

3D-Drucken von biokompatiblen Hydrogelen

Rainer Stabhuber^{1,2}, Stefanie Sudhop^{1,2}, Hauke Clausen-Schaumann^{1,2} und Alfred Fuchsberger^{1,2}

1) Center for Applied Tissue Engineering and Regenerative Medicine (CANTER), Munich University of Applied Sciences, Lothstr. 34, 80335 Munich, Germany
2) Department of Applied Sciences and Mechatronics, Munich University of Applied Sciences, Lothstr. 34, 80335, Munich, Germany

E-mail: stabhube@hm.edu

Abstract

Beim Tissue Engineering handelt es sich um ein interdisziplinäres Forschungsgebiet in dem Biologen, Mediziner und Ingenieure eng zusammenarbeiten um biokompatible Gewebeersatz herzustellen. Die Aufgaben des dabei erzeugten Gewebes können vielfältiger Natur sein. Denkbar sind der teilweise Ersatz bzw. die Reparatur von menschlichen Gewebestrukturen oder in Zukunft sogar das Ersetzen ganzer Organe. Üblicherweise werden hierzu dreidimensionale Trägergerüste, so genannte Scaffolds hergestellt und diese dann mit Zellen besiedelt um die gewünschte Funktion zu erhalten. In letzter Zeit wird zunehmend auf Bioprinting-Verfahren gesetzt. Bei diesen Verfahren wird auf die Verwendung von Scaffolds verzichtet. Die Zellen werden dabei direkt in ein geeignetes Hydrogel eingebettet und zusammen mit

diesem in die gewünschte dreidimensionale Form gebracht. Dies geschieht mit speziell dafür entwickelten 3D-Druckern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein selbst entwickelter Druckkopf in einen vorhandenen 3D-Drucker integriert und damit dreidimensionale Strukturen aus biokompatiblen Hydrogelen hergestellt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Drucken von biokompatiblen Hydrogel in Kombination mit humanen Zellen untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass ein großer Teil der Zellen den Druckprozess aufgrund der im Druckkopf auftretenden hohen Scherkräfte nicht überlebt. Um dieses Problem zu lösen wird aktuell an der Verbesserung des Druckkopfs und an einer weiteren Optimierung der Hydrogele gearbeitet.

3D-Drucker und Druckprozess

Die Mechanik des Druckers besteht aus einer handelsüblichen 3-Achsen CNC-Mechanik, von welcher der Druckkopf geführt wird. Die Steuerung des Druckers erfolgt mittels eines einfachen G-Code Programms, zu einem späteren Zeitpunkt kann zur Erstellung beliebiger 3D-Strukturen der Drucker über übliche Programme (z. B. Rapix3D) angesteuert werden. Für die vorgenommenen Druckversuche wird ein aus Zentrifugenröhrchen gefertigter Druckkopf verwendet. Zu diesem Zweck wurde an die Unterseite des Zentrifugenröhrchens ein Adapter angebracht, an dem entweder Kanülen oder Pipettenspitzen als eigentliche Druckdüsen montiert werden können (Abb.1). Der Deckel des Röhrchens ist mit einem Druckluftanschluss versehen. Der Druckkopf besitzt keine Ventile, der Start des Druckvorganges erfolgt durch Druckbeaufschlagung des Zentrifugenröhrchens. Beendet wird der Druckvorgang durch einfaches Entlüften. Zur Temperierung des Hydrogels besitzt der Druckkopf eine Heizung (in Abb. 1 ist diese nicht verbaut). Das Ein- sowie Ausschalten des Druckvorganges wird genau wie die Positionierung des Druckkopfes von der CNC-Steuerung übernommen, die Heizung des Druckkopfes wird über einen externen Temperaturregler gesteuert. Je nach Beschaffenheit des verwendeten Hydrogels ist das An- bzw. Abstellen des Druckvorganges binnen 100 - 250 ms möglich. Beim Druck 3-dimensionaler Strukturen werden Vorschubgeschwindigkeiten von bis zu 1500 mm/Minute erreicht (Abb. 2). Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Druckergebnisse, sowie zur einfacheren Erkennung von Problemen beim Druckprozess werden derzeit definierte Würfelstrukturen (Abb. 3) mit einer Kantenlänge von 1cm gedruckt.

