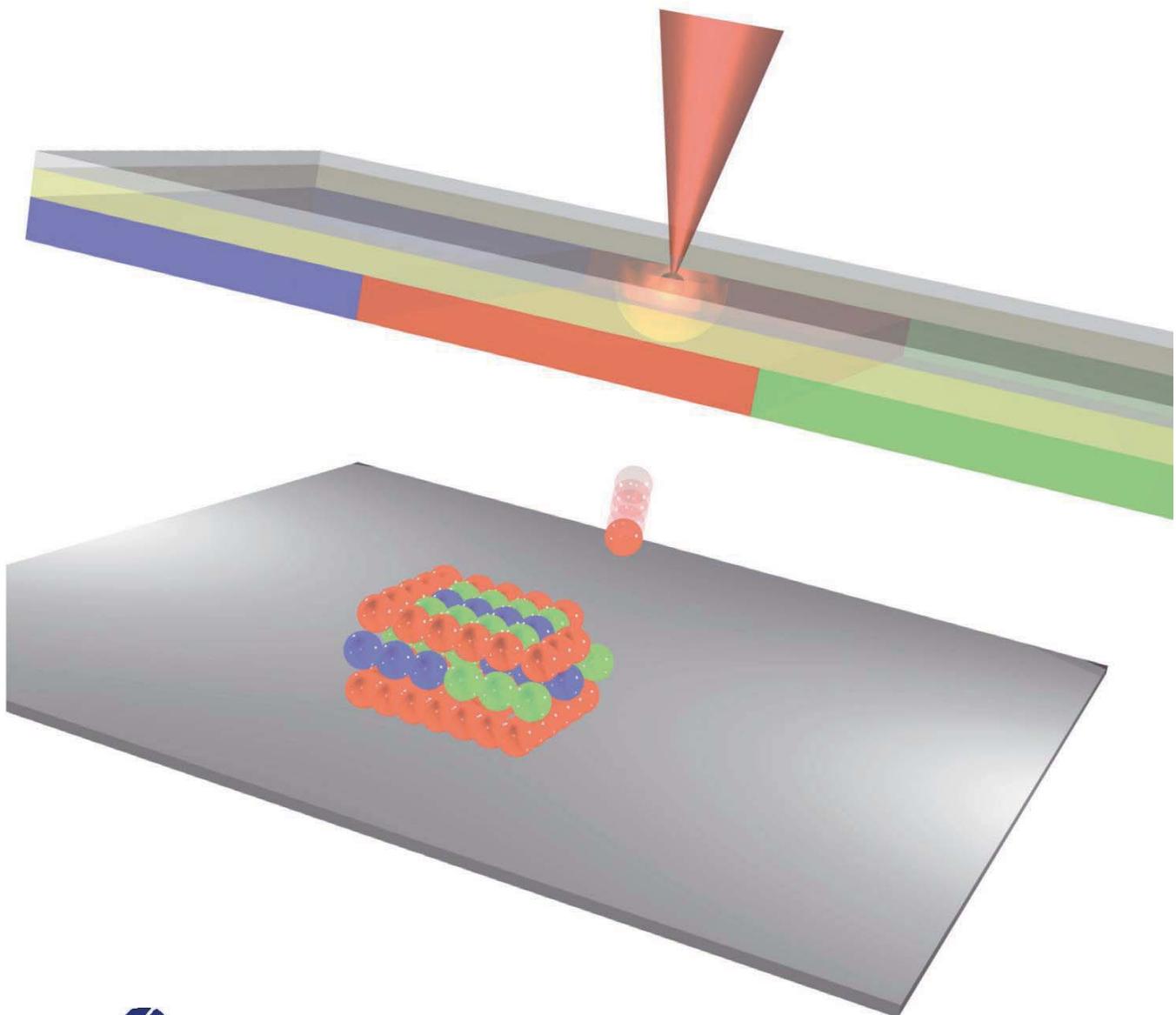


Martin Grüne

Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines laserbasierten Drucksystems für lebende Zellen



