

3D-Druck

Tinten für die Biofabrikation – Druckbarkeit vs. Biokompatibilität?

SONJA KUTH¹, MARKUS LORKE¹, RENATO FRISCHKNECHT², ALDO R. BOCCACCINI¹

¹ LEHRSTUHL FÜR WERKSTOFFWISSENSCHAFTEN (BIOMATERIALIEN), UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

² LEHRSTUHL FÜR TIERPHYSIOLOGIE/NEUROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

In biomaterial ink development, achieving optimal performance is a complex process. A biomaterial ink that shows excellent printability may be inferior in terms of cell compatibility. Properties facilitating printability of biomaterial inks include, among others, viscosity and stiffness. Research shows that stiffness plays a pivotal role in dictating cell response. Neurons used in this study require an exceptionally low matrix stiffness, which may not show best printability results when realized in a biomaterial ink.

DOI: 10.1007/s12268-023-2046-0

© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ 3D-Druck ist eine der bedeutendsten technologischen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte und hat neben der Nutzung in Industrie, Luft- und Raumfahrttechnik, Verkehr und vielen weiteren Branchen, auch seine Anwendung in der Biotechnologie und insbesondere im Tissue Engineering gefunden [1].

Im Gegensatz zu herkömmlichen Herstellungsmethoden ermöglicht der 3D-Druck die Herstellung spezialisierter, maßgeschneiderter Strukturen und somit die Durchführung komplexerer Experimente [1].

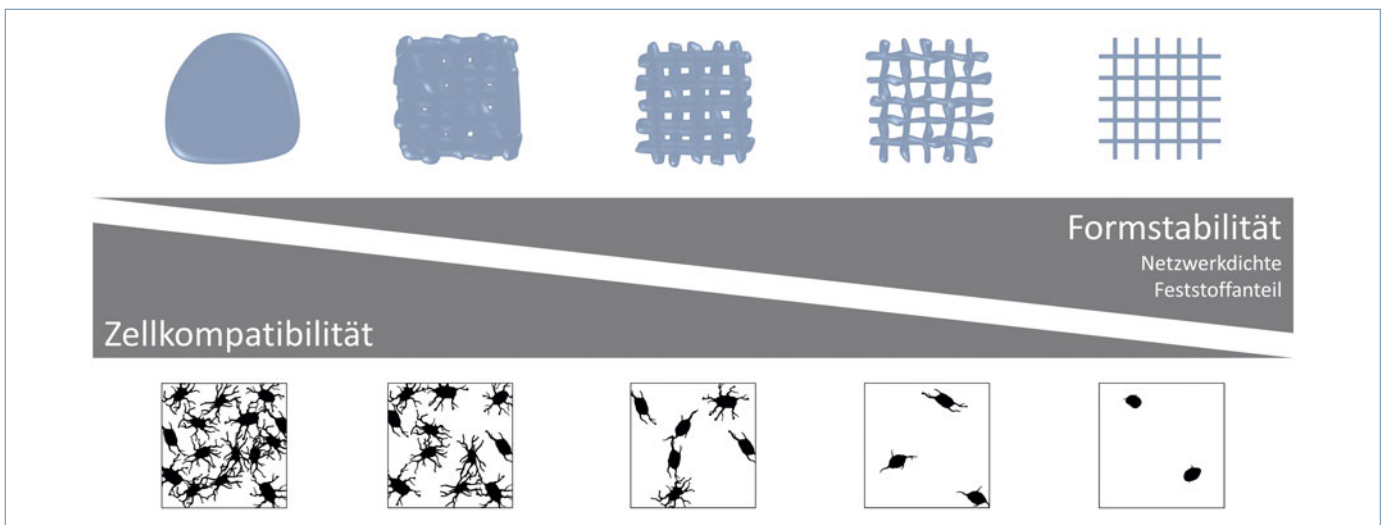
Ursprünglich für den industriellen Einsatz entwickelte 3D-Drucker sind in der Regel

jedoch nicht für die biomedizinische Anwendung ausgelegt, sondern auf den Druck von thermoplastischen Polymeren, Keramiken oder Metallen spezialisiert. Der Druckprozess erfordert hierbei meist hohe Temperaturen, toxische Lösungsmittel und Vernetzsubstanz [1].