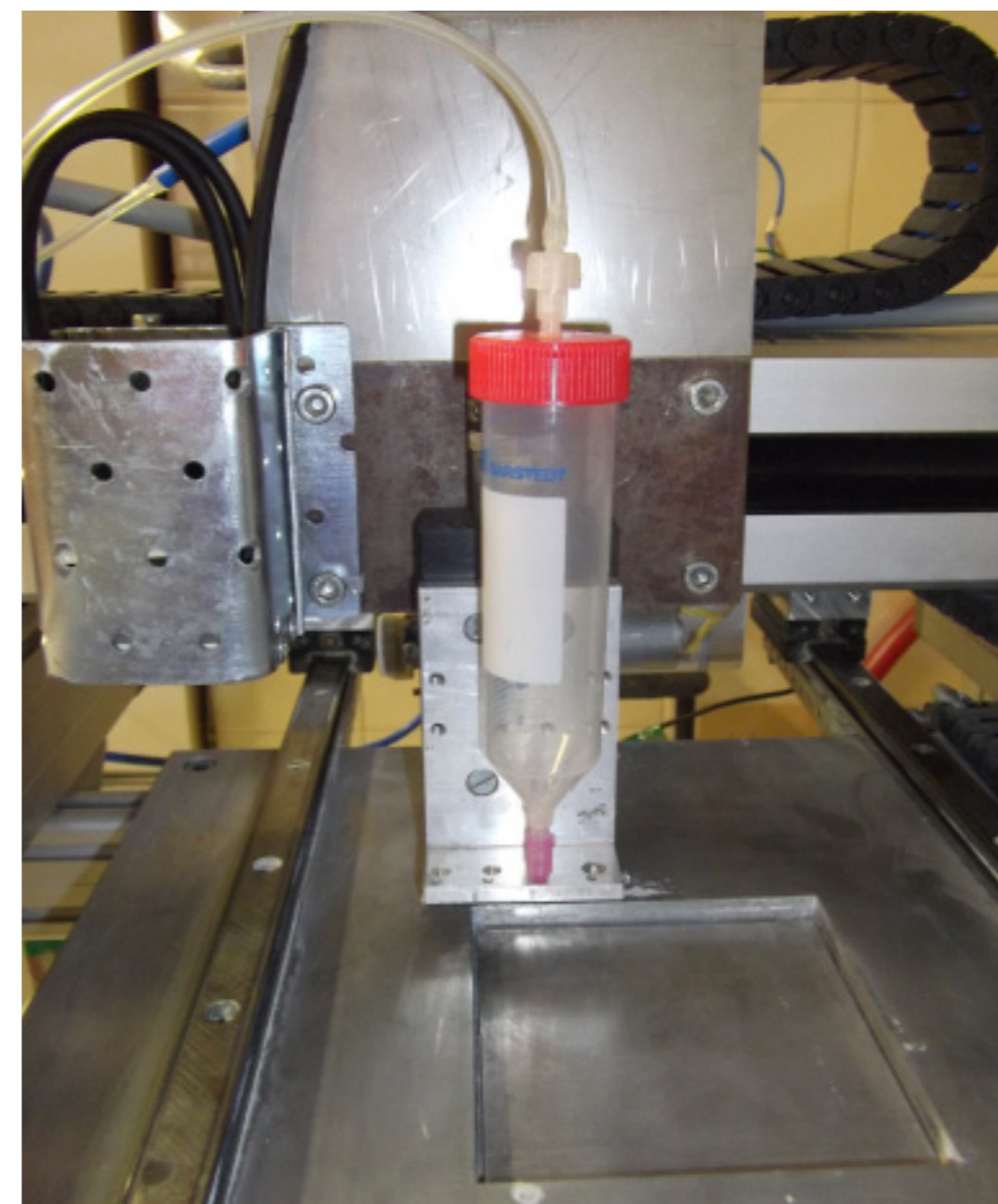


Abb. 1) Druckkopf

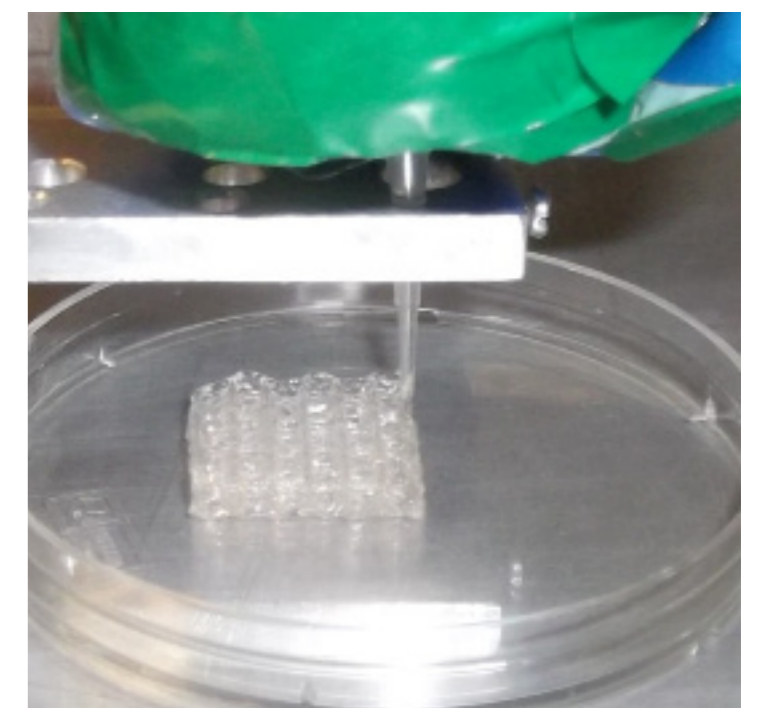


Abb. 2) Druckvorgang

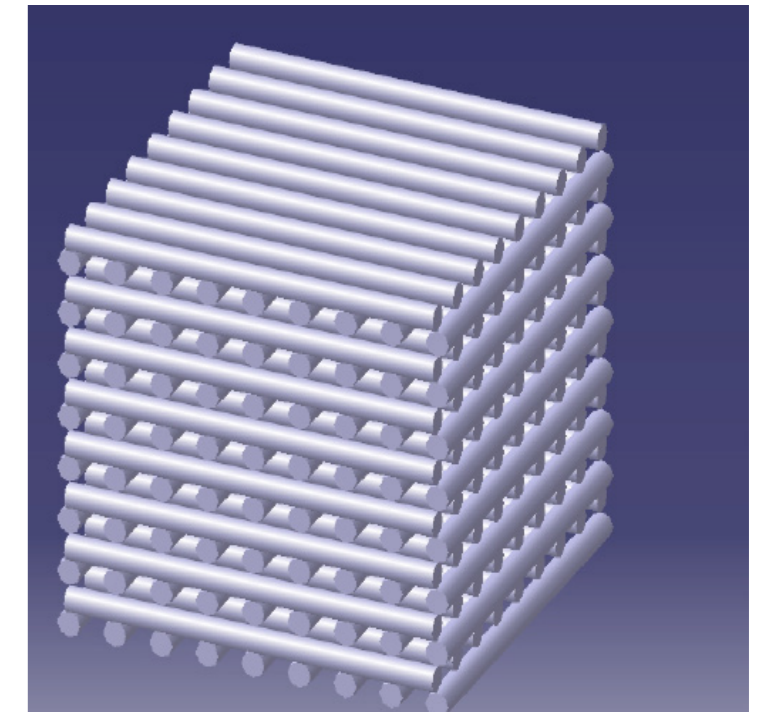


Abb. 3) Würfelstruktur

Druckergebnisse

Das Ziel dieses Bioprinting-Ansatzes ist es, ein biokompatibles Gel, in das humane Zellen eingebettet sind, zu einer definierten 3-dimensionalen Struktur zu verdrucken. Zu diesem Zweck wurden zunächst in einem zellfreien Ansatz verschiedene Gelsysteme getestet. Der Druckversuch mit einem reinen Gelatinegel (20%) scheiterte an dessen Materialeigenschaften: Das Gel härtete während des Druckprozesses aus und verstopfte den Druckkopf. Dagegen erwies sich ein Hydrogel aus 6% Gelatine und 5% Alginat für den exakten Druck dreidimensionaler Strukturen bei Temperaturen um 30°C als sehr gut geeignet. Problematisch war allerdings, dass der Druckvorgang bei hohen Drücken stattfand (1,5-1,25 bar) und so langsam abließ, dass es speziell in den ersten Lagen des gedruckten Objektes zu leicht sichtbaren Austrocknungserscheinungen des Hydrogels kam. Dies konnte durch Zugabe von Pufferlösung auf die untersten Schichten unterbunden werden, was allerdings zum unkontrollierten Aufquellen der Würfelstruktur führte. Durch eine Erhöhung der Drucktemperatur auf 32 °C und eine Beschleunigung des Druckvorganges wurde dieses Problem beseitigt und das Gel konnte direkt in definierten Würfelstrukturen in Kunststoffpetrischalen gedruckt werden (Abb. 4). Im nächsten Schritt wurde das Hydrogel mit humanen, fluoreszenz-markierten Zellen versehen und die gedruckten Würfelstrukturen wurden fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die meisten Zellen aufgrund der hohen Scherkräfte beim Druckvorgang zerstört werden. Es konnte eine große Anzahl an Zelltrümmern nachgewiesen werden, aber nur wenige morphologisch intakte Zellkörper (Abb. 5). Dabei konnte durch Tempe-

