

Mikrothermogeformte Polymerfolien für die 3D-Kultur in Bioreaktoren

S. Giselbrecht, E. Gottwald, A. Welle, K.-F. Weibezahn, IBG; R. Truckenmüller, IMT; C. Trautmann, GSI, Darmstadt

Einleitung

Die Herstellung und der Erhalt dreidimensionaler Zellkulturen mit organotypischen Eigenschaften ist nicht nur in der Biologie ein zentrales Thema, sondern auch in engverwandten Bereichen wie der Medizin und der Pharmazie, z. B. als Gewebeersatz, als verbessertes Modell für Wirkstoff- und Toxizitätstests oder für biohybride Organunterstützungssysteme [1, 2]. Die Methoden und Ansätze zur Erzeugung und Kultivierung solcher funktionaler Gewebe im Labor wurden vor einigen Jahren unter dem Begriff „Tissue Engineering“ in einem neuem Wissenschaftsfeld zusammengefasst [3, 4]. Dieses sehr junge Feld basiert auf einem stark

interdisziplinären Ansatz aus den Bereichen der Biologie, Material- und Ingenieurwissenschaften. Eine enge und zielgerichtete Zusammenarbeit dieser Fachgebiete ist unerlässlich, um sowohl für die zellbasierte Anwendung, als auch für den Anwender geeignete und zuverlässige Gerüststrukturen und Bioreaktoren herstellen zu können. Viele Jahre wurde aber vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit auf die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung und besonders mit technischen Oberflächen gelegt. Wie aktuelle Publikationen in diesem Bereich jedoch deutlich unterstreichen, ist gerade der Faktor der Mikroumgebung ein ganz entscheidender im Hinblick auf Entwicklung und Funktionalität der Zellen [5-7].

CellChip – Gerüststruktur im Chip-Format

Der am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte CellChip ist eine mikrostrukturierte Gerüststruktur für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen (siehe Abb. 1) [8, 9]. Die zentrale Idee der planaren Anordnung von gleich großen und identisch geformten Mikrocontainern mit porösem Boden dient dazu, möglichst alle Zellen, die in den Containern kultiviert werden, gleichmäßig mit Nährmedium versorgen zu können. Die Größe der Mikrocontainer (300 μm Kantenlänge im kubischen Design) ist dabei so gewählt, dass die maximale Diffusionsstrecke in den Zellaggregaten, ähnlich wie in vielen

