

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 heterogenen 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.

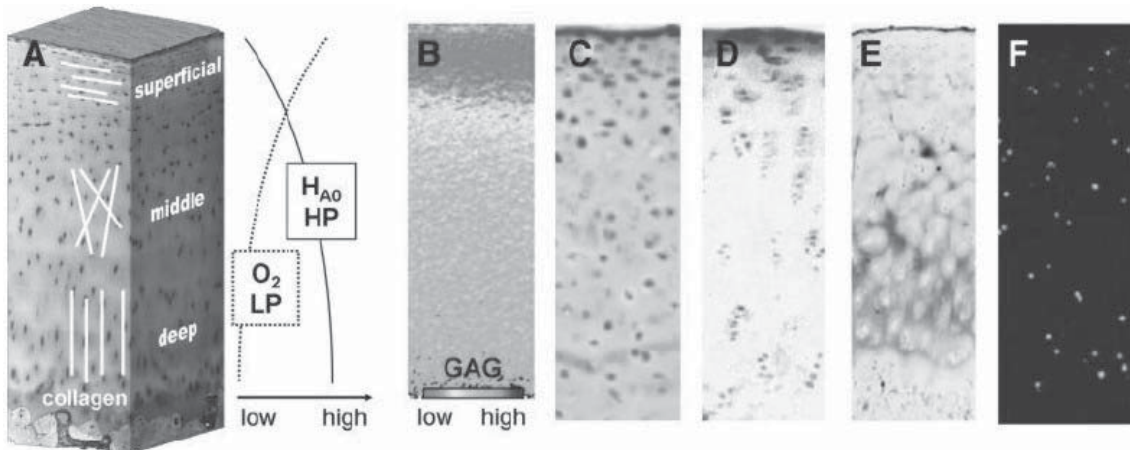


Abbildung 1.1: Aufbau von natürlichem Gelenkknorpel mit zonaler Variation aus [13]

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 Vorwärtstransfer 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



2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Drucksysteme für biologische Materialien

Der Begriff „Druckverfahren“, im Sinne eines Reproduktionsverfahrens, wurde maßgeblich Mitte des 15. Jahrhunderts von Johannes Gutenberg geprägt. Gutenberg verstand es existierende Techniken wie die Spindelpresse und das Handgußverfahren in einem Produktionsprozess zusammenzuführen, der die maschinelle Wiedergabe von Druckbildern mit gleich bleibender Qualität ermöglichte und den Buchdruck revolutionierte. Das Bemerkenswerte an seiner Erfindung war, dass er viele unterschiedliche Einzelkomponenten zu einem Gesamtsystem vereinte, was innerhalb weniger Jahrzehnte zu der massenhaften Verbreitung dieses maschinellen Drucksystems führte und von dem sich auch heute noch der Begriff „Drucker“ ableitet.

Heutige Drucksysteme sind elektromechanische Geräte, die digitale Information in nutzbarer physikalischer Form ausgeben. Seit der Einführung von kommerziell erhältlichen Heimcomputern Anfang der 80er Jahre sind Drucker aus dem alltäglichen Leben nicht mehr wegzudenken. Generell werden Drucker nach dem Verfahren eingeteilt, mit dem sie digitale Information auf einem physikalischen Träger wiedergeben. Man unterscheidet zwischen:

1. Druckverfahren mit Medienberührung z.B. Nadeldrucker und Laserdrucker
2. Druckverfahren ohne Medienberührung z.B. Tintenstrahl

Zu den bekanntesten Druckverfahren mit Medienberührung gehört der Nadeldrucker. Bei diesem Drucker werden einzeln ansteuerbare Nadeln durch ein Farbband auf das Papier geschlagen und durch den mechanischen Druck wird die Farbwiedergabe auf dem Papier erzielt.

Druckverfahren ohne Medienberührung wie der Tintenstrahldrucker spritzen ein definiertes Tropfenvolumen berührungsfrei auf das Papier, wo es antrocknet und so das Druckbild erzeugt.

Waren diese Drucksysteme noch auf die zweidimensionale Wiedergabe von digitalen Informationen begrenzt, führte die Möglichkeit, definierte Volumen aushärtbarer Fluide computergesteuert zu übertragen, zu dem Einsatz von Drucksystemen in der Fertigungstechnik. Da bei diesem Prozess Material schrittweise hinzugefügt wird, gehört es zu der Gruppe der additiven Fertigungsverfahren und durch die einfache Einbindung in vorhandene CAD/CAM-Systeme¹ wurden diese Verfahren als „Rapid Prototyping“ (schneller Prototypenbau) bekannt.

Diese dreidimensionale Freiform-Erzeugung von 3D-CAD-Modellen fand Anwendung in vielen Bereichen der Fertigungstechnik, wie der Prototypenentwicklung sowie der Werkzeug-

¹CAD = Computer-aided Design ; CAM = Computer-aided manufacturing

und Endprodukterzeugung und gegen Ende der 90er Jahre in der Medizin, wo erstmalig gedruckte 3D-Strukturen als mechanische Träger für lebende Zellen eingesetzt wurden [14]. Die Zellbesiedlung dieser 3D-Gerüststrukturen (auch Scaffolds genannt) erfolgte meist per Hand oder mittels Durchflussverfahren, die den Scaffold über einen längeren Zeitraum mit Zellsuspension umspülten. Diese Besiedlungsmethoden sind nur schwer zu kontrollieren und bieten keine Möglichkeit, unterschiedliche Zellen gesteuert innerhalb des Scaffolds zu platzieren.

Die Limitierung von 3D-Druckern, ausschließlich auf die Erstellung von 3D-Gerüststrukturen begrenzt zu sein, führte Anfang des 21. Jahrhunderts zu dem nächsten logischen Entwicklungsschritt: Drucksysteme, die 3D-Modelle aus lebenden Organismen zusammen mit der Trägerstruktur in einem Schritt erzeugen.

Erstmalig wurde ein technischer Prozess, lebende Zellen zu „drucken“, von Odde et al. [15] im Jahr 2000 vorgestellt. Hierbei wurde das Prinzip einer optischen Pinzette genutzt, um neuronale Zellen durch eine Hohlfaser auf ein Glassubstrat mikrometergenau zu übertragen. Nach dieser ersten Machbarkeitsstudie wurde eine Vielzahl unterschiedlicher technischer Prozesse adaptiert, um lebende Organismen computergesteuert zu übertragen. Eine neue Verfahrensklasse wurde vorgestellt, das sogenannte „Bioprinting“.

