

Digitaler Druck einer Hydrogelmatrix für das Einbetten von Zellen in künstlichen Zellverbänden

Stefanie Rubenwolf^{1*}, Sonja Niekrawietz¹, Jonas Schöndube¹, André Gross¹, Azmi Yusof¹, Dong Liang¹, Dr. Peter Koltay^{1,2}, Prof. Dr. Roland Zengerle¹ und Dr. Günter Roth¹

¹ Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Universität Freiburg, Georges-Koehler-Allee 106, 79110 Freiburg, Deutschland

² BioFluidix GmbH, Georges-Koehler-Allee 106, 79110 Freiburg, Deutschland

* Email: stefanie.rubenwolf@imtek.uni-freiburg.de

Kurzfassung

Rapid Prototyping Verfahren auf Basis **kontaktfreier Druckverfahren** sind vielversprechende Ansätze zur Erzeugung **dreidimensionaler heterogener Zellverbände** als Organ- und Gewebemodelle. Mit Hilfe der **PipeJet™-Nanodosiertechnologie** konnte eine **mehrschichtige Kompositstruktur aus Collagen und Alginate** gedruckt werden, die als **Hydrogelmatrix zum Einbetten von Zellkulturen** geeignet ist. Die hierzu aufgebaute automatisierte Plattform erlaubt steriles Arbeiten für synchrones Drucken von Zellen und Hydrogelmatrix zu künstlichen Zellverbänden.

Abstract

Rapid prototyping methods based on **non-contact printing technologies** are promising approaches to produce **three-dimensional heterogeneous cell assemblies** as models for organs and tissues. Using **PipeJet™ nanodispersing technology** we were able to print a **multilayered composite from collagen and alginate**, suitable to serve as **hydrogel matrix for embedding cell cultures**. The automated dispensing platform developed for this project provides sterile working conditions for a parallel printing of cells and hydrogel matrix to generate artificial cell tissues.

1 Motivation

Gemäß dem Stand der Technik werden dreidimensionale künstliche Zellverbände derzeit überwiegend in porösen Strukturen gezüchtet, die zuvor z.B. mikrotechnisch hergestellt wurden [1]. Die gesamte Struktur wird dann von einer Sorte Zellen besiedelt und so ein homogen gewachsener Zellverband erzeugt. Automatisierte Dosiersysteme basierend auf der Tintenstrahl-Drucktechnologie oder anderen kontaktfreien Druckverfahren, wie z.B. der PipeJet™ Technologie hingegen, ermöglichen den orts aufgelösten Druck von Zellen und das parallele Drucken einer Hydrogelmatrix als Stützgerüst, um damit definierte heterogene künstlicher Zellverbände aufzubauen. Eine besonders für Zellen geeignete Hydrogelmatrix ist Collagen, das auch in der extrazellulären Matrix natürlicher Gewebe vorkommt [2]. Da Collagen nur geringe Festigkeit besitzt, wurde es im Rahmen dieser Arbeit mit einem verstärkenden Gerüst aus dem ebenso biokompatiblen aber stabileren Polymer Alginate [3] kombiniert.

2 Versuchsaufbau

Bild 1 zeigt den Versuchsaufbau als automatisierte Plattform zum orts aufgelösten Drucken von Hydrogelmatrix und Zellen. Substrat und Druckkopf sind zueinander in x-, y- und z-Richtung beweglich, Gehäuse und Sterilfilter garantieren eine Zellkultur-kompatible Umgebung für das parallele Drucken von Zellen und Matrix. Bild 2 zeigt

Druckkopf und Reservoir des PipeJet™ P9 Dosierers (BioFluidix GmbH, Freiburg). Mit diesem werden die verschiedenen Flüssigkeiten auf Collagen-beschichtete (C8919, alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) Glas-Objektträger gedruckt und die gedruckten Strukturen mit einem inversen Mikroskop bei 40facher Vergrößerung von unten fotografiert.