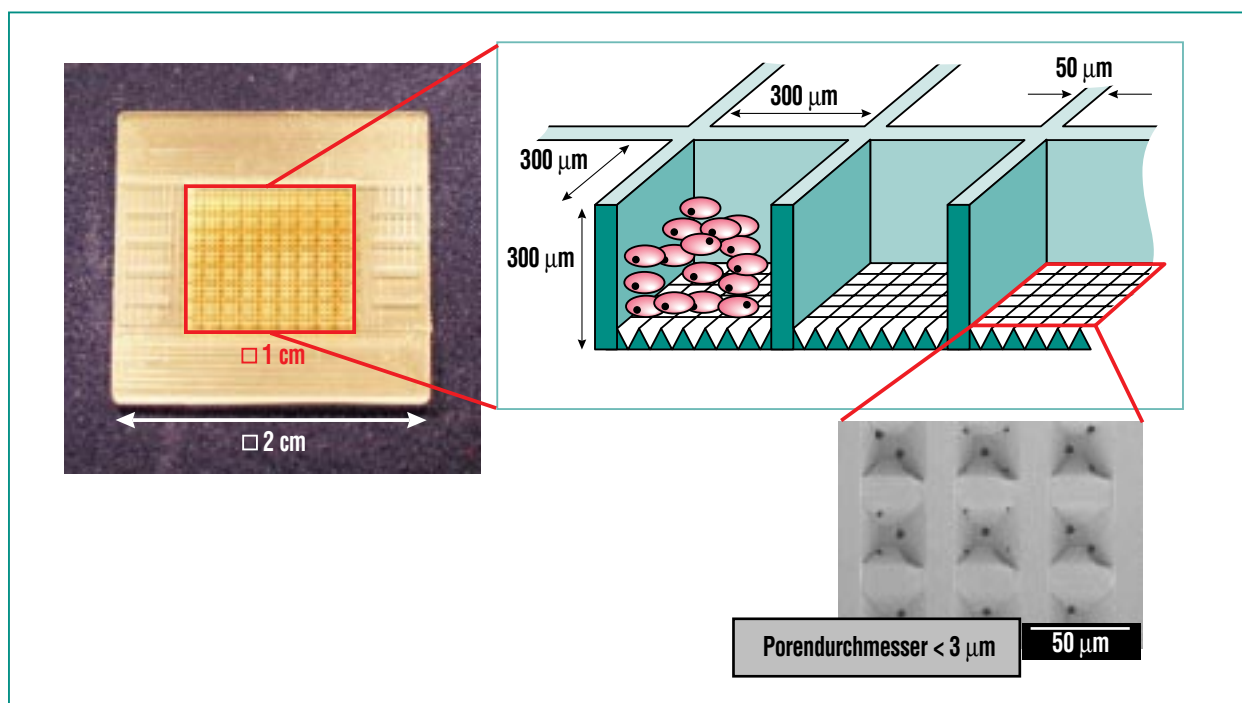


Abb. 1: Links: Foto eines mikrospritzgegossenen CellChips aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit den Außenabmessungen 2 x 2 cm². Die rechte schematische Abbildung zeigt Zellen dreidimensional kultiviert in kubischen Mikrocontainern mit einer Kantenlänge von 300 μm . Unten: Ausschnitt aus dem Bodenbereich eines Mikrocontainers (REM, Balken 50 μm). Eine aktive Versorgung der Zellen mit Nährmedium erfolgt u. a. durch den porösen Boden. Die Größe der Poren ist kleiner als 3 μm , damit Zellen nicht durch die Poren wandern können.

natürlichen Geweben, nicht mehr als 150 µm beträgt. Dies stellt sicher, dass selbst bei einer Versorgung nur durch Diffusion möglichst alle Zellen ausreichend mit Nährstoffen und Gasen versorgt werden und ein ausreichender Abtransport von Stoffwechselprodukten gewährleistet wird.

Die flächige, chipförmige Ausgestaltung ermöglicht zudem eine sehr hohe Variabilität hinsichtlich einer aktiven Umströmung der Zellkultur innerhalb speziell entwickelter Bioreaktoren. So können die Zellen mit Nährmedium ober- und/oder unterhalb parallel zur Fläche der Mikrocontainer angeströmt werden (Superfusion) oder das Medium kann flächig sowohl von der Oberseite als auch von der Unterseite homogen durch alle Mikrocontainer gepumpt werden (Perfusion). Zusätzlich können diese verschiedenen Varianten kombiniert werden, so dass eine große Anzahl von Freiheitsgraden bezüglich der Mediumversorgung besteht. Dadurch können z. B. physikalische oder chemische Gradienten (z. B. Sauerstoffpartialdruck) über dem künstlichen Gewebe erzeugt und gezielt genutzt werden.

Herstellung

Der CellChip ist als eine standardisierbare Zellkulturplattform konzipiert, die eine Langzeitkultivierung künstlicher Gewebe für Anwendungen in den Bereichen der Grundlagenforschung, der klinischen Forschung bzw. Therapie sowie der pharmazeutischen Forschung ermöglichen soll. Die Anforderungen an den Herstellungsprozess gehen damit weit über die bloße Sicherstellung der Biokom-

patibilität der Herstellungsverfahren und der verwendeten Materialien hinaus. Neben der unverzichtbaren biologischen Verträglichkeit des Systems muss eine hohe Reproduzierbarkeit der Geometrie der Strukturen und der Materialeigenschaften gewährleistet werden. Zusätzlich muss die Fertigung hoher Stückzahlen dieses Einwegproduktes, wie sie z. B. im Bereich der Wirkstoffforschung erwartet werden, auch ökonomischen Gesichtspunkten genügen.

Basierend auf der Spritzgusstechnologie wurde zusammen mit dem Institut für Materialforschung (IMF I und III) bislang nur eine kleinserientaugliche Fertigung des CellChips realisiert, da mit Hilfe dieses Prozesses nur eingeschränkt dünnwandige Mikrostrukturen hergestellt werden können. Aufgrund dessen konnten CellChips nur mit einem vergleichsweise dicken Boden gefertigt werden, der jedoch wiederum eine nachträgliche Mikroperforation (Porendurchmesser < 3 µm), beispielsweise per Laserablation, deutlich erschwert, sodass hier eine aufwändige Nachbearbeitung der Spritzgussteile unerlässlich ist.