Materialien, die als Tinte für den 3D-Druck im Bereich Biotechnologie und Tissue Engineering Anwendung finden, sollen nicht toxisch, biokompatibel und druckbar bei physiologischen Temperaturen sein. Weiterhin ist die Voraussetzung, dass die Stabilität und Mechanik der zugehörigen biomedizinischen Anwendung entsprechen.

Werden in ein Material Zellen untergemischt und anschließend 3D-gedruckt, so spricht man von einer „Biotinte“. Wird ein biokompatibles Material zellfrei 3D-gedruckt (und optional anschließend mit Zellen benetzt), bezeichnet man dies als „Biomaterial-Tinte“ [2].

Eine der größten Herausforderung bei der Entwicklung von Tinten für die biomedizinische Anwendung ist der Kompromiss zwischen guter Druckbarkeit und hoher Biokompatibilität. Die meisten Zellen erfordern ver-



▲ **Abb. 1:** Kompromiss zwischen Formstabilität und Zellkompatibilität bei der Entwicklung von Tinten für die 3D Biofabrikation. Die höchste Biokompatibilität und Zellviabilität wird meist bei niedrigen Viskositäten der Biotinte erreicht, was zu einer ungenügenden Formstabilität des gedruckten Konstruktes führt (linker Bereich). Mit höheren Viskositäten kann zwar eine exzellente Formstabilität erreicht werden, allerdings leidet hierbei oft die Viabilität der eingebetteten Zellen immens (rechter Bereich).

gleichsweise weiche Umgebungen, während Materialien mit hoher Viskosität oft eine bessere Druckbarkeit aufweisen [3]. Dieser erforderliche Kompromiss ist in **Abbildung 1** dargestellt. Eine der am häufigsten angewandte Materialkategorie für den Biodruck sind Hydrogele.

Hydrogele als ideale EZM imitierende Biomaterial-Tinte

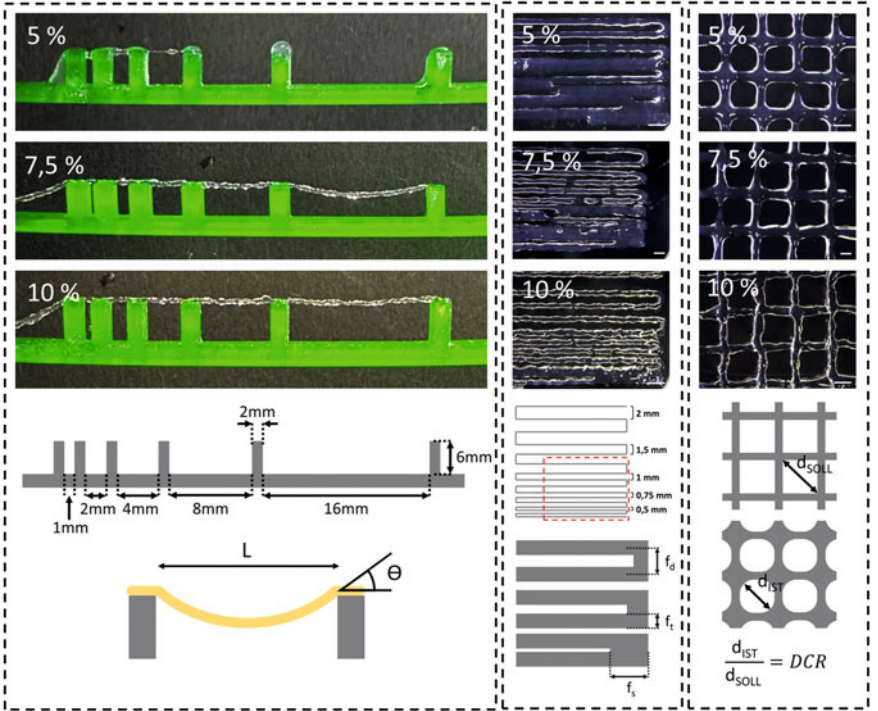
Hydrogele sind 3-dimensionale polymere Netzwerke, die in der Lage sind, große Mengen (bis zur 100-fachen Menge des eigenen Gewichts) an wässrigen Lösungen zu speichern [4]. Zur Herstellung eines Hydrogels werden hydrophile Polymere in Wasser oder wasserbasierten Flüssigkeiten gelöst und anschließend physikalisch, chemisch oder enzymatisch vernetzt [5]. Durch die Vernetzung wird die Struktur unlöslich in Wasser.