Bioprinting wurde von Mironov et al. [16] definiert als „...the use of material transfer processes for patterning and assembling biologically relevant materials-molecules, cells, tissues, and biodegradable biomaterials-with a prescribed organization to accomplish one or more biological functions.“. Technische Verfahren, die erfolgreich hierfür eingesetzt wurden, sind beispielsweise Verfahren aus der Mikrofluidik oder Techniken wie die 2-Photonen-Polymerisation, Laserbasierte Drucker, Tintenstrahldrucker und Extruder. Der Einsatz dieser vielfältigen Bioprinting-Verfahren geht einher mit dem großen Bereich unterschiedlicher biologischer Applikationen, die von der Erzeugung einzelner fokaler Adhäsionspunkte für Zellen bis hin zur drucktechnischen Erstellung vollständiger Organe reichen.

Alle technischen Prozesse, die die beschriebenen „Bioprinting“-Vorgaben erfüllen, werden unter dem Oberbegriff „Bioprinter“ zusammengefasst. Aufgrund der Vielfalt unterschiedlicher Techniken werden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nur die drei Bioprint-Technologien vorgestellt, die seit der ersten Machbarkeitsstudie von Odde et al. [15] vermehrt für das berührungslose Drucken von lebenden Organismen, dem Fokus dieser Arbeit, eingesetzt wurden.

2.1.1 Tintenstrahldrucker

Tintenstrahldrucker wurden im Rahmen dieser Arbeit nach dem Prinzip der Tropfenentstehung (vgl. Abb. 2.1) eingeteilt. Man unterscheidet zwischen kontinuierlicher („continuous“) und der gesteuerten Tropfenentstehung („drop-on-demand“).

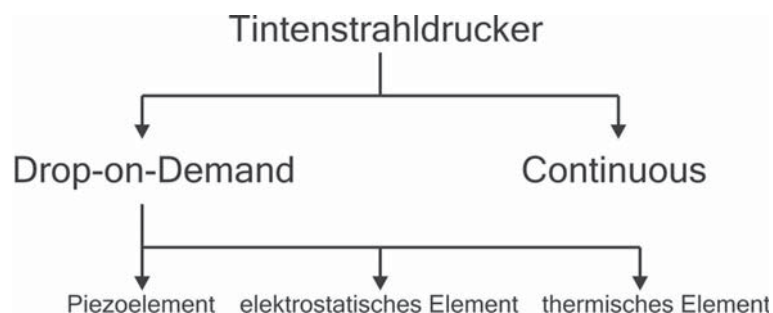


Abbildung 2.1: Klassifizierung von Tintenstrahl Druckern



Bei **C**(ontinuous) **I**(nk)-**J**(et)-Druckern (vgl. Abb. 2.2) wird ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl kurz hinter der Austrittsdüse erzeugt. Dies wird dadurch erreicht, dass eine Flüssigkeit gegen eine runde Düsenöffnung gedrückt wird und sich ein zylindrischer Flüssigkeitsstrahl ausbildet, der ab einer kritischen Länge, aufgrund der Oberflächenspannung² des Fluides, in einzelne Tropfen zerfällt.

Dieser Tropfenzerfall wurde erstmalig 1873 von Joseph Plateau experimentell nachgewiesen [17] und basierend auf seiner Arbeit von Lord Rayleigh 1878 theoretisch beschrieben [18]. Das Phänomen wurde in den Folgejahren als Rayleigh-Plateau-Instabilität bekannt und bildet die Grundlage, auf der heutige CIJ-Drucker basieren.

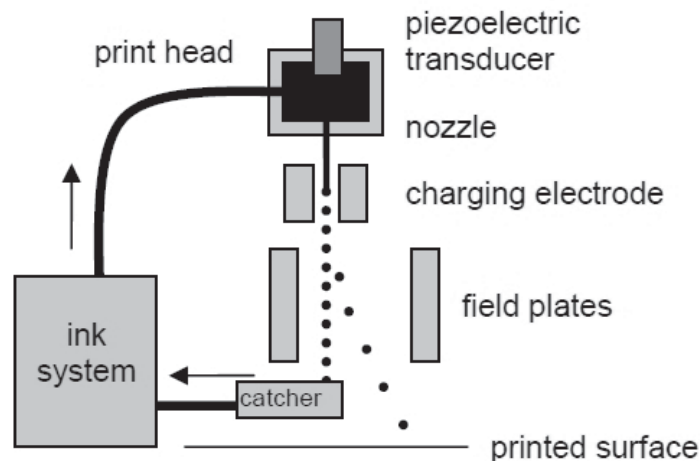


Abbildung 2.2: Prinzip des kontinuierlichen Tintenstrahldruckers aus [19]

Das Aufbrechen des Tintenstrahls in einzelne Tropfen kann über das Aufbringen einer Schwingung mit geeigneter Frequenz (z.B. durch ein Piezoelement) gesteuert werden. Hierbei entsteht eine Folge von Einzeltropfen mit definiertem Volumen und Abstand. Diese Folge von Tropfen passiert kurz darauf eine Ladeelektrode, von der die Einzeltropfen unterschiedlich stark aufgeladen werden. Die unterschiedliche Ladung der Einzeltropfen führt beim Passieren eines elektrischen Feldes zu einer Ablenkung, die von der Ladungsstärke der Tropfen abhängt. Das Druckbild wird durch das schnelle Schalten der Ladeelektrode und der damit korrespondierenden Ablenkung der Tintentropfen sowie der translatorischen Bewegung des Druckkopfes erzielt. Nicht geladene Tropfen werden durch eine Blende aufgefangen und dem Druckprozess wieder zugeführt.

CIJ-Drucker zeichnen sich durch hohe Druckgeschwindigkeiten aus, was zu der weiten Verbreitung von CIJ-Systemen in der Industrie, z.B. für die Produktkennzeichnung, führte. Für das Drucken von lebenden Organismen ist diese Drucktechnik jedoch nicht geeignet, da Zellen durch den kontinuierlichen Prozess sowie die elektrischen Ladungen zu stark beschädigt werden würden.[20]

Bei **D**(rop)-**o**(n)-**D**(emand)-Druckern werden, im Unterschied zum CIJ-Druckern, Tropfen nur nach Bedarf erzeugt. Hierbei werden DOD-Drucker zusätzlich noch nach dem technische Prinzip unterteilt, mit dem die Tropfen gesteuert ausgestoßen werden (vgl. Abb. 2.3). Der Druck vor der Austrittsdüse wird dabei entweder *elektrothermisch* (Abb. 2.3A) oder *elektromechanisch* (Abb. 2.3B und C) erzeugt.