Neues Verfahren

Ein neues, vielversprechendes Verfahren für die Fertigung des CellChips basiert auf dem Thermoformen dünner Kunststofffolien zur Herstellung dreidimensionaler und sehr dünnwandiger Produkte. Das makroskopische Verfahren wird bereits seit vielen Jahrzehnten industriell genutzt, beispielsweise um dünnwandige und leichte Verpackungen im Lebensmittelsektor, wie beispielsweise Trink- oder Joghurtbecher, herzustellen.

Am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) wurde vor einigen Jahren weltweit zum ersten Mal gezeigt, dass dieses Verfahren in modifizierter Weise auch zur Herstellung mikrotechnischer Produkte geeignet ist [10]. Daraufhin wurde fachübergreifend in einer engen Kooperation mit dem Institut für Biologische Grenzflächen dieses als Mikrothermoformen bezeichnete Verfahren insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Fertigung des CellChips charakterisiert und weiterentwickelt.

Erste Formwerkzeuge für das Thermoformen von CellChips wurden mikromechanisch am Institut für Mikroverfahrenstechnik (IMVT) gefertigt. Das Werkzeug besteht dabei aus zwei parallelen metallischen Platten, einer mikrostrukturierten Formplatte und einem Gegenwerkzeug, in welches Bohrungen für die Evakuierung und für das Druckgas sowie eine Silikonichtung integriert sind. Das Design des CellChips wurde für dieses Verfahren modifiziert. Die Negativ-Formwerkzeuge umfassen hierfür eine Anordnung von 25 x 25 zylinderförmigen Kavitäten mit einem Durchmesser und einer Tiefe von jeweils 300 µm. Zur Herstellung werden 25–100 µm dünne Kunststofffolien eingesetzt. Als Material kommen prinzipiell alle thermoplastisch verarbeitbaren und biokompatiblen Kunststoffe in Frage. Diese umfassen dabei sowohl biostabile als auch bioabbaubare Polymere (z. B. Polycarbonat, Polystyrol, Polymethylmethacrylat, Cycloolefin (Co-)Polymer, Polycaprolacton, Polymilchsäure). Letztere sind zukünftig insbesondere für spezielle Anwendungen im Bereich

der Implantationsmedizin interessant.

In einem ersten Schritt wird die Folie im evakuierten Werkzeug mit hoher Kraft zwischen den beiden Platten eingeklemmt und auf Formtemperatur geheizt. Bei amorphen Thermoplasten liegt die Formtemperatur typischerweise im Bereich der Glasübergangstemperatur und bei teilkristallinen nahe der Schmelztemperatur, d. h. die Folie wird erweicht aber nicht geschmolzen. Durch das einseitige Beaufschlagen der geklemmten Folie mit einem unter Druck stehenden Gas wird die Folie in die zuvor evakuierten Kavitäten der Formplatte verstreckt. Durch die Verstreckung der Folie wird ihre Dicke auf bis zu 5–10 μm im Bodenbereich reduziert (siehe Abb. 2). Nach dem Abkühlen des Formwerkzeuges kann das Druckgas entspannt und die Folie aus der Formplatte entformt werden.

Ein wichtiger Aspekt des Mikrothermoformens, der dieses Verfahren von bestehenden Verfahren der polymeren Mikroreplikation (z. B. Mikro-Spritzguss) abhebt, ist die Formung des Polymers in einer entropieelastischen Phase, d. h. das Polymer wird nicht geschmolzen und es besteht ein permanenter Materialzusammenhalt während des Formvorgangs. Daraus resultieren sehr spezifische Eigenschaften für das Formteil, wie sie mit anderen mikrotechnischen Verfahren nur sehr schwer oder bisher gar nicht realisiert werden konnten. So können z. B. sehr dünnwandige, flächige Mikrostrukturen mit sehr geringen Oberflächenrauigkeiten auch an Seitenwänden, mit hoher Flexibilität und hoher optischer Transparenz gefertigt wer-

