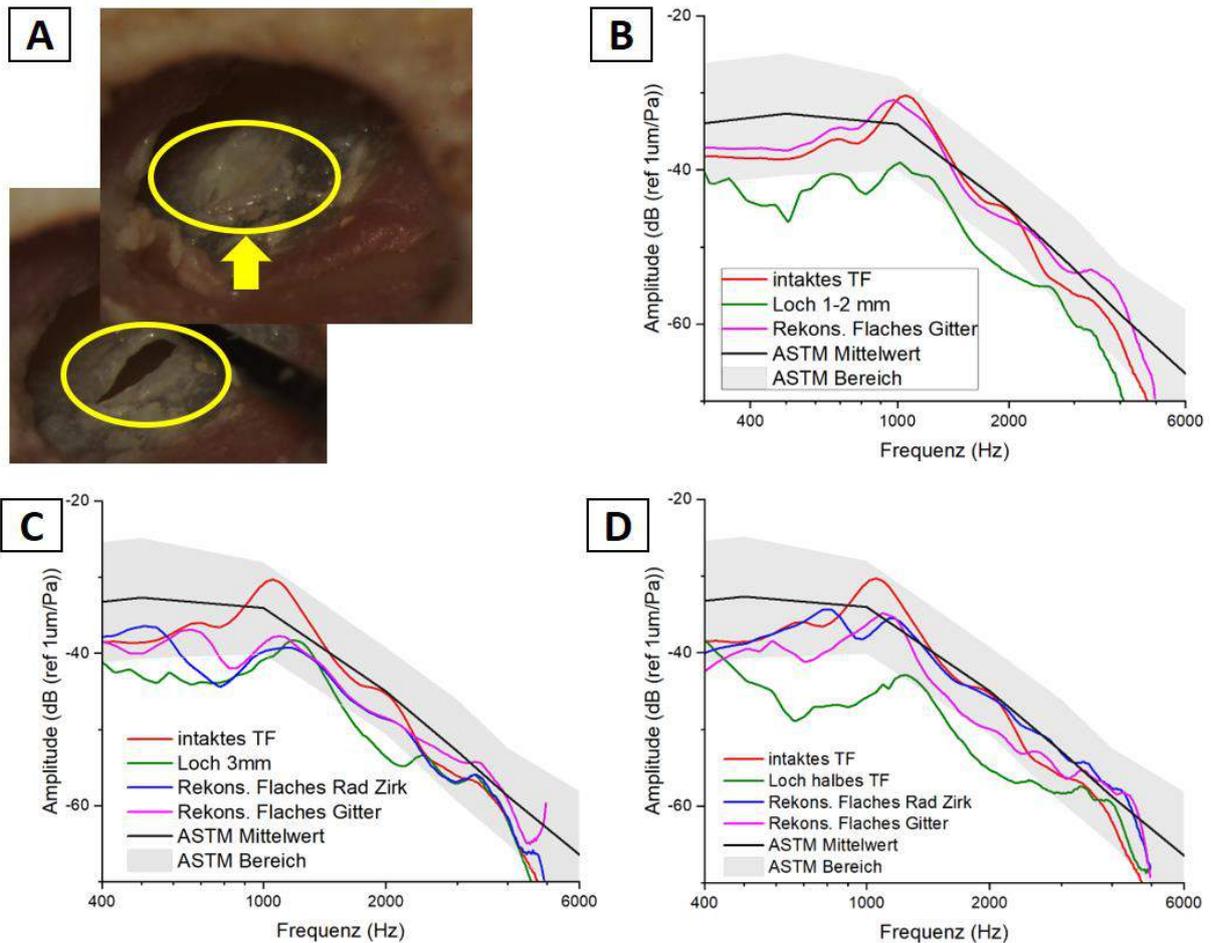


Abbildung 19: Erprobung der Trommelfellimplantate im Felsenbeinpräparat. . A) Trommelfelldefekt und Verschluss mit flachem Scaffold; B-D) Mittelohrübertragungsfunktionen bei intakten, perforierten und rekonstruierten TF für verschieden große TF-Defekte; grau hinterlegt ist der Referenzbereich für normale, intakte Mittelohren (ASTM).