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines laserbasierten Drucksystems für lebende Zellen





Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung eines laserbasierten Drucksystems für lebende Zellen

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Ing. Martin Grüne
geboren am 09.05.1977 in Hildesheim

2012



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2012
Zugl.: Hannover, Univ., Diss., 2012

978-3-95404-106-0

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. P. Wriggers

1. Referent: Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing. E.h.mult. Dr.med. h.c. H. Haferkamp

2. Referent: Prof. Dr.-Ing. L. Rissing

3. Referent: Prof. Dr.rer.nat. B. Chichkov

Tag der Promotion: 12.04.2012

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2012

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2012

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-95404-106-0



Inhaltsverzeichnis

Formelzeichen und Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Motivation	1
2 Stand der Wissenschaft und Technik	3
2.1 Drucksysteme für biologische Materialien	3
2.1.1 Tintenstrahldrucker	4
2.1.2 Spritzendrucker	8
2.1.3 Lasertransfer-Drucksysteme	9
2.2 Hydrogele als biologische Träger für Zellen	14
2.2.1 Primäre Komponente	16
2.2.2 Sekundäre Komponente	22
2.2.3 Zusammenfassung der zelltragenden Sole	26
3 Zielsetzung	29
4 Lösungskonzept	31
5 Materialien und Methoden	33
5.1 Erstellung und Charakterisierung der Solschichten	33
5.1.1 Homogenität von Fluidschichten	33
5.1.2 Viskosität und Fließverhalten	34
5.1.3 Oberflächenspannung und Grenzflächenenergie	42
5.2 Entwicklung und experimenteller Aufbau der Drucksystemkomponenten	49
5.2.1 Aufbau des laserbasierten Drucksystems	49
5.2.2 Aufbau des Beschichtungssystems	54
5.2.3 Aufbau der stroboskopischen Prozessvisualisierung	56
6 Ergebnisse und Diskussion	61
6.1 Untersuchung der Einflussparameter des Druckprozesses auf das Übertragungsvolumen	61
6.1.1 Einfluss der Prozessparameter auf das Übertragungsvolumen	61
6.1.2 Untersuchung und Visualisierung der Jetdynamik	63
6.1.3 Einfluss der Soleigenschaften auf das Übertragungsvolumen	70
6.1.4 Diskussion	74
6.2 Untersuchung der Zellschädigung durch den laserbasierten Druckprozess	76
6.2.1 Verwendete Zelltypen	76
6.2.2 Untersuchungsmethoden und Ergebnisse der Zellschädigungsuntersuchung	78



6.2.3	Diskussion	82
6.3	Einsatz des laserbasierten Drucksystems in der Biologie	84
6.3.1	3D monozellulärer Gewebedruck	84
6.3.2	3D multizellulärer Gewebedruck	94
6.3.3	3D Zellarray zur Untersuchung multizellulärer Interaktionen	99
6.3.4	Diskussion	106
7	Zusammenfassung und Ausblick	109
	Literatur	113
A	Liste eigener Veröffentlichungen	125



Kurzzusammenfassung

Mit der Herstellung von autologem Gewebeersatz und vollständigen Organen aus patienteneigenen Zellen wird die Hoffnung verbunden, Leiden therapieren zu können, die derzeit noch unheilbar sind. Allerdings macht die Komplexität von natürlichen Geweben es notwendig, neue technische Methoden zu entwickeln, die eine naturgetreue 3D Kopie der Gewebestörung des Patienten herstellen können. Eine viel versprechende Lösungsmöglichkeit dieses Problems ist die Weiterentwicklung von 3D-Drucktechniken für die Herstellung von autologem Gewebeersatz und lebenden Organen. Für dieses Anwendungsgebiet wurden in den letzten Jahren viele unterschiedliche Drucktechniken adaptiert, unter anderem ein direktes Laserschreibverfahren, das auf dem Laser-induzierten Vorwärtstransfer (LIFT) basiert. Hierbei funktioniert der eigentliche Materialübertrag im Gegensatz zu anderen Drucktechniken dösenfrei, da das Zell-Fluid-Volumen direkt aus einer flüssigen Schicht ausgetrieben wird. Das Zell-Fluid-Gemisch wird dafür vor dem Druckprozess als homogener Film auf einem beschichteten Glaträger aufgetragen, dem sogenannten Donor. Dieser wird planparallel zu einem weiteren Glaträger (Kollektor) befestigt. Für den Übertrag des Zell-Fluides wird ein geringer Bereich der Absorptionsschicht durch den einfallenden Laserpuls verdampft, dadurch bildet sich eine Dampfblase aus, die die Zellfluidschicht lokal ausbeult und beschleunigt. Das Kollabieren der Dampfblase mündet in der Ausbildung eines Fluidjets, der das Zellfluid vom Donor zum Kollektor "fließen" lässt.