²an der Oberfläche flüssiger Phasen wirkende Kraft

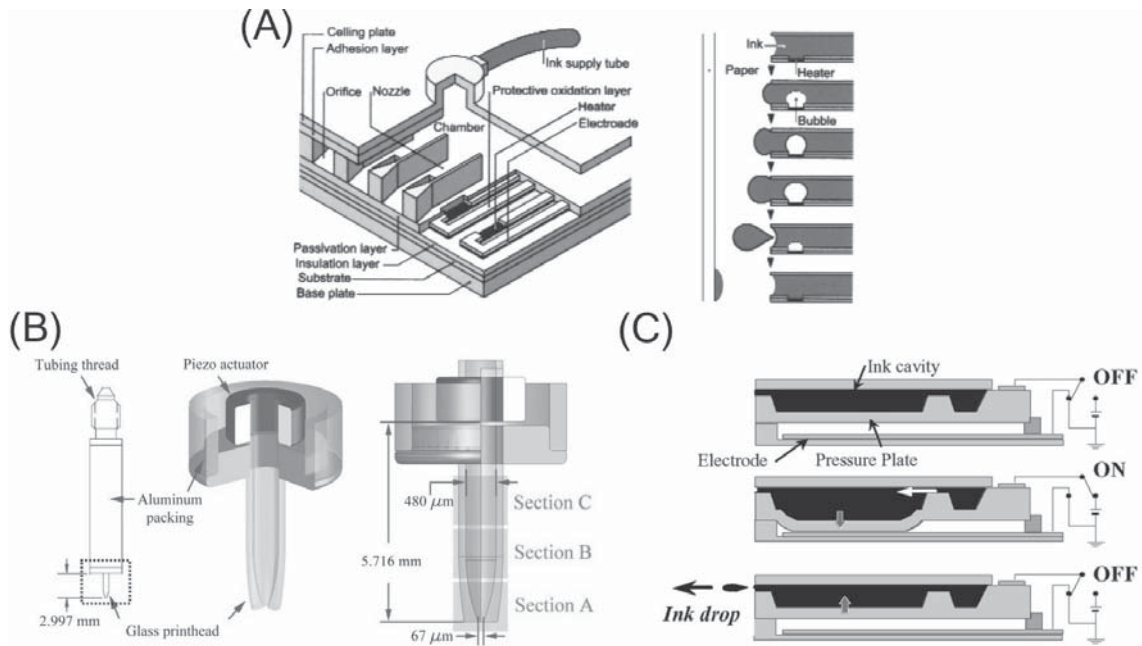


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau der Druckköpfe von DOD-Druckern:(A) Thermal gesteuert, (B) Piezosteuert und (C) elektrostatisch gesteuert aus [21–23]

Bei der *elektrothermischen* Auslegung³ wird durch das kurzzeitige Einschalten (üblicherweise einige μs) eines Heizelementes eine Dampfblase erzeugt, welche sich ausdehnt und durch den entstehenden Überdruck ein Tropfenvolumen aus der Düse presst. Der Kollaps der Dampfblase sorgt danach für einen Unterdruck, der die restliche Tinte am Austritt aus der Düse hindert. Das Tropfenvolumen kann durch die rheologischen Eigenschaften der Tinte, dem Austrittsdüsenquerschnitt sowie die elektrische Ansteuerung und Temperatur des Heizelementes eingestellt werden und liegt üblicherweise im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-12} Liter.

Die *elektromechanische* Bauform erzeugt den Überdruck vor dem Düsenaustritt durch die mechanische Kompression des Tintenreservoirs mittels eines Piezo- (Abb. 2.3B) oder elektrostatischen Elements (Abb. 2.3C). Der Vorteil dieser Bauart gegenüber dem elektrothermischen Verfahren ist, dass die Tinte nicht erhitzt wird und die Tintenkommerbauartlich vom Druckerzeugungselement getrennt ist. Dieses ist insbesondere für das Drucken von biologischen Materialien interessant, da z.B. Proteine bereits bei Temperaturen über 42°C irreversibel geschädigt werden.

Die Druckköpfe von DOD-Druckern können mittels gängiger Fertigungsverfahren der Halbleitertechnik hergestellt werden, was die kostengünstige Massenproduktion von Druckköpfen mit einer frei einstellbaren Anzahl von Düsen auf engstem Bauraum ermöglicht. Dies führte zu der weiten Verbreitung von DOD-Druckern im Büro- und Heimbereich seit Mitte der 80er Jahre.

Durch die Möglichkeit, einige Pikoliter eines Fluides kontaktfrei mit hoher Genauigkeit und, durch den Einsatz von Mehrfachdüsen, parallel zu übertragen, fanden DOD-Drucker gegen Ende des 20. Jahrhunderts Anwendung in der pharmazeutischen Entwicklung [24]. Die Weiterentwicklung von DOD-Druckern in den Folgejahren ermöglichte den Einsatz für das

³„Bubble-Jet“-Drucker



Drucken von biologischen Materialien. So konnten mittels eines umgebauten Bubble-Jet-Druckers DNA⁴- und Protein-Microarrays ohne DNA-Schädigung oder Denaturierung von Proteinen gedruckt werden [21, 25].