Die entstehende Mikrostruktur ähnelt im hohen Maße der Mikrostruktur der extrazellulären Matrix (EZM) natürlichen Gewebes [6]. Die EZM ist die nicht zelluläre Komponente in allen Geweben und Organen und fungiert als essenzielles physisches Gerüst für die zellulären Bestandteile [7]. Darüber hinaus liefert sie entscheidende biomechanische und biochemische Impulse, erforderlich für die Differenzierung, Homöostase und Morphogenese von Geweben [7]. Die EZM besteht grundlegend aus Wasser, Proteinen und Polysacchariden, wobei jeder Gewebetyp seine eigene, individuelle Zusammensetzung aufweist.

Variabilität von Hydrogelen

Einer der mitunter größten Vorteile von Hydrogel für die Anwendung als EZM-Imitation, neben der hohen Ähnlichkeit zur natürlichen EZM, liegt in ihrer beinahe unbegrenzten Möglichkeit zur Variation. Neben grundlegenden Entscheidungen, wie der Wahl des Polymers, des Vernetzers und des wässrigen Lösemittels, kann mit feinen Veränderungen des Feststoffanteils (bzw. der Konzentration), des Vernetzungsgrads und des Anteils an funktionellen Gruppen oder Wachstumsfaktoren das Hydrogel auf nahezu jede Gewebeart angepasst werden.

Eine Veränderung der Hydrogelparameter wird hierbei auch immer begleitet von einer Veränderung der Materialeigenschaften. Stabilität und Abbaubarkeit unter Zellkulturbedingungen, Netzwerkdichte, Steifigkeit und Viskosität (und damit Druckbarkeit) sind hier nur einige der beeinflussten Eigenschaften.



▲ **Abb. 2:** Drucktests einer Biomaterial-Tinte basierend auf Hyaluronsäure und Gelatine mit unterschiedlichem Feststoffanteil. Linke Spalte: Filament Collapse Test (FCT) ermittelt, wie weit ein gedruckter Strang abhängig von der Überhangsbreite absinkt, Mittlere Spalte: Filament Fusion Test (FFT) ermittelt den minimal möglichen Abstand zwischen zwei Filamenten ohne dass die Filamente fusionieren, f_d : filament distance/Filamentabstand, f_s : filament thickness/Filamentbreite, f_s fused filament length/Länge des fusionierten Filaments, Rechte Spalte: Grid Structure Test (GST) ermittelt die Formgenauigkeit des Drucks, indem bestimmt wird, wie nah die Form einer Pore der einer theoretisch perfekten Pore ist.

ten. Insbesondere die Konzentration der einzelnen Hydrogel-Komponenten zeigt einen signifikanten Effekt auf die Druckbarkeit des Hydrogels [8].