AP5- Dokumentation und Publikation

Die Forschungsarbeit und -ergebnisse wurden auf der Jahrestagung der International Society for Biofabrication (ISBF) 2021 sowie der Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn 2021 einem wissenschaftlich relevanten Publikum vorgestellt. Ein Manuskript zur Publikation der Daten ist in Bearbeitung und wird noch 2022 einem entsprechenden internationalen Journal vorgelegt werden. Des Weiteren wurden die Arbeiten mit dem MaterialVital-Preis 2022 der Initiative ProMatLeben (BMBF und Dechema e.V.) ausgezeichnet, welcher am 31. Mai 2022 überreicht werden wird.

Zusammenfassung der Gegenüberstellung der Ziele mit den Ergebnissen der Arbeitspakete

Rückblickend konnten die im Antrag genannten Arbeitspakete zum allergrößten Teil erfüllt bzw. durch zusätzliche Untersuchungen ergänzt werden. Einzig die Kultivierung der HEKn und NHDF an einer Mediums-Luftgrenze konnte aufgrund mehrerer gescheiterter Kultivierungsversuche der HEKn nicht realisiert werden. Dafür wurden anstatt des zuerst angedachten Designs der Opferstruktur, drei unterschiedliche gefertigt und deren Einflüsse auf die erzeugten Faserstrukturen analysiert. Insgesamt führten die diversen Optimierungsschritte zu einer engeren Imitation der akusto-mechanischen Eigenschaften des Trommelfells. Durch die Hinzunahme von elektrogespinnem Kollagen konnte die Biegesteifigkeit der Scaffolds signifikant, und damit die mechanische Belastbarkeit erhöht werden. Die Schwingungseigenschaften wurden hierdurch leicht negativ beeinflusst, jedoch lag die Erhöhung der Resonanzfrequenz im Schwankungsbereich natürlicher Trommelfelle. Des Weiteren konnte die hohe Biokompatibilität des Lösungsansatzes mit Trommelfell-spezifischen Zelltypen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Verwendbarkeit unter medizinisch relevanten Gesichtspunkten bestätigt werden, wodurch alle Voraussetzungen für einen erfolgreichen operativen Einsatz und gute Regenerationsaussichten gegeben wären.

Arbeitspaket	Ziel	Anpassungen	Ergebnis
AP 1 Herstellung und Optimierung der Scaffolds	Entwicklung und Herstellung biomimetischer Membrane	Untersuchung dreier unterschiedlicher Opferstrukturen; Programmierung des G-Codes	Herstellung unterschiedlicher Membranstrukturen ✓
AP 2 Mechanische- und Schwingungsanalyse	Bestimmung der funktionalen Eigenschaften unter relevanten Randbedingungen	keine	Funktionale Eigenschaften der Implantate im Bereich des humanen Trommelfells ✓
AP 3 Biokompatibilitätsuntersuchungen	Nachweis der Biokompatibilität und des Zellverhaltens	Verzicht auf die Untersuchung an der Mediums-Luft-Grenzfläche bei der Kultivierung von HEKn	Nachweis einer hohen Biokompatibilität von Trommelfellspezifischen Zelltypen auf allen Strukturen ✓
AP 4 Verwendbarkeit unter medizinischen Gesichtspunkten	Verifikation von Handhabbarkeit und Funktionalität unter medizinischen Aspekten	keine	Sicherer Verschluss von TM Perforationen, Wiederherstellung der Schalleitung sowie leichte operative Handhabbarkeit ✓
AP 5 Dokumentation und Publikation	Datenauswertung und Manuskripterstellung	keine	Dokumentation und Veröffentlichung der Ergebnissen auf Konferenz und in Journal ✓