Erstmals konnten Wilson et al. 2003 mit einem umgebauten Bubble-Jet-Drucker den schädigungsfreien Druck von lebenden Zellen zeigen [20]. Waren die Druckergebnisse dieser Studie noch auf die zweidimensionale Anordnung von Zellen begrenzt, konnte die gleiche Arbeitsgruppe bereits im gleichen Jahr die 3D-Anordnung von Zellen demonstrieren, was durch ein thermisch vernetzbares Gel und das schichtweise Aufdrucken der Zellen bewerkstelligt wurde. [26]

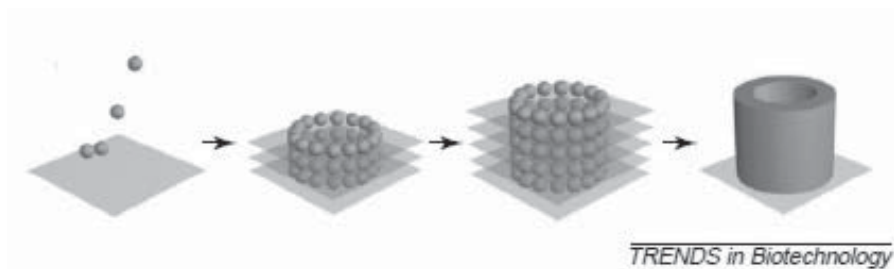


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der schichtweisen 3D-Anordnung von Zellen aus [26]

Neben umgebauten Bubble-Jet-Druckern wurden auch Tintenstrahldrucker mit elektromechanischen Druckköpfen für den zwei- [23, 27] und dreidimensionalen [28, 29] Zelldruck eingesetzt.

Die Vorteile dieser Drucktechnik sind die einfache Adaption bestehender Systeme für das Drucken von Zellen und die geringe Baugröße der Druckköpfe, die durch den parallelen Einsatz von Mehrfachdüsen hohe Druckgeschwindigkeiten (13 cm/s) bei hoher Genauigkeit (0,2 µm) ermöglichen⁵. Jedoch sind Tintenstrahldrucker, aufgrund der konischen Düsengeometrie und dem geringen Durchmesser der Düsenöffnung ($\varnothing \leq 80 \mu\text{m}$), nur für das Drucken von Fluiden mit einer Viskosität⁶ von bis zu 0,1 Pa*s geeignet [30]. Dieser Wert spiegelt zudem nur den möglichen Höchstwert wieder und ist für das Drucken von Zellen nicht geeignet, da Zellen durch den hohen Druck am Düsenaustritt einhergehend mit einer hohen Viskosität des Fluides durch Scherkräfte zu stark geschädigt würden. Hinzu kommt, dass die Zellkonzentration in dem genutzten Fluid gering gehalten werden muss, um eine Schädigung der Zellen untereinander am Düsenaustritt zu vermeiden. Aus dem genannten Punkten ergibt sich, dass die gedruckten 3D-Konstrukte erstens eine geringe Zelldichte haben, was die Gewebereifung signifikant verlängert, und zweitens die Festigkeit sehr gering ist, was längere *in-vitro*-Kultivierung erfordert und die Handhabung zusätzlich erschwert.

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde in den letzten Jahren die Weiterentwicklung von pumpenbasierten Systemen für das Drucken von lebenden Zellen vorangetrieben.

⁴Desoxyribonukleinsäure

⁵Werte aus [29]

⁶Maß für die Zähflüssigkeit eines Fluides

2.1.2 Spritzendrucker

Spritzendrucker werden in der Medizintechnik seit Ende der 90er Jahre verstärkt für die Scaffoldherstellung eingesetzt [14]. Diese Systeme gehören zu der Gruppe von Rapid Prototype-Verfahren, die fluide Materialien für die gesteuerte Herstellung von 3D-Geometrien nutzen. Durch ihre zylindrische Düsengeometrie sind sie in der Lage, flüssige [31] bis hochviskose [32] Materialien zu verarbeiten. Dieser Vorteil führte im letzten Jahrzehnt zu der weiten Verbreitung dieser Drucktechnik in der Herstellung von Weich- und Hartgewebeimplantaten [33]. Kurze Zeit nach der ersten erfolgreichen Übertragung von lebenden Zellen mit Tintenstrahldruckern wurden auch Spritzendrucker umgerüstet, um fluide Materialien mit eingebetteten lebenden Zellen in einem Arbeitsschritt drucken zu können [26, 34, 35]. Im Unterschied zu den Bioprintern, die auf Tintenstrahltechnik basieren, wird bei Spritzendrucksystemen das biologische Material kontinuierlich als Strang ausgetrieben. Die drei gängigsten Verfahren sind in Abb. 2.5 dargestellt und werden wie DOD-Bioprinter nach dem Verfahren ihrer Druckerzeugung eingeteilt. Man unterscheidet zwischen Luftdruck-, Schnecken- und Kolbenauslegung.

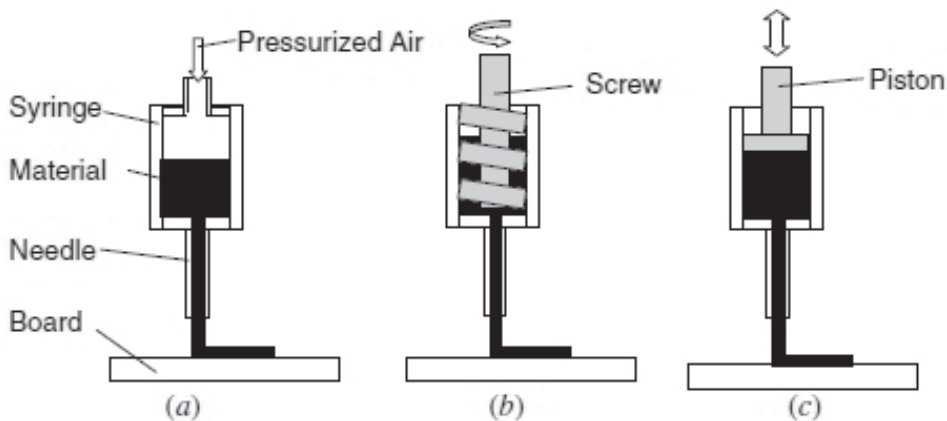


Abbildung 2.5: Mechanische Druckerzeugung bei Spritzensystemen : (a) Luftdruck, (b) Schnecken-/Schraubförderer und (c) Kolben aus [36]

Die Druckerzeugung mittels Luft (vgl. Abb. 2.5(a)) ist das am meisten eingesetzte Verfahren, da durch den Einsatz von Sterilfiltern die Kontamination des biologischen Materials vermieden wird und man nur einen Kompressor für den Einsatz von mehreren Spritzen benötigt, was die Steuerung und die Baugröße durch den Einsatz von Mehrfachventilen wesentlich vereinfacht. Der Nachteil dieser Bauform ist, dass durch die Viskosität des Fluides und die Kompressibilität von Luft die Menge des ausgetriebenen Fluides stark beeinflusst wird, was sich negativ auf die Druckgenauigkeit auswirkt. Wesentlich höhere Druckgenauigkeiten lassen sich mit Schraub- und Kolbenförderern (Abb. 2.5(b) und (c)) realisieren, da bei diesen Auslegungen die Materialmenge sehr genau über die Stellung des Gewindeganges bzw. den Kolbenhub eingestellt werden kann. Jedoch ist die Steuerung der Stellantriebe und der Einsatz von mehreren Spritzen wesentlich aufwendiger, als bei der Kompressor-getriebenen Bauform.

