

1 Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerfaces

T. Weiß, G. Hildebrand, R. Schade, K. Liefeith

1.1 Einleitung

Zellen sind in natürlichen Geweben eingebettet in dreidimensionale Netzwerke von fibrillären Biopolymeren (Collagene, Hyaluronsäure, etc.). Durch diese extrazelluläre Matrix (ECM) wird die Zelldifferenzierung gesteuert und die strukturelle Integrität des Gewebes aufrechterhalten [1]. Für die dreidimensionale Zellkultur im Rahmen von biomedizinischen Anwendungen (Tissue Engineering, BioMEMS) werden durch Mikrostrukturierungsverfahren Zellträgerstrukturen hergestellt, die der natürlichen ECM im Hinblick auf Material- sowie Strukturkompatibilität nachgebildet sind. Maßgeschneiderte Scaffolds werden für die dreidimensionale Kultivierung von Chondrozyten zur Herstellung von künstlichem Knorpel eingesetzt und in struktureller Hinsicht optimiert.

Zwei-Photonen-Techniken sind hierfür aus zwei Gründen von Bedeutung: Erstens steht mit der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) ein Verfahren zur Mikro- und Nanostrukturierung von dreidimensionalen Zellträgern aus biokompatiblen und biodegradierbaren ECM-analogen Materialien zur Verfügung [2]. Zweitens erlaubt die Zwei-Photonen-Mikroskopie (TPLSM) eine schonende online-Visualisierung des Zellverhaltens bzw. -wachstums in den dreidimensionalen Zellträgern bis in Tiefen von mehreren hundert Mikrometern [3,4].

Zwei-Photonen Techniken basieren auf dem Effekt, dass die Photonendichte fokussierter Femto-sekundenlaserstrahlung lateral und axial begrenzt ist. Photonenge-triggertere Ereignisse wie die Autofluoreszenz bei der TPLSM oder die radikalische Photopolymerisation bleiben auf das Fokusvolumen beschränkt und erlauben damit die dreidimensionale Abbildung bzw. die freie dreidimensionale Strukturierung.

1.2 Zwei-Photonen Polymerisation (2PP) zur Herstellung von Zellträgerstrukturen

Die 2PP ist eines der innovativsten Verfahren zur freien dreidimensionalen Mikro und Nanostrukturierung polymerer Materialien. Das Verfahren beruht auf der Auslösung eines Polymerisationsvorgangs innerhalb einer flüssigen Monomerlösung im Fokus eines NIR-Ultrakurzzeitlaser (Ti:Sa

Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerfaces

Femtosekundenlaser). Während die radikalische Photopolymerisation (meth-)acrylierter Monomere mittels UV-Licht (250-400 nm) lange bekannt und ein Standardverfahren z.B. in der Lackierungstechnik ist, arbeitet die 2PP mit langwelliger gepulster NIR –Laserstrahlung (700-900 nm) hoher Peakintensität und wurde erst vor etwa 15 Jahren erstmalig demonstriert [2]. Durch den Zwei-Photonen-Effekt bleibt die photonengetriggerte Reaktion auf das Fokusvolumen beschränkt wodurch auch innerhalb der Bulkphase einer Monomerlösung polymerisiert werden kann (Abbildung 1).