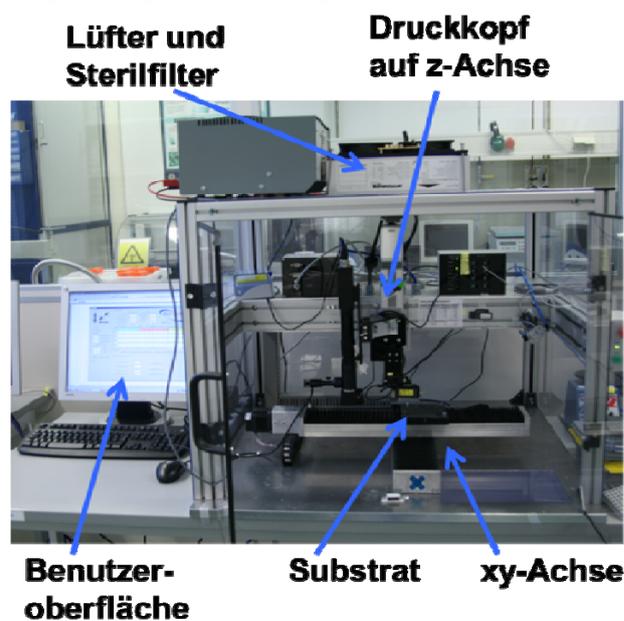


Bild 1 Automatisierte Plattform für den synchronen digitalen Druck von Zellen und Matrixsubstanzen.

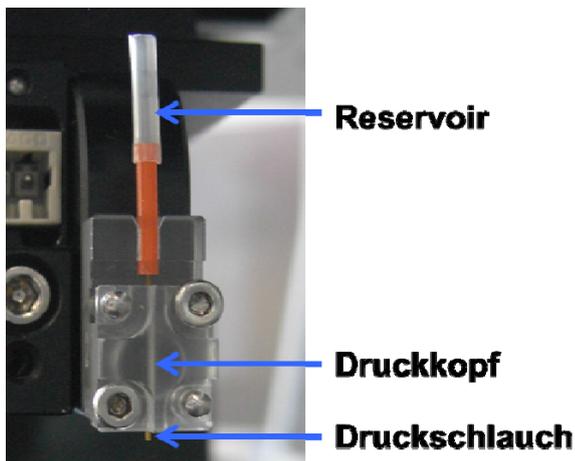


Bild 2 PipeJet™ P9 Dispensierkopf mit aufgesetztem Schlauch als Reservoir.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Drucken von Alginat

Das Polymer Alginat wird aus Algen gewonnen und benötigt die Zugabe von Kalziumionen zur Aushärtung. Bereits geringe Konzentrationen an Alginat lassen die Viskosität einer Lösung stark ansteigen. Dies kann bei der Dispensierung schnell zum Verstopfen des dünnen Schlauches führen, wenn die Konzentration an der Schlauchspitze durch Verdunstung ansteigt. In den hier gezeigten Versuchen wurde mit autoklavierter 0,5 %iger (w/v) Alginatlösung gearbeitet, was zwischen den Dispensierschritten Pausen von bis zu 7 Minuten erlaubt. Für die Aushärtung wurde der Träger mit 0,1 M CaCl₂ benetzt.

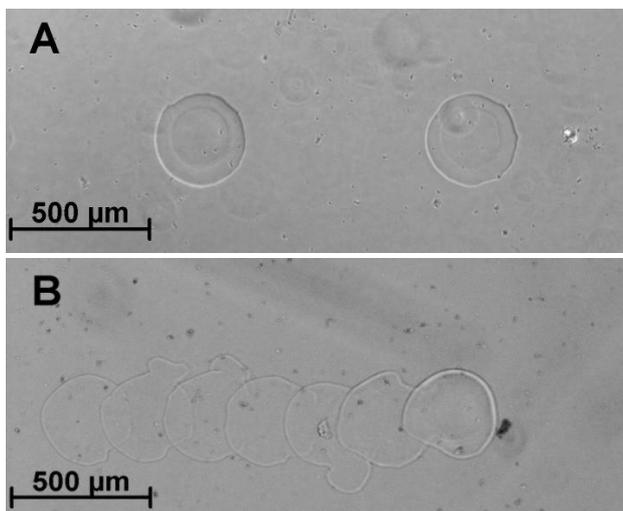


Bild 3 Gedruckte Strukturen aus 0,5 %iger Alginatlösung auf Collagen-beschichteten Trägern benetzt mit 0,1 M CaCl₂. A) Einzeltropfen, B) Linie.