Der Vorteil dieser Systeme, im Vergleich zu DOD-Bioprintern, ist der große Bereich unterschiedlicher viskoser Fluide, die eingesetzt werden können, und dass durch die zylindrische Düsengeometrie beliebig hohe Zelldichten schädigungsfrei gedruckt werden können. Dies ermöglicht das Drucken von großvolumigen Zellkonstrukten mit frei einstellbarer Zelldichte und



Gelsteifigkeit. Der Nachteil im Vergleich zu DOD-Bioprintern ist ihre geringe Druckgenauigkeit. Üblicherweise werden Düsenöffnungen mit einem Durchmesser von 100 μm bis 400 μm eingesetzt, was gleichzeitig die Größe der gedruckten Linie vorgibt.

Neueste Entwicklungen [37] setzen deshalb auf den parallelen Einsatz von DOD-Druck- und Spritzköpfen in einem System, was die Vorteile beider Drucksysteme vereint: (1) Großvolumige Zellstrukturen mit einstellbarer Festigkeit und (2) das Einbinden von Mikrometern genauer Zellplatzierung innerhalb der Hauptstruktur.

Problematisch ist bei allen Bioprintern, die das biologische Material mit Druck aus einer Düsenöffnung pressen, dass lebende Zellen sehr empfindlich auf Scherkräfte reagieren und deshalb die Überlebensrate der Zellen sehr stark von den eingesetzten Zelltypen und Fluiden abhängig ist [38].

Diese Problematik wurde durch die Weiterentwicklung eines düsenfreien Lasertransferverfahrens adressiert, was im Folgenden vorgestellt wird.

2.1.3 Lasertransfer-Drucksysteme

Alan Douglas Brisbane beschrieb 1971 in einem US-Patent erstmalig die Möglichkeit, mit einem Laser kontaktlos Metalle zu übertragen [39]. Es dauerte jedoch 15 Jahre, bis Bohandy et al. 1986 mittels eines Lasers den Übertrag von Kupfer praktisch nachweisen konnten [40]. Dieser Aufbau (vgl. Abb. 2.6) bestand aus einem Eximerlaser, einer Vakuumkammer, einem mit Kupfer beschichteten Glasträger (*Donor*) und einem unbeschichteten Glasträger (*Kollektor*), der in unmittelbarer Nähe zu dem *Donor* platziert wurde. Der Metallübertrag wurde dadurch erzielt, dass der Laserpuls einen Teil der Kupferschicht im Bereich des Fokus schmolz und sich die Kupferschmelze auf dem darunter liegenden *Kollektor* niederschlug. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte ein Jahr später mit einem Nd:YAG-Laser neben Kupfer auch den Übertrag von Silber und prägte mit dieser Publikation den Namen der Technik, den laserinduzierten Vorwärtstransfer (Kurzform: **LIFT**) [41].

Da dieses Transferverfahren auf den Einsatz von Hochvakuum angelegt war, wurde es in den Folgejahren nur vereinzelt von Forschungsgruppen eingesetzt. Erst der Nachweis von Schultze et al. 1991, die den Übertrag von Aluminium unter Standardbedingungen zeigen konnten, läutete eine starke Verbreitung dieser laserbasierten Transfertechnik ein [42]. Es wurden in den folgenden Jahren diverse unterschiedliche Metalle, z.B. Gold, Titan, Wolfram und Chrom, sowie Oxidverbindungen wie Indium(III)-Oxid oder Aluminiumoxid erfolgreich übertragen [43]. Der zugrunde liegende Übertragungsmechanismus läuft wie folgt ab: Zuerst wird der fokussierte Laserstrahl an der Grenzfläche zwischen dem Trägerglas und dem Metall absorbiert. Der rapide Energieeintrag führt zu einer Aufheizung des Metallbereiches und der Ausbildung einer Schmelzfront, die durch das Material propagiert. Im weiteren Verlauf wird der Siedepunkt des Materiales an der Donor-Grenzfläche zwischen Glas und Metall überschritten und es kommt zu der Entstehung einer Gasblase, welche das aufgeschmolzene Material in Richtung des *Kollektors* austreibt. Dieses Verfahren ist geeignet, um anorganische Materialien zu übertragen, die ohne negative Gefügeänderungen schmelzen und wieder erstarren können. Organische Materialien, wie beispielsweise DNA, Proteine oder Zellen, würden durch den massiven Wärmeeintrag irreversibel geschädigt werden.

Eine Möglichkeit, thermisch empfindliches Material vor dem Wärmeeintrag zu schützen, wurde erstmalig 1993 von Tolbert et al. mittels eines *Dynamic Release Layer* (**DRL**) beschrieben [44]. Bei dieser Abwandlung des LIFT-Verfahrens wird das Übertragungsmaterial auf einer Zwischenschicht aufgebracht, welche die einfallenden Laserpulse absorbiert und so

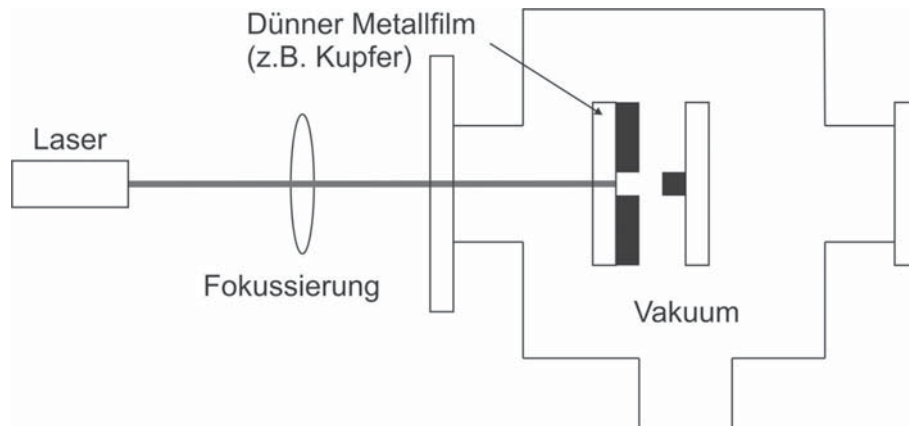


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Lasertransfers von Metallen nach [40]