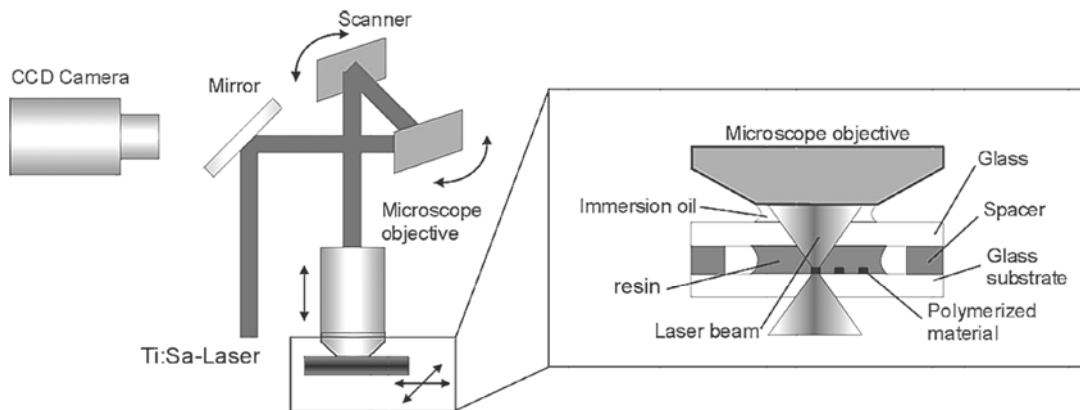
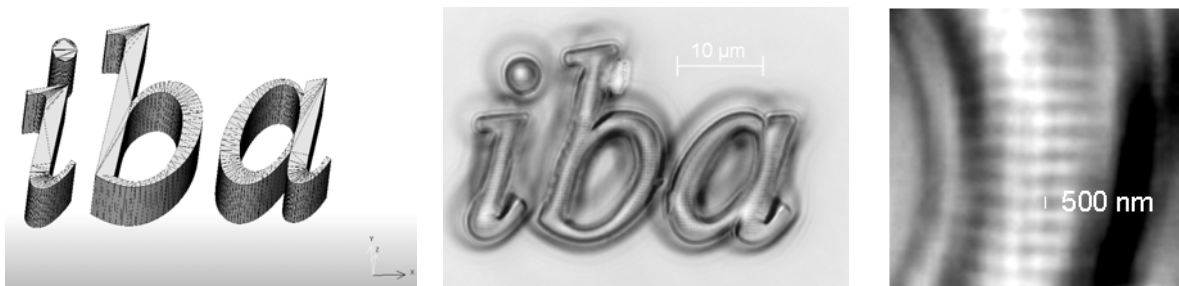


Abb. 1: Schema der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP).

Die Auflösung ist begrenzt durch das Fokusvolumen der Laserstrahlung welches wiederum abhängig ist von der Numerischen Apertur (N.A.) des verwendeten Objektivs. Bei Verwendung eines Öl-Immersionsobjektivs mit N.A. 1,4 beträgt das Fokusvolumen nur etwa 1 Femtoliter, was einer Strukturauflösung von 1 μm entspricht. Durch Arbeiten an der Polymerisationsschwelle kann die Auflösung sogar bis ca. 100-300 nm erhöht werden (Abbildung 2).



Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerfaces

Abb. 2: 2PP-generierte 3D-Struktur auf der Basis des STL-File (links) des Instituts-Logos (50 x 30 x 10 μm , Ormocer®, Hatching: Woodpile: 0,5 μm), Mitte: Phasenkontrast. Rechts: vergrößerter Ausschnitt.

Die außerordentliche Flexibilität zur Erzeugung dreidimensionaler Mikrostrukturen verdankt die 2PP den Freiheitsgraden hinsichtlich der Bewegung des Laserfokus im Inneren der polymerisierbaren Lösung unter Ausnutzung des Zwei-Photonen-Effektes durch ein dreiaxiales x, y, z - Nanopositioniersystem. Computergenerierte 3D Modelle von Zielstrukturen (STL-Files, Abbildung 2) werden in einem automatisierten Verfahren (hatching) durch Stapel sich kreuzender Linien (woodpile, Abbildung 3) ausgefüllt und dadurch im Volumen verfestigt. Ein Nachteil der 2PP ist die serielle Erzeugung der Strukturen mit einem einzigen bewegten Laserfokus. Die maximale Vorschubgeschwindigkeit beträgt momentan 30 mm pro Sekunde. Strukturen von 100 x 100 x 100 μm erfordern entsprechende Bearbeitungszeiten. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Schreibgeschwindigkeit besteht in der Verwendung von Objektiven geringerer N.A. Bei einem Objektiv mit N.A. 0,9 weitet sich der Fokus auf ca. 5 μm Durchmesser. Bei noch geringerer N.A. geht jedoch zunehmend die axiale Begrenztheit des Fokus (Ortsauflösung in z-Richtung) verloren.