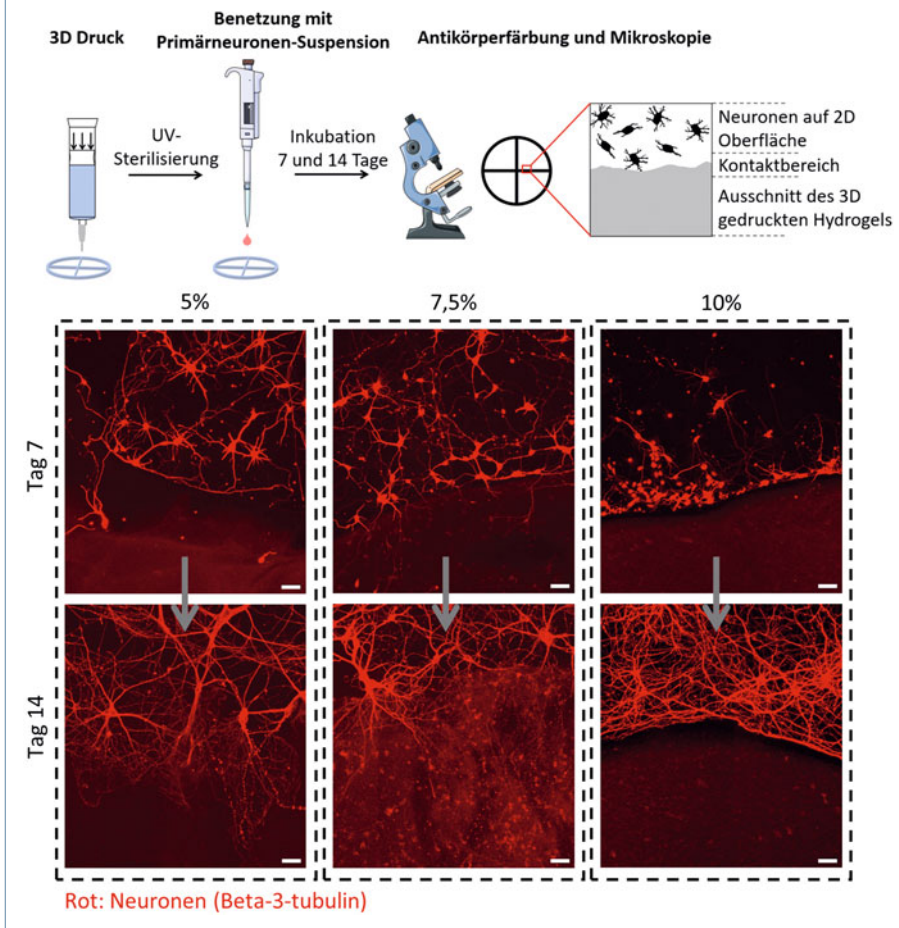
Bessere Druckbarkeit bei höherer Konzentration

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse verschiedener Drucktests eines Hydrogels mit variierender Konzentration. Drei Tests werden durchgeführt: der Filament Fusion Test

(FFT), der Filament Collapse Test (FCT) und der Grid Structure Test (GST). Mithilfe des FFT wird der maximale Abstand zwischen zwei Filamenten analysiert, ohne dass die Filamente zusammenfließen und nicht mehr zu unterscheiden sind [9]. Der FCT ermittelt, wie weit ein Filament zwischen zwei Stützen absinkt und bestimmt damit die maximal mögliche Weite eines Überhangs, ohne dass das Filament bis zum Boden absinkt oder abreißt [9]. Der GST analysiert die Präzision

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Evaluierung der Zellantwort von primären Neuronen bei Kontakt mit zuvor getesteten Biomaterial-Tinten. Oben: Versuchsablauf: Die verschiedenen Biotinten werden gedruckt und UV-sterilisiert. Die neuronalen Zellen werden in Suspension auf die Struktur aufgebracht und für 7 und 14 Tage kultiviert. Anschließend wird der Kontaktbereich mikroskopisch untersucht. Unten: Antikörperfärbungen der Neuronen mit deren Fortsätzen (Axone und Dendriten) nach 7 und 14 Tagen Kultur (Maßstab: 50 µm, rot: Neuronen (Beta-3-tubulin)). Die Biotinten mit den Konzentrationen 5 und 7,5 % fördern eine Infiltration der Fortsätze der Neuronen, was darauf hinweist, dass sie eine attraktivere Umgebung für das Wachstum der neuronalen Zellen bieten als die Biotinte mit der höchsten Konzentration von 10 %.

beim Druck eines Gitters, indem die Form der tatsächlichen Pore quantitativ mit einer „idealen“ Pore (rechteckig, nicht oval oder rund) verglichen wird (*diagonal cross ratio*, DCR) [10].