mit dem thermisch empfindlichen Übertragungsmaterial geschützt. Als Dynamic Release Layer kommt generell jedes Material in Frage, das für die Wellenlänge des genutzten Lasersystems hochabsorbierend ist und als homogene Schicht auf einem für die Wellenlänge transparenten Substrat aufgetragen werden kann. Durch diese Absorptionsschichten konnten somit auch erstmalig Materialien übertragen werden, die (1) thermisch irreversibel geschädigt werden und (2) für die genutzte Laserwellenlänge transparent sind. Es entwickelten sich gegen Ende der 90er Jahre diverse Verfahren, welche sich hauptsächlich durch die unterschiedlichen Absorptionsmaterialien und ihr dadurch bedingtes Übertragungsverhalten unterscheiden [45]. So wurden als Absorptionsmaterialien Metalle, z.B. Gold und Titan [46], Polymere [47] und organische Binder [48] eingesetzt, um organische Materialien kontaktlos zu übertragen. Da das in dieser Arbeit entwickelte biologische Drucksystem auf dem Laserinduzierten Vorwärtstransfer mit metallischen Dynamic Release Layern basiert, wird in den beiden folgenden Kapiteln detaillierter auf LIFT-Verfahren eingegangen, die in den letzten Jahren für das Drucken von lebenden Zellen eingesetzt wurden.

MAPLE-DW

MAPLE-DW ist die Kurzform von *Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation Direct Write*. Dieses Verfahren basiert auf dem Beschichtungsverfahren PLD⁷, die Direct Write-Abwandlung wurde im Jahr 2000 von D.B. Chrisey erstmalig vorgestellt [49]. MAPLE-DW stellt letztlich eine Sonderform des Laserinduzierten Vorwärtstransfers mit Dynamic Release Layern (im Folgenden LIFT-DRL-Verfahren genannt) dar, welches im folgenden Abschnitt erläutert wird. Im Unterschied zu den gängigen LIFT-DRL-Verfahren, bei denen das zu druckende Material auf festen Metall- oder Polymer-Absorptionsschichten aufgebracht ist, wird beim MAPLE-DW das zu druckende Material in Pulverform in einer organischen Schicht eingebettet. Die organischen Binder erfüllen hierbei den Zweck, die einfallende Laserstrahlung zu absorbieren und so das eingebettete Pulvermaterial vor der Wärmeeinwirkung zu schützen.

Der Aufbau von MAPLE-DW (vgl. Abb. 2.7) ist praktisch identisch mit anderen LIFT-DRL-Verfahren. Er besteht aus einem gepulsten Laser (üblicherweise Excimerlaser), einem Donor-Glasträger, der für die Laserstrahlung transparent ist und das zu druckende Material trägt,

⁷Pulsed Laser Deposition

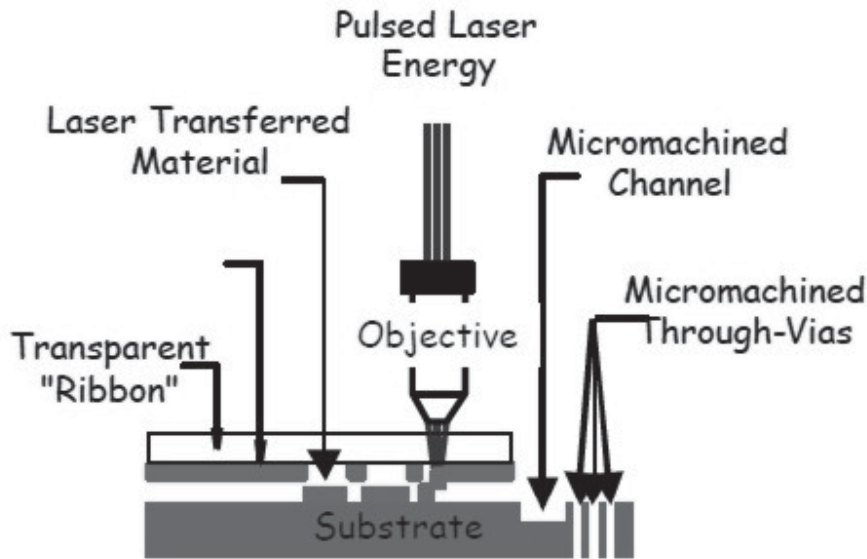


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des MAPLE-DW Verfahrens aus [50]

sowie einem *Kollektor*, der in unmittelbarer Nähe (0 μm bis 1000 μm) zu dem *Donor* positioniert wird. Der Materialübertrag wird dadurch erzeugt, dass der Laserpuls auf die Grenzfläche zwischen dem Übertragungsmaterial und der Glasschicht fokussiert wird. Der rapide Energieeintrag verdampft den organischen Binder und der Dampfdruck treibt das eingebettete Pulvermaterial zum *Kollektor* hin aus.

Mittels dieses Druckverfahrens konnten diverse pulverförmige Materialien in Pasten- oder Festform, wie z.B. Silber, BaTiO_3 , SrTiO_3 oder $\text{Y}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$, erfolgreich gedruckt werden [51]. Durch die Matrixeinbettung der Partikel wurde es zudem auch möglich, thermisch empfindliche organische Materialien wie DNA, Proteine und lebende Zellen zu übertragen.

Die Möglichkeit, biologische Fluide und lebende Zellen mit diesem Verfahren zu drucken, wurde erstmalig von D.B. Chrisey 2000 [52] theoretisch beschrieben und ein Jahr später von derselben Arbeitsgruppe durch den schädigungsfreien Druck von CHO-Zellen⁸ praktisch gezeigt [53]. Diese Veröffentlichung legte den Grundstein für kontaktlose laserbasierte biologische Drucksysteme. In den nächsten Jahren wurde mittels MAPLE-DW eine Vielzahl unterschiedlicher Zelllinien und Stammzellen schädigungsfrei gedruckt [54–57].

Mit der ursprünglichen Definition von MAPLE-DW hat das Zelldrucken jedoch nichts mehr gemein, da die Zellen nicht in einer Matrix eingebettet werden, sondern auf einer Hydrogelschicht aufliegen und an dieser haften, wie in Abb. 2.8 dargestellt wird.