raturerhöhung des Hydrogels beim Verdrucken die Anzahl intakter Zellen gesteigert werden. Allerdings nahm gleichzeitig die Qualität der gedruckten Struktur ab.

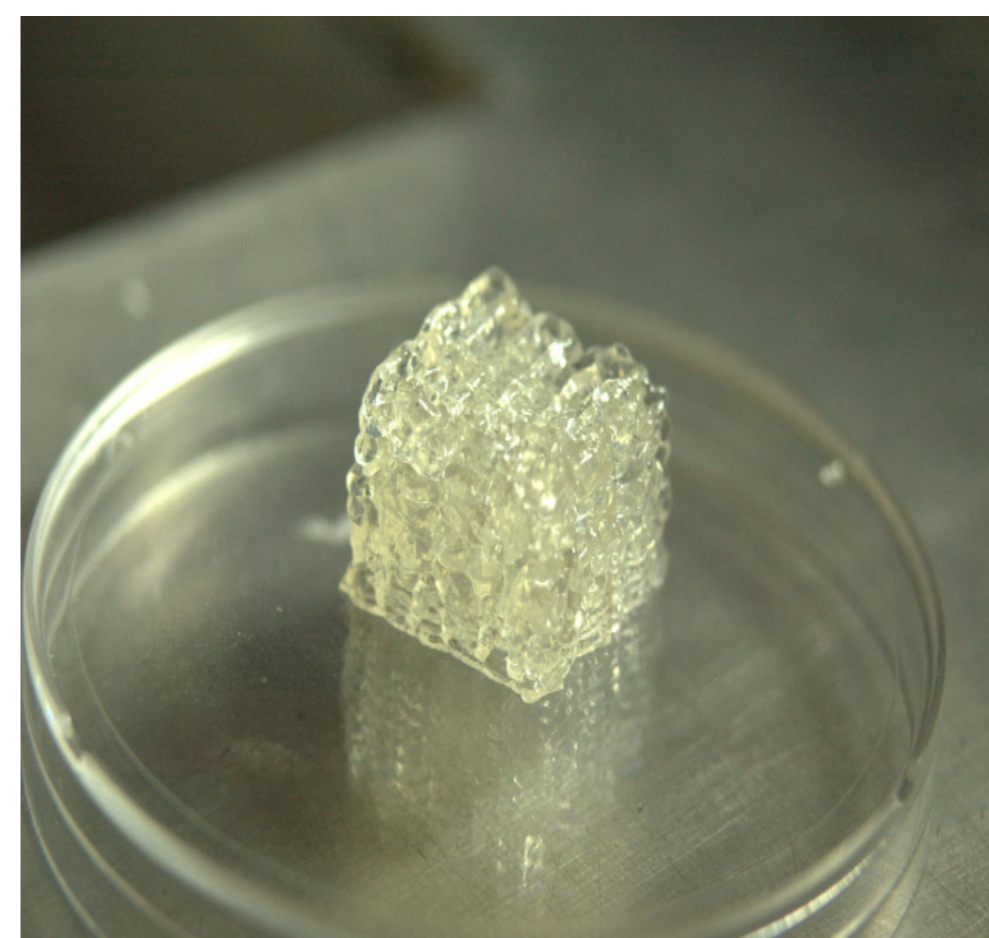


Abb. 4) Würfelstruktur (6% Gelatine/5% Alginat)