Das hier evaluierte Hydrogel ist eine Mischung aus modifizierter Hyaluronsäure und Gelatine, die enzymatisch mit mikrobieller Transglutaminase vernetzt wird [11]. Der Feststoffanteil in der Biomaterial-Tinte variiert zwischen fünf und zehn Prozent, während der Anteil des Vernetzers konstant gehalten wird.

Alle Drucktests zeigen ein qualitativ eindeutig besseres Druckergebnis bei höher konzentriertem Hydrogel. Im FCT (**Abb. 2** links) hängt der Strang mit der höchsten Konzentration (10 %) nahezu nicht durch, während bei der nächstniedrigeren Konzentration (7,5 %) nur bei der breitesten Überhangsstruktur ein leichtes Absinken zu beobachten ist. Währenddessen ist bei der nied-

rigsten Konzentration (5 %) kaum die Bildung eines Strangs ab einer Überhangbreite von vier Millimetern möglich.

Der FFT zeigt ein ähnliches Ergebnis: Lediglich bei der höchsten Konzentration können Filamente mit einem Abstand von 0,75 Millimeter abgelegt werden, ohne dass sie fusionieren. Bei einer Konzentration von 7,5 Prozent ist dies erst ab einem Abstand von einem Millimeter möglich und bei einer Konzentration von fünf Prozent erst bei einem Abstand von 1,5 Millimeter.

Einziger der GST zeigt ein leicht abweichendes Ergebnis: Die qualitativ beste Druckstruktur wird hier nicht mit der höchsten, sondern mit der mittleren Konzentration erzielt. Diese zeigt gleichmäßige Stränge und scharfe Kanten sowie annähernd quadratische Poren, während die Stränge der Tinte mit der höchsten Konzentration (10 %) unregelmäßig und agglomeriert erscheinen.

Dies bestätigt die zuvor genannte Abhängigkeit des Druckverhaltens von der Konzentration der Biomaterial-Tinte.

Neuronen infiltrieren gering konzentrierte Hydrogele stärker

Aus der Literatur geht hervor, dass unterschiedliche Zellen unterschiedlich steife Umgebungen *in vitro* bevorzugen [12]. Die Steifigkeit der hier gezeigten Hydrogele variiert zwischen etwa 1.000 Pascal für das Hydrogel mit der höchsten Konzentration (10 %), etwa 400 Pascal für die Tinte mit 7,5 Prozent Feststoffanteil und etwa 50 Pascal für die niedrigste Konzentration (5 %). Da neuronale Zellen eine Steifigkeit von 100–1.000 Pascal erfordern [12], liegen alle diese Biomaterial-Tinten theoretisch in einem für Neuronen geeigneten Bereich. Um das Verhalten von primären Neuronen bei Kontakt mit den oben gezeigten Tinten zu testen, wurde das schon in **Abbildung 2** bezüglich seiner Druckbarkeit evaluierte Hydrogel als simples Kreuz gedruckt und anschließend mit einer Zellsuspension, bestehend aus embryonalen Ratten-Neuronen, benetzt. Auf diese Weise wachsen die Neuronen, wie *in vitro* üblich, in 2D auf der Glasoberfläche, bis sie ab einem gewissen Entwicklungsstadium auf das gedruckte Hydrogel treffen. Das Verhalten der Zellen im Kontaktbereich wird im Folgenden evaluiert.