Bild 3 zeigt gedruckte Alginate Tropfen mit ca. 5 – 15 nl Volumen auf einem mit Collagen beschichteten Objektträger. Einzelpunkte mit 310 ± 13 µm Durchmesser können durch Überlappung zu Linien kombiniert werden. Die

Breite dieser Linien hängt nicht nur vom Durchmesser der Tropfen sondern auch von deren Abstand zueinander ab.

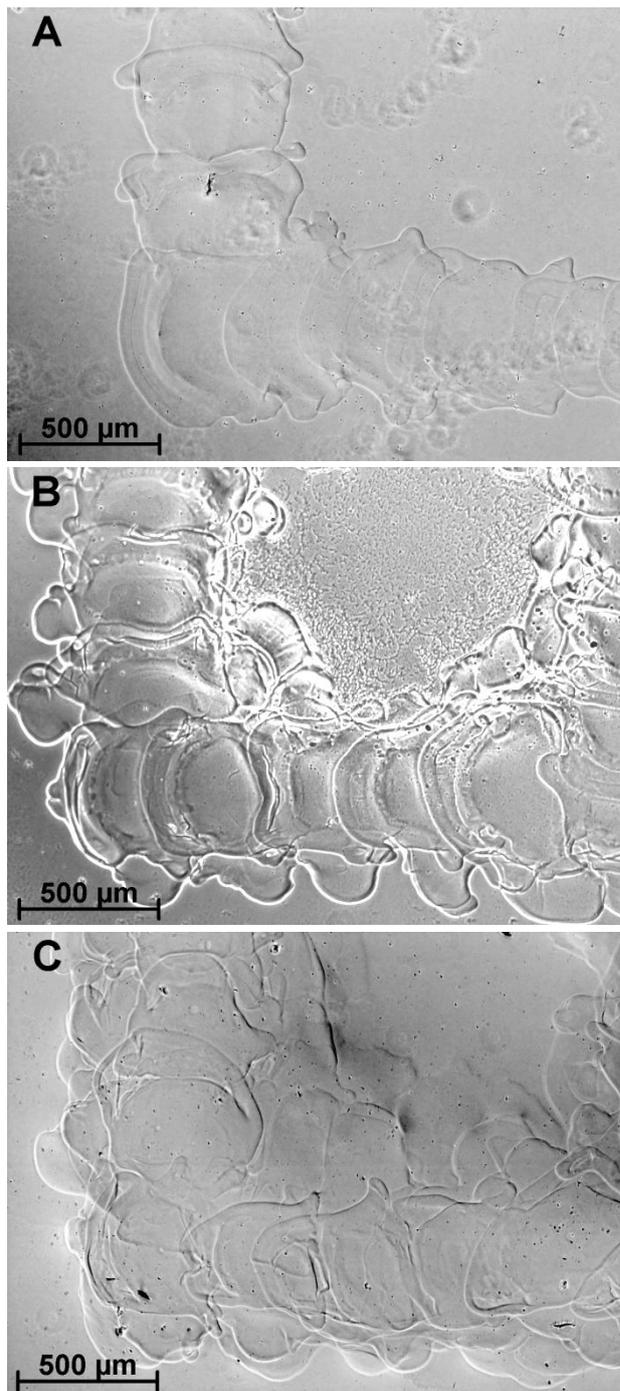


Bild 4 Gedruckte mehrlagige Strukturen aus 0,5 %iger Alginatlösung auf Collagen-beschichteten Trägern benetzt mit 0,1 M CaCl₂. A) Einlagig, B) zweilagig, C) dreilagig.