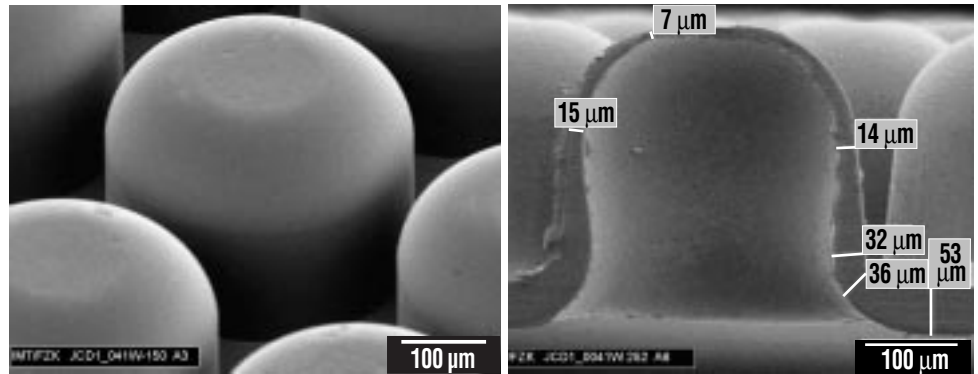


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mikrothermoformierter CellChips. Die linke Abbildung zeigt einige Mikrocontainer des CellChips von der Rückseite (Durchmesser und Tiefe der Mikrocontainer: ca. 300 μm , Material: Cycloolefin Polymer COP). Die rechte Abbildung zeigt die deutliche Wandstärkenverteilung anhand eines einzelnen geschnittenen und auf den Kopf gedrehten Mikrocontainers.

den. Aufgrund der Dünnwandigkeit ist auch ein effektiver Wärmeaustausch trotz der Isolatoreigenschaften des Kunststoffes denkbar, so dass Medien in thermoformierten Mikrostrukturen schnell erwärmt oder auch entwärmt werden können (beispielsweise für die Kryokonservierung von Zellen).

Auf der Grundlage dieser Materialkohärenz während des Formprozesses wurde das sogenannte SMART-Verfahren (Substrate Modification And Replication by Thermoforming, siehe Abb. 3) als eine spezielle Sequenz von Materialmodifikation und Mikrothermoformen entwickelt [11]. Ziel war es, mit diesem Verfahren hoch aufgelöste Muster (bio-)funktionaler Materialeigenschaften in einer dreidimensionalen Mikrostruktur wie z.B. dem CellChip erzeugen zu können. Dabei dient das Mikrothermoformen als zentraler Replikationsschritt in der Prozesskette, während vor- als auch nachgeschaltete Methoden zur Kunststoffmodifikation zur Anwendung kommen können. In nahezu allen etablierten formgeben-

den Verfahren der Mikrostrukturtechnik können Materialmodifikationen, z. B. mittels Plasma, Licht- oder Teilchenstrahlung, erst nach dem Formschnitt durchgeführt werden. Damit ist jedoch eine hohe laterale Auflösung, aufgrund einer eingeschränkten Zugänglichkeit beispielsweise zu innen liegenden Oberflächen oder aufgrund von Streuungs- und Beugungseffekten an Strukturdetails, nicht zu erzielen. Weiterhin können bei masken- oder stempelbasierten Modifikationsmethoden die Masken bzw. Stempel nicht oder nur sehr schwierig mit den dreidimensional geformten Flächen in direkten Kontakt gebracht werden. Im Fall lithografischer Verfahren mit Masken nimmt aufgrund des dadurch nicht zu vermeidenden Spalts zwischen Maske und zu strukturierender Fläche die maximal mögliche laterale Auflösung deutlich ab. Dieses Problem kann durch die neue Technologie wie im Folgenden beschrieben umgangen werden.