Durch den Einsatz von biologischen Fluiden, die in einen gelartigen Zustand mittels geeigneter chemischer oder physikalische Wechselwirkung überführt werden können, sind auch komplexe 3D Zell-Geometrien mit dieser Technik realisierbar.

Diese Arbeit präsentiert die Ergebnisse der Adaptierung der fundamentalen LIFT-Technik für den Zelldruck und die Untersuchung verschiedener Einsatzgebiete dieses Drucksystems. Da wenig über den eigentlichen Übertragungsprozess bekannt war, wurde ein stroboskopischer Kameraaufbau entwickelt, mit dem sich der Jetentstehungsprozess sowie Einflüsse auf das Übertragungsverhalten dokumentieren ließen. Es konnte gezeigt werden, dass sich trotz nichtlinearer Zusammenhänge der Prozessparameter bei Kenntnis der Fluidcharakteristika das Übertragungsvolumen, einhergehend mit den gedruckten Zellmengen, in einem weiten Bereich gezielt variieren ließ. Außerdem konnte anhand der zeitaufgelösten Bildfolgen der Jetübertragung ein theoretisches Modell abgeleitet werden, mit dessen Hilfe auf die Fluidströmungen innerhalb des Jets geschlossen werden konnte.

Durch den nachgewiesenen schädigungsfreien Übertrag unterschiedlicher Zelltypen konnten lebende dreidimensionale mono- und multizelluläre Konstrukte mit dieser Drucktechnik erzeugt werden, die eine Vielzahl neuer in-vitro- und in-vivo-Ansätze eröffneten. Außerdem konnte mit dem gedruckten 3D Zellarray eine neue Methode vorgestellt werden, die die grundlegende Untersuchung von Zell-Zell- und Zell-Umgebungs-Interaktionen einer beliebigen Anzahl unterschiedlicher Zelltypen ermöglicht.

Ein Überblick über die jüngsten Veröffentlichungen im Bereich der laserbasierten Zelldrucksysteme zeigt, dass diese Technik weltweit von einer steigenden Anzahl wissenschaftlicher Arbeitsgruppen verwendet wird.

Aktuell sind im Verlauf dieser Arbeit elf peer-reviewed Publikationen sowie zahlreiche Beiträge auf Fachkonferenzen entstanden.

Schlagwörter: Laser-induzierter Vorwärtstransfer, Zelldruck, Tissue Engineering



Abstract

The biofabrication of autologous tissue substitutes and entire organs raises the hope to cure diseases by patients' own cells that are still beyond remedy. To address this issue the development of new biofabrication methods are required, that are able to generate a 3D blueprint of the patient disorder mimicking the native archetype and tissue formation. One way of solving this technical problem is further development of 3D printing techniques in order to construct required autologous tissue substitutes and living organs. Over the last decade various printing techniques were adapted for this purpose including a laser-based direct write technique based on laser-induced forward transfer (LIFT). Compared to other printing approaches, this printing technique operates orifice-free, since deposition of the cell compound takes place by sheering a tiny cell-fluid volume out of a liquid layer. Therefore, the cell compound was blade-coated as a thin layer on a slide coated with an energy-absorbing material layer, referred as donor-slide, and mounted upside down in the setup facing a second slide (collector-slide). In brief, laser pulses are focussed through the donor-slide onto the energy-absorbing material layer which is evaporated locally at the focal point. This rapid energy deposition leads to the generation of a jet dynamic resulting in the deposition of a tiny volume of cell fluid on the collector-slide.