Aus diesem Grund stellt das Zelldrucken per MAPLE-DW kein eigenes Verfahren mehr dar, sondern zählt zu den LIFT-Verfahren mit einem Fluid Dynamic Release Layer.

LIFT-DRL

Der grundlegende Aufbau des laserinduzierten Vorwärtstransfers mit Dynamic Release Layern (LIFT-DRL) ist in Abb. 2.9 dargestellt und besteht aus drei Hauptkomponenten: (1) einem gepulsten Lasersystem, (2) einem Glasträger (*Donor*), der mit einer laserenergie-absorbieren-

⁸Chinese Hamster Ovaries sind Zellen aus dem Eierstock eines Hamsters

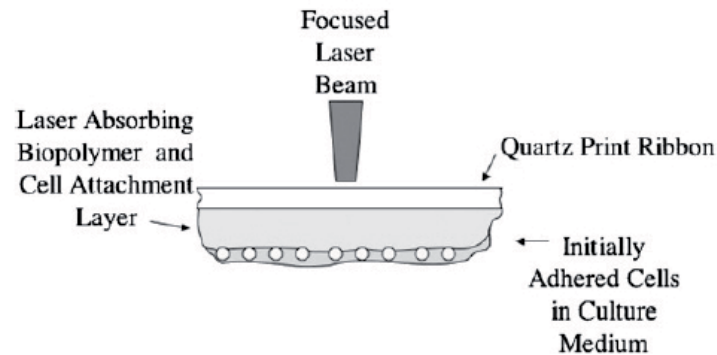


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des MAPLE-DW Verfahrens für das Drucken von lebenden Zellen aus [58]

den Schicht und dem biologischen Material, z.B. einer Zellsuspension, beschichtet ist, sowie (3) einem weiteren Glasträger (*Kollektor*), auf dem sich das gedruckte Material niederschlägt.

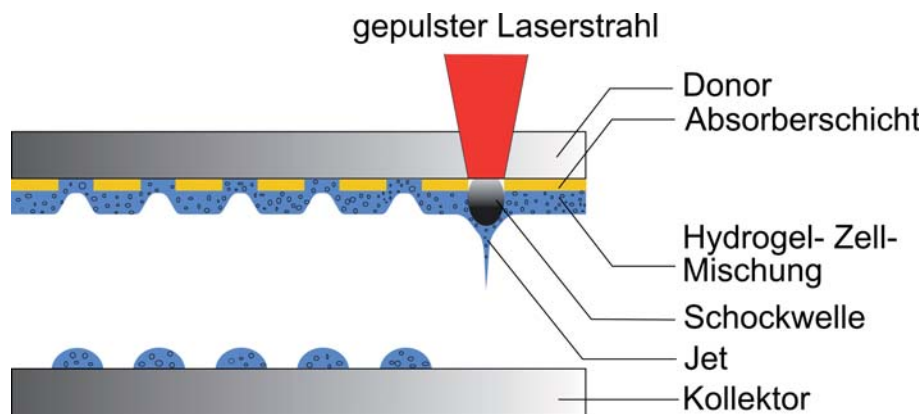


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Laserinduzierten Vorwärtstransfers mit Dynamic Release Layern

Unterschieden werden LIFT-DRL-Verfahren nach dem Material der Absorptionsschicht (im Folgenden *Absorber* genannt), welches sich nach dem eingesetzten Lasersystem richtet. Überwiegend kommen bei Nd:YAG-Lasern metallische Absorber wie z.B. Gold, Titan und Silber und bei Excimerlasern polymere Absorber wie z.B. Polyimid zum Einsatz. Bei allen Verfahren ist der Übertragungsprozess der biologischen Flüssigkeiten gleich (vgl. Abb. 2.9). Der Laserpuls wird auf die Grenzfläche zwischen Glas und Absorbiermaterial fokussiert. Dies führt zum Verdampfen der Goldschicht und eine Dampfblase dehnt sich aus, die die Fluidschicht ausbeult. Das Kollabieren der Dampfblase und die Massenträgheit des beschleunigten Fluides führen zu der Entstehung eines Jets, der die Flüssigkeit vom *Donor* zum *Kollektor* „fließen“ lässt. Diese Fluidodynamik wird eingehender im Kapitel 6.1 beschrieben.

Für jeden gedruckten Pixel bzw. übertragenen Flüssigkeitstropfen wird ein neuer Teil der Absorbierschicht durch einen Laserpuls verdampft und durch das Verfahren des Lasers relativ zu *Donor* und *Kollektor* wird das Druckbild auf dem *Kollektor* erzeugt. Hierbei entspricht ein Laserpuls einem gedruckten Pixel und die Druckgeschwindigkeit (Tropfen pro Sekunde) wird somit ausschließlich durch die Repetitionsrate des Lasersystems bestimmt.



Jüngste Weiterentwicklungen des LIFT-DRL-Verfahrens nutzen 4 bis 6 μm dicke Polyimid-schichten als Absorber und Lasersysteme, die im UV-Bereich emittieren. Durch die geringe Absorptionstiefe der UV-Laserstrahlung (ca. 0,75 μm in Polyimid [59]) wird nur ein geringer Teil der Absorberschicht verdampft und die Restschicht durch den entstehenden Dampfdruck ohne zu reißen ausgebeult. Dieses schnelle Ausbeulen der Absorberschicht beschleunigt das darüber liegende Fluid und es entsteht, ähnlich wie bei anderen LIFT-DRL-Verfahren, ein Fluidjet, der das Material von dem *Donor* zu dem *Kollektor* „fließen“ lässt. Das Bemerkenswerte an dieser technischen Abwandlung ist, dass das Fluid rein mechanisch übertragen wird und somit weder durch die Laserstrahlung noch durch Kontamination mit Ablationspartikeln der Absorberschicht beeinflusst wird, was insbesondere für das Drucken von lebenden Zellen eine Alternative zu herkömmlichen LIFT-DRL-Verfahren darstellt. Dieses Verfahren wurde allerdings erst kürzlich vorgestellt und noch nicht für das Drucken von Zellen eingesetzt, weswegen an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen wird [60, 61].