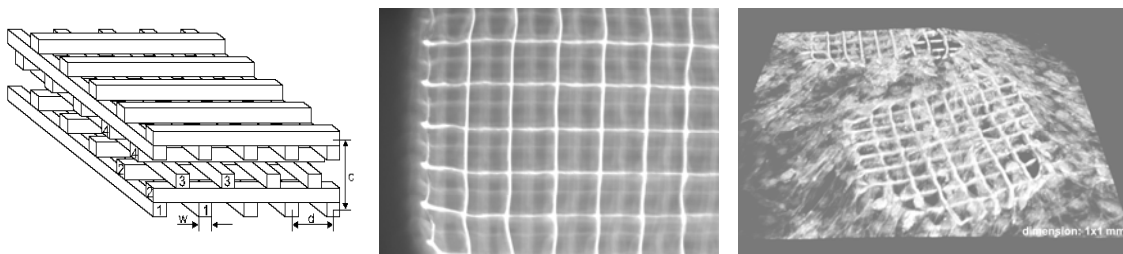


Abb. 3: Links: Woodpile Strukturen werden durch den x, y Abstand (d) und den z-Abstand (c) charakterisiert. Die Linienbreite (w) ergibt sich durch die N.A. des verwendeten Objektivs (0,9). Mitte: Die Woodpile-Struktur (Ormocer®, N.A. 0,9, 180 mW, 750 nm) zeigt Eigenfluoreszenz aufgrund des im Polymer verbliebenen Photoinitiators. Rechts: Bovine Chondrozyten nach dreitägiger Kultur auf einem 2PP generierten Zellträger.

1.3 Zellkulturuntersuchungen auf 2PP generierten Zellträgern

Die dreidimensionale Zellkultur von Chondrozyten muss als ein Meilenstein auf dem Weg zur physiologisch adäquaten *ex-vivo* Gewinnung von künstlichem Knorpel für den Gelenkersatz gewertet werden. Das Wachstum, die Funktion sowie die Differenzierung von Zellen im dreidimensionalen Zell-/Gewebeverband werden maßgeblich durch das spezifische räumliche Umfeld der Zellen beeinflusst.

In Zellkulturuntersuchungen mit bovinen Chondrozyten auf Zellträgern auf der Basis von Ormoceren[®] konnte gezeigt werden, dass die Maschenweite der Zellträgerstrukturen das Zellwachstum beeinflusst. Bei kleinen Abständen (<30 µm) werden die Zellen durch die Linienstrukturen ausgerichtet, können aber nicht in diese einwandern. Bei Abständen zwischen 50 und 80 µm zeigen die Zellen eine Ausrichtung an den Zellträgerstrukturen und darüber hinaus ein Einwandern und Ausfüllen des dreidimensionalen Netzes (3D-Zellkultur). Bei noch größeren Abständen wachsen die Zellen an den Wandungen der Zellträgerstrukturen ohne jedoch die Hohlräume vollständig ausfüllen zu können. Auch ist die Stabilität der Strukturen bei Abständen > 120 µm nicht mehr gegeben (Abbildung 3 und 4).