Even complex 3D cell structures can be realized with this printing technique by using fluids, which are polymerizing under appropriate physical or chemical conditions.

This thesis presents results of work on further development of the fundamental LIFT technique towards a bioprinting system and exploration of various applications of this system. Furthermore, a stroboscopic imaging setup was built up in order to visualize the formation of the jet and influences of process parameters onto the jet, since little was known about the jet dynamic resulting in the deposition of a tiny volume. It could be demonstrated, that the printed droplet volume and cell amounts can be adjusted in a wide range by knowing the fluid characteristics in spite of the fact that there is no linear relationship between the process parameters. Moreover, a theoretical model of the jet formation could be established by means of the time-resolved images, which enables evaluation of critical flow forces inside the jet. After verifying that the laser printing procedure has no negative influence on different printed cell types, living 3D mono- and multicellular constructs were generated by means of this printing technique, open up a wide range of new in-vitro and in-vivo studies. Furthermore, by printing multiple cell types in a 3D array a new biological test platform could be presented, enabling the study of complex and dynamic relationships between cells and their local environment.

An overview of reports on laser-based bioprinters indicates that this technique is constantly gaining wider acceptance and popularity among scientists worldwide. To date, work performed in the framework of this thesis has resulted in more than 11 peer reviewed publications and numerous conference contributions.

Key words: Laser induced forward transfer, cell printing, Tissue engineering



Formelzeichen und Abkürzungen

Formelzeichen

Formelzeichen	Einheit	Beschreibung
τ	N/m ²	Schubspannung
η	Pa*s	Dynamische Viskosität
$\dot{\gamma}$	1/s	Schergeschwindigkeit
λ	10 ⁻⁹ m	Wellenlänge
ν	m ² /s	Kinematische Viskosität
ρ	kg/m ³	Dichte
σ	Nm/m ²	Oberflächenspannung
θ	rad	Kontaktwinkel
ω	rad/s	Winkelgeschwindigkeit
F	N	Kraft
h_{RS}	m	Rakel-Substrat-Abstand
h_S	m	Schichthöhe
M	Nm	Moment
m	g	Masse
n	mol	Stoffmenge
p	Pa	Druck
Re	-	Reynoldszahl
Re_{krit}	-	kritische Reynoldszahl
T	K	Temperatur
v_0	m/s	Vorschub
W	Nm	Arbeit
W_a	Nm/m ²	Adhäsionsarbeit

Abkürzungen

AlginatL	Alginate with low viscosity
AlginatM	Alginate with medium viscosity



ALP	Alkalische Phosphatase
aP2	Adipocyte fatty acid-binding protein
ASC	Adipose-derived stem cells
BMSC	Bone marrow-derived stem cells
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAD	Computer-aided design
CAM	Computer-aided manufacturing
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIJ	Continuous ink-jet
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CX-43	Connexin-43
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOD	Drop on demand
DRL	Dynamic release layer
ECFC	Endothelial colony forming cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GUI	Grafical user interface
HA	Hyaluronsäure
HaCaT	Human adult low calcium high temperature keratinocytes
HE	Hämatoxylin Eosin
KTP	Kaliumtinaylphosphat
LIFT	Laser induced forward transfer
LPL	Lipoprotein Lipase
LY	Luzifer Yellow
MAPLE-DW	Matrix assisted pulse laser evaporation direct write
μJ	Mikrojoule
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
mPa	Millipascal
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Nd:YAG	Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat



NIH3T3	Embryonic fibroblast
ns	Nanosekunden
PDGF	Platelet-derived growth factor
PL	Phospholipid
PLD	Pulsed laser deposition
PPAR- γ 2	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor Gamma-Isoform 2
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standard Deviation (deutsch: Standardabweichung)
SEM	Standard error of mean (deutsch: Standardfehler)
sGAG	Sulfatierte Glycosaminoglycane
TE	Tissue Engineering
TEM ₀₀	Transversal Mode
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTL	Transistor-Transistor-Logik
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vt%	Volumenprozent
wt%	Massenprozent



1 Einleitung

1.1 Klinische Motivation

Mit der regenerativen Medizin verbindet sich die Hoffnung, eines Tages Gewebe- und Organleiden mit patienteneigenen Zellen heilen zu können.