Da die Kunststoffolie sich beim Thermoformen nur in einer entropie-

SMART – Substrate Modification And Replication by Thermoforming

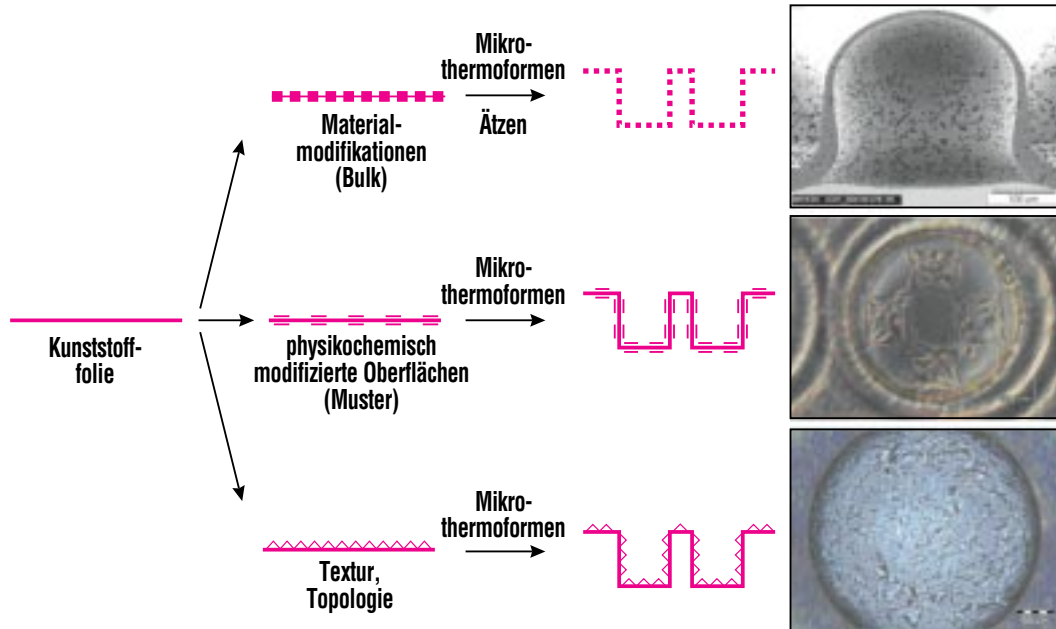


Abb. 3: Schema des SMART-Verfahrens. Dünne Kunststofffolien können vor dem Mikrothermoformen in noch flachem Zustand mit hoch auflösenden Methoden modifiziert werden. Diese Modifikationen bleiben aufgrund des materiellen Zusammenhaltes der Folie während des Formvorgangs erhalten. Die hier aufgeführten drei Beispiele umfassen die Kombination des Thermoformens mit der Ionenspurtechnologie, Herstellung von Zelladhäsionsmustern durch lithografische UV-Belichtung und den Erhalt von mikro- oder nanoskaligen Texturen auf der Oberfläche (von oben nach unten, Durchmesser der thermogeformten Mikrocontainer jeweils ca. 300 µm).

pie- bzw. gummielastischen Phase befindet und nicht geschmolzen wird, kann sie vor dem Prozess in ihrem flachen, unstrukturierten Zustand modifiziert werden. Aufgrund der vergleichsweise moderaten Prozesstemperatur gibt es verschiedene Modifikationen, die den Formprozess überstehen und somit erhalten bleiben. Einer dieser stabilen Modifikationsprozesse ist die Bestrahlung der Folien mit energiereichen Schwerionen. Diese erzeugen beim nahezu geradlinigen Durchdringen der Folie sogenannte „latente Spuren“. Diese Spuren können nachträglich mit geeig-

ten Medien selektiv herausgeätzt werden, sodass je nach Ätzbedingungen Poren definierter Größe entstehen. Beim SMART-Verfahren wird nun nach dem Bestrahlen und vor dem Ätzen die Folie mittels Mikrothermoformen strukturiert, ohne dass es dabei zu einem Ausheilen dieser Spuren durch die Temperatureinwirkung kommt. Vorteil dieses neuen Verfahrens ist in diesem Fall, dass Mikrokavitäten mit einer allseitigen Perforation hergestellt werden können (siehe Abb. 4). Dies ermöglicht eine Versorgung kultivierter Zellen von allen Seiten, sodass daraus kürzere

Versorgungswege resultieren. Der bedeutendste Vorteil des SMART-Verfahrens, der aus der permanenten Materialkohärenz und dem daraus folgenden Erhalt von Modifikationen resultiert, ist jedoch die mögliche Anwendung etablierter maskenbasierter Technologien. Dies ermöglicht es in Zukunft, Materialmodifikationen mit lithografischer Auflösung auch auf mikroskalige, dreidimensionale Membranstrukturen anwenden zu können. So kann z. B. die Bestrahlung der Folie mit Schwerionen über eine einfache, planare Maske durchgeführt werden. Durch

eine entsprechende positionierte Formung können so bestimmte Bereiche für die Perforation ausgenommen werden. Dies könnte beispielsweise die Beobachtung von Zellen durch definierte nicht-perforierte Bodenflächen mittels eines Lichtmikroskops erleichtern. Die Änderung des ursprünglich angelegten Musters aufgrund der Verstreckung der Folie lässt sich dabei entweder empirisch oder mit Hilfe von Simulationen durch die Anpassung des Ausgangsmusters kompensieren.