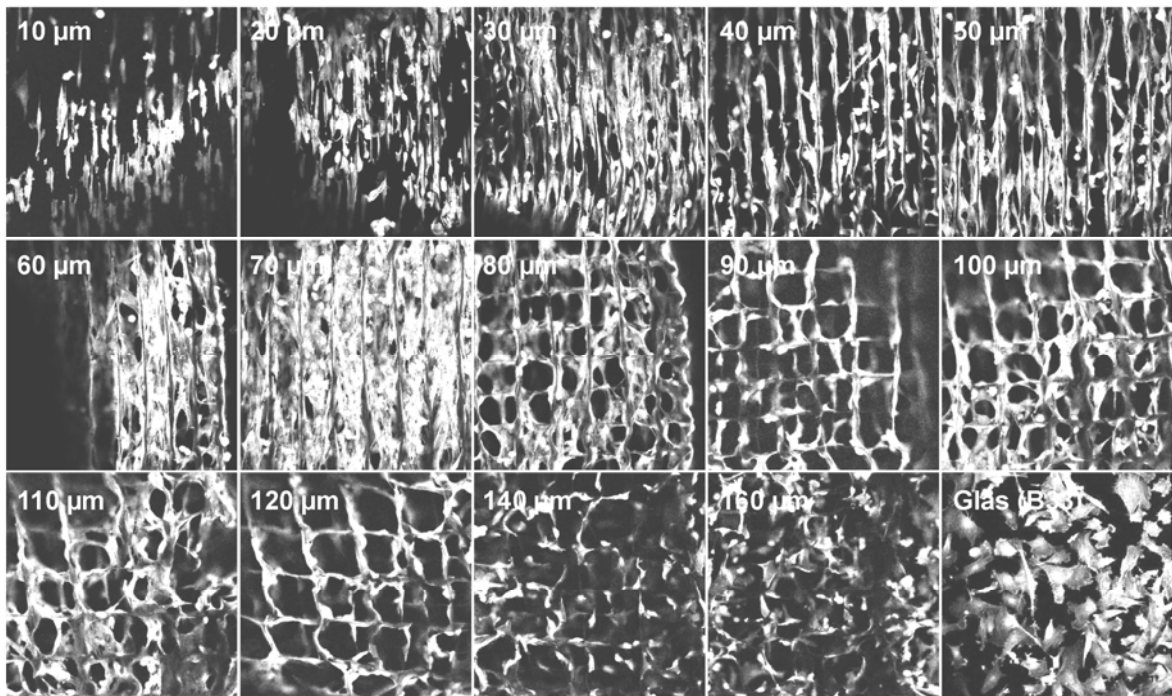


Abb. 4: Bovine Chondrozyten, kultiviert auf Woodpile-Strukturen bestehend aus Ormoce-

re[®] mit unterschiedlichen Strukturbreiten.

1.4 Materialentwicklungen

ORMOCERE[®] sind häufig für die 2PP eingesetzte Materialien (Entwicklung des Fraunhofer-Instituts für Silicatiforschung, ISC). Diese anorganisch-organischen Hybridmaterialien zählen zur Klasse der flüssigen negativen Photo-Resins. Die Eigenschaften dieses nanoskaligen Materials können durch chemische Verfahren maßgeschneidert werden. Der Polymerisierungsprozess wird hier durch radikalisch reagierende Photoinitiatoren wie Irgacure 369 Ciba getriggert. Aufgrund ihrer Bioverträglichkeit sind medizinische Anwendungen 2PP-generierter Strukturen möglich. Wesentliche Arbeiten hierzu wurden im Laser Zentrum Hannover e.V. (LZH) durchgeführt. Bisher wurden jedoch nur ansatzweise Trägerstrukturen für Tissue Engineering-Applikationen entwickelt und untersucht [5]. Obwohl ORMOCERE[®] biokompatibel sind und aufgrund ihres Hybridcharakters (Keramik und Polymer) vorteilhafte Materialeigenschaften aufweisen, entsprechen die daraus generierten Strukturen aufgrund fehlender Bioabbaubarkeit bisher jedoch nicht ECM-analogen Biointerfaces. Es wird erwartet, dass die Zellantwort auf Zellträgern aus Materialien biologischen Ursprungs wie Collagene, Hyaluronsäure, Alginat oder Dextran weiter verbessert werden kann. Erste erfolgreiche Versuche zur 3D-Strukturierung von methacrylierter Hyaluronsäure und zur Singulett-Sauerstoff vermittelten Vernetzung von BSA bzw. Collagen Typ 1 mit Rose Bengale als Photosensitizer [6] mittels 2PP wurden durchgeführt. Allerdings waren die Strukturen aufgrund von zu geringer Photovernetzung mechanisch noch nicht hinreichend stabil. Weitere Untersuchungen dienen der Optimierung der Photovernetzung durch Erhöhung der Anzahl vernetzbarer Gruppen in den Biopolymeren, durch Variation von Typ und Konzentration der eingesetzten Photoinitiatoren sowie durch Optimierung von Energie und Wellenlänge der Laserstrahlung.

In einem weiteren Ansatz wurden 2PP-vernetzte synthetische bioabbaubare Diethyleneglycol/ α -Hydroxycarbonsäure-Copolymere sowie Methacrylat terminierte Polyglycerine, die in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner INNOVENT e.V. Jena entwickelt wurden, auf ihre Eignung als biokompatibles Zellträgermaterial hin untersucht. Die Strukturierbarkeit und Biokompatibilität einiger Monomere mit unterschiedlichen Anteilen Diethyleneglycol/ α -Hydroxycarbonsäure bzw. unterschiedlicher Anzahl photovernetzbarer Gruppen konnte gezeigt werden.

Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerfaces

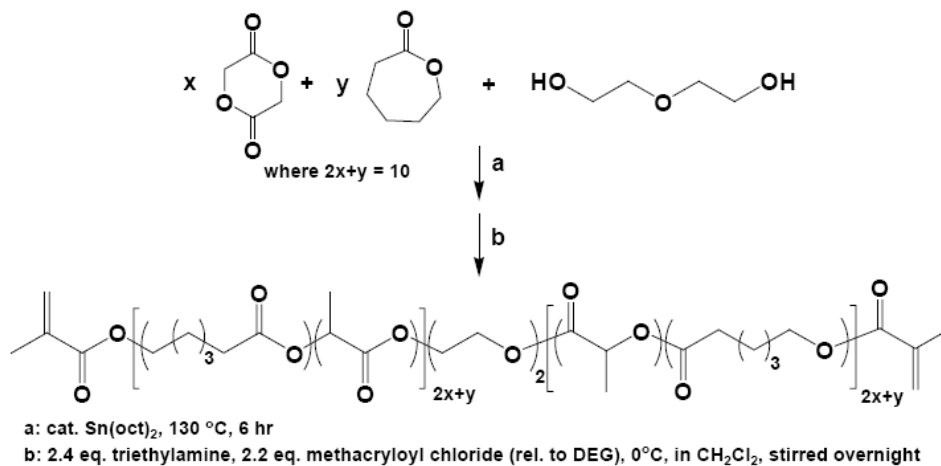


Abb. 5: Syntheschema für Diethylenglycol/ α -Hydroxycarbonsäure-Copolymere mit photopolymerisierbaren Endgruppen [7].

1.5 Zusammenfassung

Mittels Zwei-Photonenpolymerisation können sehr flexibel 3D-Mikrostrukturen aus einer Vielzahl biokompatibler Materialien mit einer Auflösung von $< 1\mu\text{m}$ hergestellt werden. Es können Zellträger designed werden, die eine zielgerichtete Zellantwort für unterschiedliche biomedizinische Anwendungen induzieren. Des Weiteren können Materialien evaluiert werden, die für die speziellen Anforderungen unterschiedlicher Zelltypen besonders geeignet sind.

Neben Anwendungen in der biomedizinischen Technik und im Tissue Engineering ist die dreidimensionale Mikro- und Nanostrukturierung biokompatibler Materialien vor allem in der Mikrosystemtechnik von Interesse (Cells on a Chip) [8]. Die präzise Kontrolle der zellulären Mikroumgebung ermöglicht ein tieferes Verständnis der biochemischen und biomechanischen Prozesse, die für das Zellverhalten verantwortlich sind [9].

1.6 Referenzen

- [1] Lutolf M P and Hubbell J A (2005) *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*, Nature Biotechnology 23: 47-55.
- [2] LaFratta, C N (2007) *Multiphoton Fabrication*, Angewandte Chemie International Edition 46: 6238-6258.
- [3] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W (2003) *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*, Nature Biotechnology 21: 1369-1377.
- [4] Martini J, Tönsing K, Dickob M, Schade R, Liefelth K, Anselmetti D (2006) *Two-photon laser scanning microscopy on native cartilage and collagen membranes for tissue engineering*, Proc. SPIE Vol. 6089: 274-282 in: Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences VI, A. Periasamy, P.T. So (eds.), ISBN: 0-8194-6131-8.
- [5] Schlie S, Ngezahayo A, Ovsianikov A, Fabian T, Kolb H A, Haferkamp H, and Chichkov B N (2007) *Three-dimensional cell growth on structures fabricated from ORMOCER by two-photon polymerization technique*, J Biomater Appl 22: 275-87.
- [6] Pins, G D (2006) *Multiphoton excited fabricated nano and micro patterned extracellular matrix proteins direct cellular morphology*, Journal of Biomedical Materials Research Part A 78A: 194-204.
- [7] Davis K A, Burdick J A, and Anseth K S (2003) *Photoinitiated crosslinked degradable copolymer networks for tissue engineering applications*, Biomaterials 24: 2485-95.
- [8] El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F (2006) *Cells on chips*, Nature 442: 403-411.
- [9] Dusseiller M R, Smith M L, Vogel V, and Textor M (2006) *Microfabricated three-dimensional environments for single cell studies*, Biointerfaces 1: 1-4.

Autoren:

Dr. T. Weiß, iba, Rosenhof, 37308, Heiligenstadt, 03606-671246, thomas.weiss@iba-heiligenstadt.de (Autor)

Dr. G. Hildebrand, iba, Rosenhof, 37308, Heiligenstadt, 03606-671171, gerhard.hildebrand@iba-heiligenstadt.de (Co-Autor)

Dr. R. Schade, iba, Rosenhof, 37308, Heiligenstadt, 03606-671192, ro-nald.schade@iba-heiligenstadt.de (Co-Autor)

Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerfaces

Dr. K. Liefeith, iba, Rosenhof, 37308, Heiligenstadt, 03606-671170,
klaus.liefeith@iba-heiligenstadt.de (Co-Autor)