Ihre Ursprünge gehen zurück auf Ross Harrison [1], der 1907 erstmalig *ex-vivo*¹-Untersuchungen an freigelegten embryonalen Nervenfasern durchgeführt hat und somit den Grundstein für die moderne *in-vitro*²-Zellkultur legte.

In den 50er und 60er Jahren wurden erste Versuche unternommen, lebendes Gewebe *in vitro* technisch zu erzeugen und den Gewebeentwicklungsprozess mit Hilfe thermodynamischer Ansätze zu dokumentieren [2]. Bereits in diesen frühen Arbeiten wurde versucht, interdisziplinär mit Methoden aus der Biologie, Medizin, Physik, Chemie und dem Ingenieurwesen "tissue reconstructions" [2] künstlich herzustellen [3–5]. Basierend auf diesen anfänglichen interdisziplinären Arbeiten führten die ersten *in vitro* hergestellten und erfolgreich *in vivo* eingesetzten Gewebekonstrukte [6, 7] Anfang der 80er Jahre zu der Namensgebung dieses Forschungsbereiches, dem sogenannten **Tissue Engineering** (Kurzform: TE).

Das "Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches Grundlagen des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften vereint und für die Herstellung biologischer Implantate einsetzt, die Gewebefunktionen erneuern, bewahren oder verbessern sollen" (deutsche Übersetzung aus [8]).

Der klassische TE-Ansatz, um künstliches Gewebe herzustellen, ist die Aussiedlung von Zellen in einem festen und porösen Zellträger, einem sogenannten Scaffold. Mit scaffold-basierten TE-Ansätzen konnten in den letzten Jahren zahlreiche klinische Gewebeersatztherapien erfolgreich umgesetzt werden, die zwar nicht die Funktionalität von natürlichem Gewebe wiederherstellen konnten, aber durch deren Einsatz die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert wurde. So konnten insbesondere bei der Behandlung von Haut-, Knorpel-, Knochen- und Blasenleiden [9, 10] sehr bemerkenswerte klinische Erfolge mit scaffold-basierten Therapien erzielt werden.

Trotz dieser Erfolge gibt es einige Limitierungen von Scaffold-Ansätzen bei der Herstellung von Geweben, wie z.B. dass

1. natürliches Gewebe aus unterschiedlichen Zelltypen besteht, die innerhalb des dreidimensionalen Gewebes spezifisch angeordnet sind. Diese dreidimensionale Zellverteilung ist innerhalb eines Scaffolds kaum zu realisieren [10].
2. die Besiedelung und das Einwachsen der Zellen in die poröse Scaffoldstruktur nicht effektiv realisiert werden kann, wodurch die Zelldichte innerhalb des Scaffolds sehr gering ist und somit das hergestellte Gewebe *in vitro* Monate zur Ausreifung benötigt [11].

¹ außerhalb des lebenden Organismus

² im Reagenzglas

Durch die Limitierungen dieses Ansatzes ist es kaum möglich, auch nur „einfaches“ [12] Gewebe, wie z.B. Knorpelgewebe, naturgetreu herzustellen. Dies liegt zu einem großen Teil an dem komplexen heterogen zonalen Aufbau (vgl. Abb. 1.1) von natürlichem Gelenkknorpel, denn ein Scaffold mit homogener Materialzusammensetzung (z.B. gleichbleibende Collagenkonzentration) und homogener Zellverteilung stellt noch keinen adäquaten Ersatz für ein derart komplexes heterogenes Gefüge wie Gelenkknorpel dar.