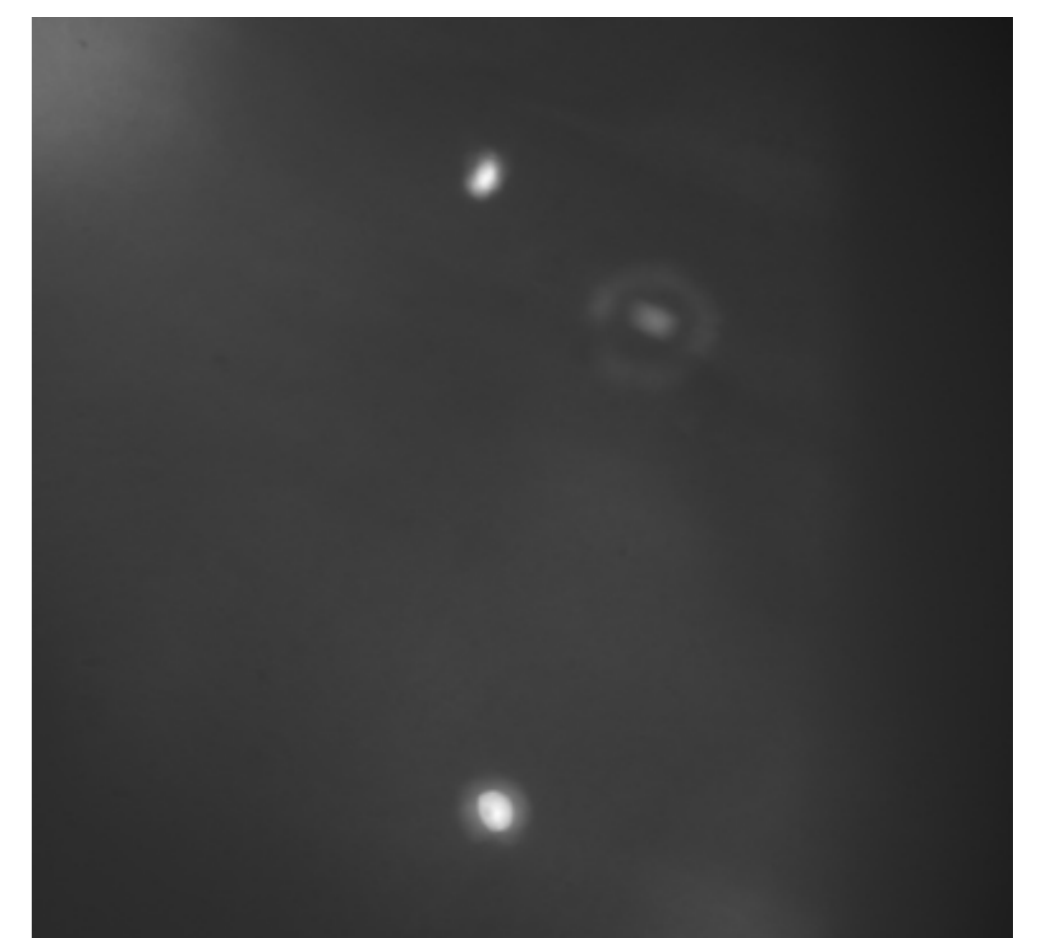


Abb. 5) Zellen nach dem Verdrucken

Ausblick

Die Druckversuche mit dem biokompatiblen Hydrogel liefern sehr gute dreidimensionale Objekte als Ergebnis. Allerdings muss um definierte 3D-Strukturen zu erreichen in einem Temperaturbereich um die 27°C gedruckt werden. Bei diesen niedrigen Temperaturen ist das Gel allerdings so viskos, dass die Belastung durch Scherkräfte auf die Zellen während des Druckvorganges zu hoch ist und dadurch die meisten Zellen zerstört werden. Um dies zu verhindern, muss die Drucktemperatur erhöht werden. Jedoch verschlechtert sich die Formtreue der gedruckten Struktur mit steigender

Temperatur. Versuche mit ansteigender Drucktemperatur zeigen, dass sich die Anzahl intakter Zellen mit zunehmender Temperatur erhöht. Weitergehende Druckversuche müssen durchgeführt werden, um eine optimale Drucktemperatur zu finden, bei der gute dreidimensionale Strukturen entstehen und vor allem die sich im Gel befindlichen Zellen nicht zerstört werden.

References

[1] J. Malda, J. Visser, Ferry P., T. Jüngst, and D. W. Huttmacher. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, 25:5011–5028, 2013.