CellChip – Plattform für Stammzellforschung

Der Faktor der räumlichen Auflösung biofunktionaler Modifikationen wird in den nächsten Jahren speziell in der Stammzellbiologie hinsichtlich der Nachbildung der natürlichen Mikroumgebung von Zellen eine zentrale Rolle spielen. Neben löslichen Faktoren, wie z. B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, sind auch matrixgebundene Signale (z. B. matrixgebundene Signalmoleküle bzw. Molekülgruppen aber auch z. B. die Elastizität der Matrix

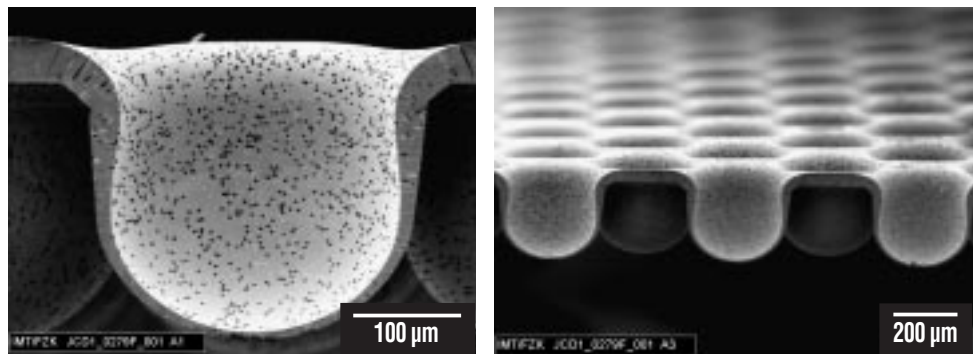


Abb. 4: REM-Aufnahmen von geschnittenen CellChips, die mit dem SMART-Verfahren hergestellt wurden. Durch die Kombination aus Bestrahlung mit beschleunigten Schwerionen, Mikrothermoformen und schließlich Ätzen der durch Schwerionenbeschuss erzeugten Spuren zu Poren, können hochporöse CellChips gefertigt werden, die sogar an den Seitenwänden Poren aufweisen.

[7]) entscheidende Aspekte dieser Mikroumgebung [12]. Die Nachbildung der natürlichen Entwicklung einer Zelle bzw. eines Gewebes im Labor bedeutet somit die Nachbildung einerseits der räumlichen Organisation aber letztlich auch der zeitlichen Abfolge dieser Faktoren und Signale. Umso mehr sind hier Technologien gefragt, die es ermöglichen, in dreidimensionalen Trägerstrukturen hoch aufgelöst die wichtigsten und für die Entwicklung und Reifung der Zellen relevanten Faktoren imitieren zu

können. Die raumzeitlich geordnete Abfolge von löslichen Faktoren der Mikroumgebung kann in vitro in Ergänzung zu den matrixgebundenen Signalen, z. B. durch die Integration der Gerüststrukturen in mikrofluidische Bioreaktoren, nachgeahmt werden. Dadurch ist neben einer aktiven Versorgung der Zellen mit Nährmedium auch ein gezielter Einfluss auf lokale Konzentrationsverhältnisse beispielsweise bioaktiver Signalmoleküle möglich.

Literatur

- [1] L. A. Kunz-Schughart, J.P. Freyer, F. Hofstaedter, R. Ebner, *J Biomol Screen* 9, 273-285 (2004)
- [2] E. Gottwald, *Spektrum der Wissenschaft*, 44-51 (2002)
- [3] R.M. Nerem, *Ann Biomed Eng* 19, 529-545 (1991)
- [4] R. Langer, J.P. Vacanti, *Science* 260, 920-926 (1993)
- [5] C.S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber, *Science* 276, 1425-1428 (1997)
- [6] C.J. Flaim, S. Chien, S.N. Bhatia, *Nat Methods* 2, 119-25 (2005)
- [7] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* 126, 677-689 (2006)
- [8] E. Eschbach, S.S. Chatterjee, M. Nöldner, E. Gottwald, H. Dertinger, K.-F. Weibezahn, G. Knedlitschek, *Journal of Cellular Biochemistry* 95, 243-255 (2005)
- [9] E. Gottwald, S. Giselbrecht, C. Augspurger, B. Lahni, N. Dambrowsky, R. Truckenmüller, V. Piotter, T. Gietzelt, O. Wendt, W. Pfleging, A. Welle, A. Rolletschek, A.M. Wobus, K.-F. Weibezahn, *Lab Chip*, 7, 777-785, (2007), DOI 10.1039/b618488j
- [10] R. Truckenmüller, Z. Rummler, T. Schaller, W.K. Schomburg, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 12, 375-379 (2002)
- [11] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmüller, K.-F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed Microdevices* 8, 191-9 (2006)
- [12] F. M. Watt, B.L.M. Hogan, *Science* 287, 1427-1430 (2000)