Nach 7 und 14 Tagen wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörperfärbung visualisiert (**Abb. 3**). Die gezeigten Aufnahmen blicken von oben auf die Proben und zeigen jeweils im oberen Teil einen Hydrogel-freien Bereich, auf dem die Zellen in 2D wachsen und im unteren Bereich einen Ausschnitt des 3D-gedruckten Hydrogels. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen sowie zwischen Tag 7 und Tag 14 ist klar erkennbar:

Während sich bei allen Proben die Neuronen im oberen 2D-Bereich vergleichbar entwickeln, zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Kontaktbereich zwischen Zellen und Hydrogel. Bereits an Tag 7 wird insbesondere für die Probe mit 7,5 Prozent Feststoffanteil eine Infiltration der Neuronenfortsätze, den Axonen und Dendriten, in die Hydrogelmatrix beobachtet. Der Effekt ist schwächer bei niedriger und nicht erkennbar bei höchster Hydrogelkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass hohe Netzwerkichte der Biomaterial-Tinte mit zehn Prozent Feststoffanteil eine für Neuronen nicht bevorzugte Umgebung darstellt. Dies wird nach 14-tägiger Kultur

zunehmend bestätigt: Obwohl die Neuronen in 2D weiter zufriedenstellend auswachsen, vermeiden sie jeden Kontakt mit dem daneben liegenden Hydrogel. Dieses Bild ist deutlich anders bei den Proben mit niedrigerer Konzentration. Bei 7,5 Prozent, und stärker noch bei fünf Prozent Feststoffanteil, ist eine deutliche, stark verzweigte Infiltration der neuronalen Fortsätze in das Hydrogel zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass bei niedrigerer Konzentration des Hydrogels die Tendenz der Neuronen zur Interaktion und Infiltration des Hydrogels stärker ausgeprägt ist.

Es ist anzumerken, dass die Aufnahmen für Tag 7 und Tag 14 nicht dieselben Proben zeigen, da diese für die Antikörperfärbung fixiert und anschließend nicht weiter kultiviert werden.

Kompromiss zwischen Druckbarkeit und Zellviabilität

Die oben gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der Entwicklung einer gleichzeitig in allen Aspekten optimalen Biomaterial-Tinte. In diesem Fall scheint die Biomaterial-Tinte mit einem Feststoffanteil von 7,5 Prozent die ideale Wahl, da nur diese zufriedenstellenden Ergebnisse sowohl in Bezug auf die Druckbarkeit als auch auf die Zellantwort zeigt.

Weitere, in diesem Artikel nicht diskutierte aber zusammenhängende, Parameter neben der Steifigkeit/Viskosität können die Zellantwort beeinflussen. Die verringerte Konzentration und damit verringerte Netzwerkdicke senkt nicht nur die Steifigkeit der Matrix, sondern erhöht auch die Abbaugeschwindigkeit und erleichtert damit die Infiltration der Zellen. Welcher dieser Parameter genau die Zellantwort am meisten beeinflusst, kann mit diesem Messaufbau jedoch nicht entkoppelt werden.

Die Balance zwischen den oben genannten Materialparametern und der Zellantwort zu finden, ist die größte Herausforderung bei der Entwicklung von Biomaterial-Tinten und Biotinten. In dieser Studie wurde eine Hydrogelmatrix in Vorbereitung vernetzt, gedruckt, sterilisiert und erst im Anschluss mit Zellen besät. Dies erlaubt die Verarbeitung der Tinte bei zellfeindlichen Bedingungen, wie z. B. Gelierung und Lagerung bei niedrigen Temperaturen, eine lange Probenherstellung und Sterilisierung mittels UV-Licht. Das hier gezeigte Material ist jedoch auch als Biotinte verwendbar, bei der die Zellen direkt in das Material gegeben wer-

den. In diesem Fall würden die Zellen in hochkonzentrierter Suspension mit dem vorher steril filtrierten Hydrogel-Präkursor (Hydrogellösung vor dem Vernetzen) gemischt und anschließend vernetzt und gedruckt werden [11]. Dieser Ansatz erlaubt vollkommen unterschiedliche Analysen des Zellverhaltens. Die Zellen stehen, dadurch dass sie in der künstlichen ECM eingebettet sind, sofort in direktem Kontakt mit dem Material und reagieren entsprechend.

Der hier gezeigte Ansatz beleuchtet andere Aspekte, die für die Materialentwicklung im biomedizinischen Bereich höchst interessant sind. Reagieren Zellen, insbesondere hochempfindliche Neuronen, derart, dass sie trotz Alternative aktiv ein Material infiltrieren, deutet das auf eine herausragende Biokompatibilität hin.