3.2 Mehrschichtige Stützstrukturen aus Alginat

Durch die gute Festigkeit von ausgehärtetem Alginat können dreidimensionale Strukturen durch Stapeln einzelner Schichten erzeugt werden. Bild 4 zeigt Strukturen mit bis zu drei Alginatschichten. Dabei wurde zwischen

dem Aufbringen der einzelnen Schichten je vier Minuten gewartet um einerseits eine ausreichende Aushärtung der unteren Schicht, andererseits auch die Diffusion von Kalziumionen durch diese zu gewährleisten. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass die obersten Schichten vor der Aushärtung auf der nicht mehr planen Oberfläche zerfließen und die Struktur verbreitern. Daher sollte beim Drucken dreidimensionaler Zellmatrices stets zuerst eine Schicht abgeschlossen und alle Lücken mit Collagen gefüllt werden, bevor die nächste Schicht begonnen wird.

3.3 Drucken von Collagen

Collagen wird aus dem Bindegewebe von z.B. Rindern (C2124) gewonnen und liegt in saurer Lösung vor. Durch Einstellen des pH-Wertes bekommt das Collagen eine halb feste, gelartige Struktur. Daher wird der Träger mit Zellkulturmedium (Fibroblast growth medium, ProVitro, Berlin) benetzt, das stark gepuffert ist. Beim Dispensieren des Collagens sind Druckpausen von bis zu 6 Minuten ohne Verstopfen möglich.

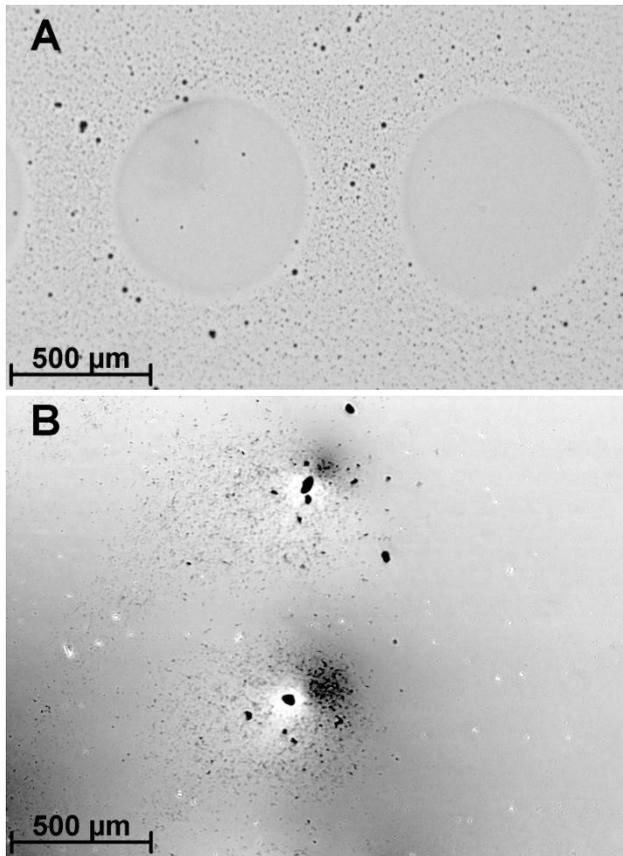


Bild 5 Gedruckte Einzeltropfen aus Collagenlösung auf Collagen-beschichteten Trägern benetzt mit Zellkulturmedium. A) unbehandelt und eingetrocknet, B) Beimischung von hydrophilisierten Kohlenstoffnanofasern für verbesserte Sichtbarkeit im feuchten Zustand.

Die Visualisierung von gedrucktem Collagen ist schwierig, da dieses in feuchtem Zustand auf dem collagenbeschichteten Träger durchsichtig ist. Erst beim Eintrocknen werden die Strukturen sichtbar (Bild 5A). Daher wurden in einigen Versuchen Kohlenstoffnanofasern (HTF150FF

LHT, Electrovac, Klosterneuburg, Österreich, hydrophilisiert nach [4]) beigemischt, wie in Bild 5B gezeigt. Der Durchmesser der gedruckten Objekte beträgt, abhängig von den Aushärtebedingungen zwischen 350 µm und 700 µm.