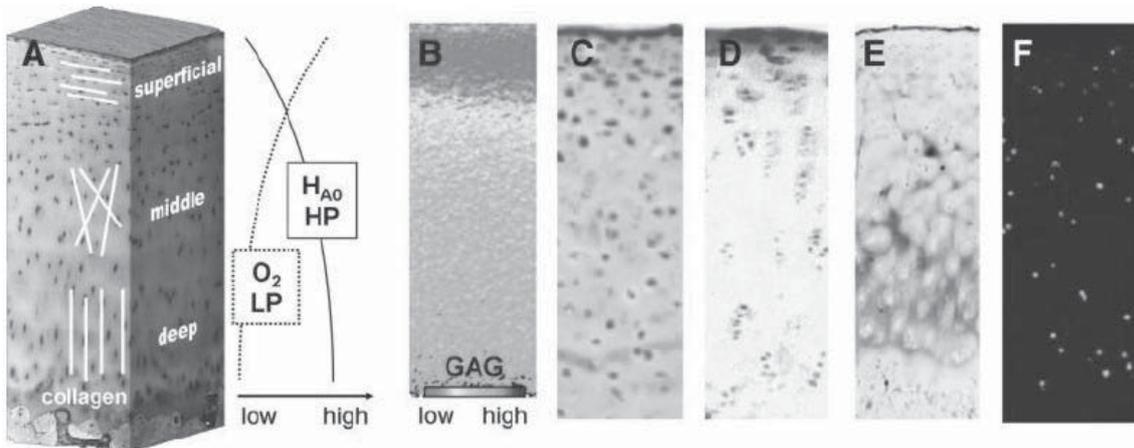


Abbildung 1.1: Aufbau von natürlichem Gelenkknorpel mit zonaler Variation aus [13]

Aus diesem Grund versucht man mit aktuellen TE-Methoden bei der Geweberekonstruktion sowohl die Zellverteilung als auch die direkte Zellumgebung, die sogenannte extrazelluläre Matrix (Kurzform: EZM), möglichst naturgetreu nachzuahmen. Die Hoffnung bei diesem Ansatz ist, dass durch die technische Nachahmung des natürlichen Gewebegefüges den verwendeten Zellen extra- und intrazelluläre Signale vorgegeben werden können, denen sie auch in ihrer gewebespezifischen *in-vivo*-Umgebung ausgesetzt sind. Dadurch kann das gewebespezifische Verhalten von Zellen auch *in vitro* erhalten werden, welches letztendlich die Funktionalität von natürlichem Gewebe ausmacht [10].

Bereits die Komplexität von „einfachem“ natürlichem Knorpelgewebe machte es notwendig, technische Methoden zu entwickeln, die das gesteuerte Anordnen unterschiedlicher Zellen und ihrer EZM in einem „Bottom-up“³ Prozess ermöglichen. Da Zellen sich in einer flüssigen Umgebung befinden, wurden Anfang des 21. Jahrhunderts Drucksysteme für den Einsatz im TE-Bereich adaptiert.

Ziel dieses TE-Ansatzes ist es, lebende Zellen computergesteuert zweidimensional anzuordnen sowie durch den Einsatz von vernetzbaren⁴ Fluiden dreidimensionale Freiform-Geometrien schichtweise herzustellen und somit Geweberekonstruktionen beliebiger Komplexität aus patienteneigenen Zellen zu erzeugen. Hiermit verbindet sich die Hoffnung, auch die Funktionalität von natürlichen Geweben wiederherzustellen, was mit derzeitigen scaffold-basierten Therapien nicht möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein laserbasiertes Drucksystem, das auf dem Laser-induzierten Vorwärtstransfers basiert, aufgebaut und eruiert, welches das schadungsfreie Drucken von lebenden Zellen ermöglicht.

³Schrittweise Aufbauen von unten nach oben

⁴Übergang einer flüssigen in eine semi-feste Phase