Danksagung

Die Autoren danken für die Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 460333672 CRC1540 EBM (Exploring Brain Mechanics).

Literatur

- [1] Mao H, Yang L, Zhu H et al. (2020) Recent advances and challenges in materials for 3D bioprinting. *Prog Nat Sci Mater Int* 30: 618–634
- [2] Groll J, Burdick JA, Cho D-W et al. (2019) A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* 11: 013001
- [3] Malda J, Visser J, Melchels FP et al. (2013) 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv Mater* 25: 5011–5028
- [4] Das S, Kumar V, Tiwari R, et al. (2018) Recent Advances in Hydrogels for Biomedical Applications. *Asian J Pharm Clin Res* 11: 62
- [5] Maitra J, Shukla VK (2014) Cross-linking in Hydrogels – A Review. *Am J Polym Sci* 4: 25–31
- [6] Geckil H, Xu F, Zhang X et al. (2011) Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Moon* 5: 469–484
- [7] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123: 4195–4200
- [8] Paxton N, Smolan W, Böck T et al. (2017) Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication* 9: 044107
- [9] Ribeiro A, Blokzijl MM, Levato R et al. (2018) Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication* 10: 14102
- [10] Hazur J, Röder J, Czwalinna J et al. (2023) Pre-Crosslinking with Hydrogel Microparticles Enhances the Printability of Alginate-Based Inks. *Macromol Mater Eng*, DOI: <https://doi.org/10.1002/mame.202200675>
- [11] Kuth S, Karakaya E, Reiter N et al. (2022) Oxidized hyaluronic acid-gelatin based hydrogels for tissue engineering and soft tissue mimicking. *Tissue Eng Part C Methods* 28: 301–313
- [12] Thiele J, Ma Y, Bruekers SMC et al. (2014) 25th anniversary article: Designer hydrogels for cell cultures: A materials selection guide. *Adv Mater* 26: 125–148

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der

genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr.-Ing. habil. Aldo R. Boccaccini
 Lehrstuhl Biomaterialien
 Universität Erlangen-Nürnberg
 Cauerstraße 6
 D-91058 Erlangen
aldo.boccaccini@fau.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Renato Frischknecht, Markus Lorke, Sonja Kuth und Aldo R. Boccaccini (v. l. n. r.)

Sonja Kuth

2013–2018 Studium der Materialwissenschaften an der Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2019 Promotion an der Universität Erlangen-Nürnberg im Bereich Biomaterialien zum Schwerpunkt „Development of ultra-soft hydrogels for nervous tissue applications“ unter der Anleitung von Prof. Dr. A. R. Boccaccini.

Markus Lorke

2017–2020 Studium Sports Engineering an der TU Chemnitz. 2020–2022 Studium Medizintechnik an der Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2023 Promotion an der Universität Erlangen-Nürnberg im Bereich Biomaterialien zum Schwerpunkt „Development and characterization of hydrogels for engineered brain tissue like matrices“ unter der Anleitung von Prof. Dr. A. R. Boccaccini.

Renato Frischknecht

1994–1999 Studium Biochemie an der Universität Zürich, Schweiz, dort Promotion bis 2004 im Bereich Neurobiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Sonderegger. 2005–2009 PostDoc am Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg, im Labor von Prof. Dr. E. Gundelfinger und ab 2009 Gruppenleiter ebenda. Seit 2016 Gruppenleiter an der Universität Nürnberg-Erlangen am Lehrstuhl für Tierphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. J. H. Brandstätter.

Aldo R. Boccaccini

1994 Promotion an der RWTH Aachen. 1994–1997 PostDoc an der University of Birmingham, UK, und University of California, San Diego, USA. 1997–2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Ilmenau. 2000–2009 Dozent und Professor am Imperial College London, UK. 2001 Habilitation an der TU Ilmenau. Seit 2009 Professor für Biomaterialien und Leiter des Lehrstuhls für Werkstoffwissenschaften (Biomaterialien) an der Universität Erlangen-Nürnberg.