In den vergangenen Jahren konnte mit LIFT-DRL-Verfahren gezeigt werden, dass

1. Piko- bis Nanoliter-Volumen diverser Fluide mit unterschiedlichen rheologischen Eigenschaften kontrolliert gedruckt werden können [62–64],
2. beliebige Zellzahlen pro Tropfen, von einzelnen bis dutzenden Zellen, schädigungsfrei gedruckt werden können [56, 65],
3. Druckgeschwindigkeiten (Tropfen pro Sekunde) fast ausschließlich durch die Repetition-rate des verwendeten Lasersystems limitiert werden [64].

Die Flexibilität von LIFT-DRL-Verfahren spiegelt sich in den unterschiedlichen biologischen Applikationen wieder, für die dieses Druckverfahren in den letzten Jahren eingesetzt wurde. So konnten mittels LIFT-DRL-Verfahren einzelne [66] und mehrere unterschiedliche Zelltypen [67] Mikrometer-genau gedruckt werden, was neue Erkenntnisse über Zell-Zell- und Zell-Umgebungs-Interaktion ermöglicht. Neben dem Präzisionsdruck von Zellen sind aber auch großflächige Geometrien mit frei einstellbaren Zelldichten [58, 64, 65] realisierbar, was kombiniert mit der Nutzung vernetzbarer Fluide die computergesteuerte Erzeugung vollständiger Gewebegefüge ermöglicht, die z.B. in der Arzneimittelentwicklung aufwendige und ethisch bedenkliche Tierversuche ersetzen könnten.

Der weite Bereich von unterschiedlichen Auflösungen, die mit einer Drucktechnik realisiert werden können, ist ein Vorteil dieses laserbasierten Verfahrens. Würde man einen ähnlichen Bereich mit Tintenstrahldruckern und Spritzendruckern abdecken wollen, müsste man eine Kombination beider Systeme in einem technischen Aufbau realisieren. Ein weiterer Vorteil ist der düsenfreie Transfer von lebenden Zellen über den Fluidjet. Hierdurch werden Zellen nicht durch Scherkräfte am Düsenaustritt geschädigt und es können beliebig hohe Zelldichten gedruckt werden. Ein Nachteil im Vergleich zu düsenbasierten Drucksystemen liegt in der technisch aufwendigen Erzeugung von gleichmäßigen biologischen Fluidschichten mit homogener Zellverteilung auf dem Donor-Glasträger und darin, dass dieser mit der flüssigen Seite nach unten im Druckaufbau angebracht wird.

Die Genauigkeit des gedruckten Pixel bzw. des Tropfenvolumens mit einer definierten Anzahl eingebetteter Zellen wird bei LIFT-DRL-Verfahren von einer Vielzahl unterschiedlicher Prozessparameter bestimmt, wie:

1. der Charakteristik des Laserpulses, z.B. der zeitliche Länge, der Fokussiergeometrie, der Pulsform und -energie,



2. den Eigenschaften des Absorbermaterials, z.B. der Absorptionstiefe, der Schmelz- und Siedetemperatur sowie der Schichtdicke,
3. dem relativen Abstand des *Donors* zu dem *Kollektor*,
4. der Homogenität und Höhe der biologischen Fluidschicht.

Da die ersten drei Parameter sehr genau charakterisiert und eingestellt werden können, ist die Güte der biologischen Schichten der limitierende Faktor. Hierbei wird die Genauigkeit einer Fluidschicht maßgeblich von den rheologischen Eigenschaften des verwendeten Fluides bestimmt, wie der Viskosität, dem Benetzungsverhalten auf der Absorberschicht und der Oberflächenspannung. Hinzu kommt, dass lebende Zellen mit ihrer Fluidumgebung interagieren und nicht jedes Fluid für das Drucken von lebenden Zellen geeignet ist.

Im nächsten Kapitel wird deshalb näher auf geeignete Fluide und die Auswirkung ihrer rheologischen Eigenschaften auf die Erstellung von homogenen Schichten eingegangen.

2.2 Hydrogele als biologische Träger für Zellen

Zellen bestehen überwiegend aus Wasser, es dient der Aufrechterhaltung aller Funktionen der lebenden Zellen. Zudem stehen diese mit ihrer wässrigen Umgebung im ständigen dynamischen Austausch. Man unterscheidet hierbei zwischen dem intrazellulären (innerhalb der Zelle) und dem extrazellulären (Umgebung) Milieu. Das intrazelluläre Milieu strebt dabei immer ein Gleichgewicht mit dem Umgebungsmilieu an, was bereits 1929 von Walter Cannon [68] mit dem Begriff *Homöostase*⁹ beschrieben wurde. Cannon stellte zwei Gruppen von Faktoren vor, die bei allen Menschen aktiv geregelt und mit leichten lokalen Schwankungen um einen Mittelwert konstant gehalten werden:

1. Umgebungsbedingungen: Osmolarität, Temperatur und pH-Wert
2. funktionelle Substanzen: Nährstoffe, Wasser, Natrium, Kalzium, Sauerstoff etc.

Die Zellen versuchen also bei einer Änderung dieser Faktoren, die von dem Normwert abweicht, dies aktiv auszugleichen. Sobald diese Störung nicht mehr ausgeglichen werden kann, werden Zellen in ihren normalen Funktionen gestört oder irreversibel geschädigt. Um Zellen außerhalb eines Organismus lebensfähig halten zu können, müssen diese Faktoren extern geregelt werden, was man zum einen mit zellspezifischen Nährmedien und zum anderen mit der Kontrolle externer Einflüsse (Temperatur, Sauerstoffversorgung, CO₂-Gehalt etc.) gewährleistet.

Die Einhaltung dieser Gleichgewichtsfaktoren ist die *erste Grundbedingung*, die Flüssigkeiten bzw. Tinten erfüllen müssen, um für das Drucken von lebenden Zellen in Frage zu kommen. Die *zweite Grundbedingung* ergibt sich aus der technischen Notwendigkeit, Zellen dreidimensional anzuordnen, um die Struktur von natürlichem Gewebe möglichst genau mit Hilfe des Bioprinters zu reproduzieren. Die zelltragenden Fluide müssen dabei während des Druckprozesses von ihrem flüssigen Zustand in einen festen bzw. gelartigen Zustand überführt werden. Dieser Phasenübergang wird Sol-Gel-Transformation¹⁰ genannt und wird üblicherweise

⁹Aufrechterhaltung bzw. Regulierung relativ konstanter Bedingungen

¹⁰Ein Sol ist eine kolloidale Dispersion, d.h. eine Mischung aus Teilchen und einem anderem Medium.