3.4 Kompositstruktur

Zum Drucken von Kompositstrukturen wurden die Träger mit CaCl_2 -angereichertem Zellkulturmedium benetzt um das Aushärten beider Polymere zu ermöglichen.

Bild 6A zeigt eine zweilagige Kompositstruktur aus Collagen und Alginate. Die erste Schicht bilden hier senkrecht gezeigte Alginatelinien. Die Zwischenräume wurden mit Collagen aufgefüllt. Anschließend wurde eine um 90° gedrehte Alginatelinie als zweite Schicht aufgebracht.

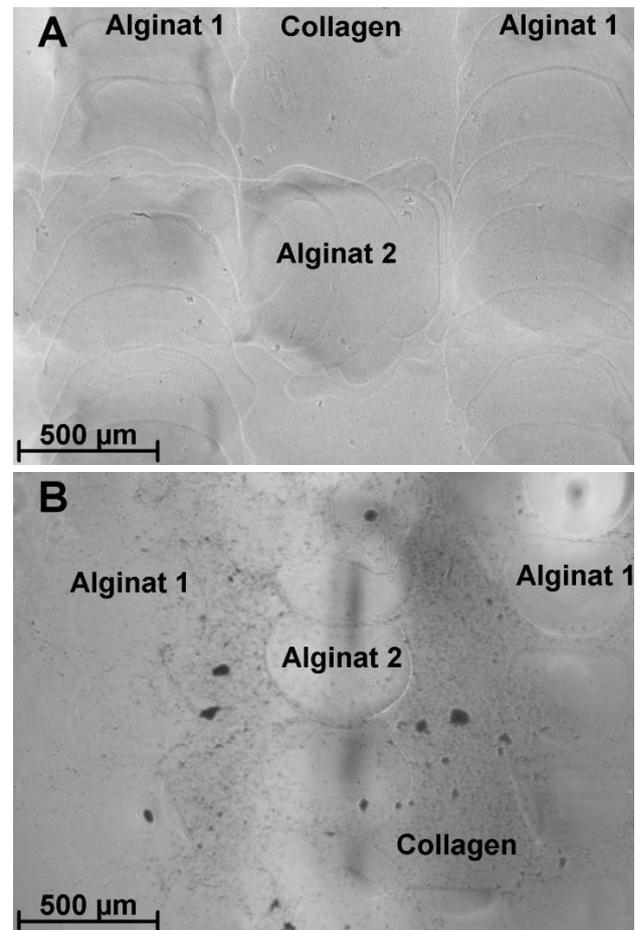


Bild 6 Gedruckte zweilagige Struktur aus Collagen und Alginate. Erste Lage bestehend aus Alginatelinien mit Collagenfüllung, zweite Lage bestehend aus Alginate-Querlinie. A) Mit unbehandeltem Collagen, B) Collagen mit Beimischung von Kohlenstoffnanofasern.

Um sicherzustellen, dass das in feuchtem Zustand nicht sichtbare Collagen ausgehärtet ist, wurde die in Bild 6B gezeigte ebenfalls zweischichtige Struktur erstellt. Hier wurde als unterste Schicht eine Alginate Rahmen gedruckt, der mit Collagen gefüllt wurde. Anschließend wurde als zweite Schicht wieder eine einzelne Linie darauf appliziert. Es ist zu erkennen, dass das Collagen erfolgreich im

Alginatrahmen platziert werden konnte. Die aufgesetzte Alginatlinie scheint jedoch das Collagen etwas beiseite gedrückt zu haben. Dies sollte durch Optimierung von Aushärtezeiten und Dosiergeschwindigkeit noch behoben werden können.

3.5 Stabilität der gedruckten Strukturen

Bild 7 zeigt gedruckte Alginat und Kompositstrukturen nach Lagerung in feuchtem Milieu bei 4 °C für ein bis vier Tage. Beide Polymere scheinen ihre Festigkeit und definierte Form zu behalten.

Durch Zugabe von reichlich Flüssigkeit können die gedruckten Strukturen vom Glasträger gelöst werden. Während einlagige Alginatlinien hierbei in der Regel zerbrechen sind mehrlagige Alginat- und Kompositstrukturen stabiler und können oft unversehrt abgenommen werden.

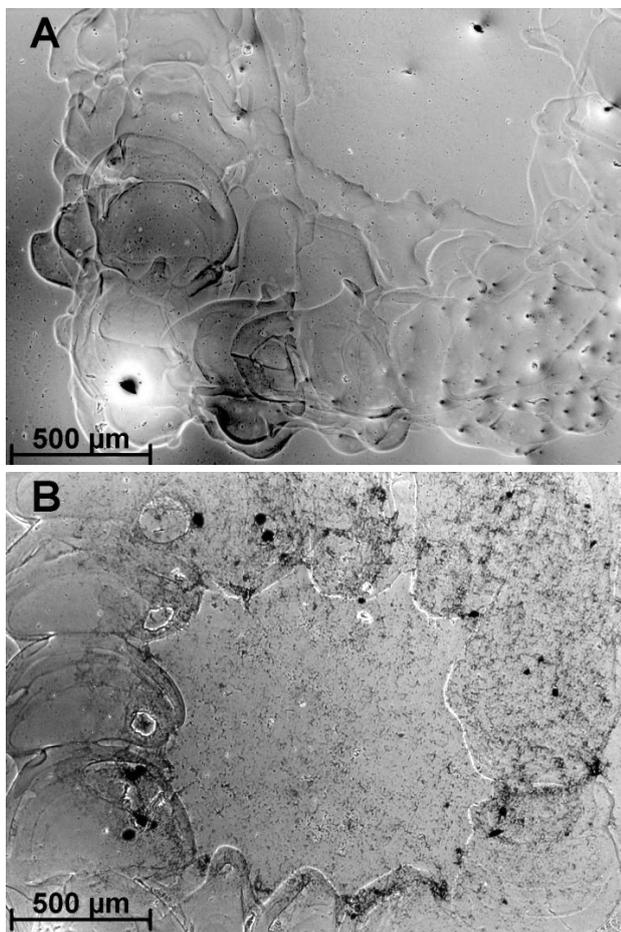


Bild 7 Gedruckte Strukturen nach Lagerung. A) dreilagige Alginatstruktur aus Bild 4A nach 4 Tagen, B) Kompositstruktur aus Alginat und Collagen mit Nanofaserbeimischung nach einem Tag.

4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass es, basierend auf kontaktfreien Druckverfahren (hier mit Hilfe der PipeJet™-Technologie) möglich ist, stabile mehrlagige Kompositstrukturen aus Collagen und Alginat zu drucken. Der hierfür realisierte experimentelle Aufbau erlaubt es darüber hinaus auch, Zellen im Wechsel mit der dreidimensionalen Hydrogelmatrix zu drucken. Hierzu laufen derzeit Experimente mit einem Verfahren zur Einzelzelldosierung [5]. Mittelfristig könnte es mit dieser Technologie möglich sein heterogene dreidimensionale Zellverbände mit hoher räumlicher Auflösung zu erzeugen.

5 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Bundesministerium für Bildung und Forschung (Projekt Zepto, FKZ 16SV50066) und von der Europäischen Kommission (Project PASCA, www.pasca.eu, FP7 GA257073) gefördert.

6 Literatur

- [1] Barry, R.A. et al., *Advanced Materials* 21 (23), 2009, pp. 2407-2410
- [2] Baldwin, S.P. et al., *International Journal of Developmental Neuroscience* 14 (3), 1996, pp. 351-364
- [3] Haeberle, S. et al., *Journal of Microencapsulation* 25 (4), 2008, pp. 267-274
- [4] Hacker, V. et al., *Electrochemistry Communications* 7 (4), 2005, pp. 377-382
- [5] Yusof, A. et al., *Lab on A Chip* 11 (14), 2011, pp. 2447-2454