

Oberflächen: Wenige Nanometer moderieren die Wechselwirkung mit biologischen Systemen

C. Oehr, J. Barz, K. Borchers, M. Müller, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart

Kurzfassung

Kunststoffe haben aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften und des niedrigen Preises vielfältige Verwendung. Im medizinischen Bereich werden ca. 2 % der weltweiten Kunststoffproduktion eingesetzt. Für den Einsatz im Kontakt mit biologischen Medien ist vor allem die Oberfläche der jeweiligen Materialien von großer Bedeutung. Anhand von Beispielen wird erläutert, worauf es bei der Oberfläche ankommt und wie diese entsprechend vorbereitet wird.

1. Einleitung

Die hier zu betrachtenden Systeme bestehen einerseits aus einer festen Phase. Dies sind Materialien, die für den Kontakt mit biologischen Systemen verwendet werden, z.B. Implantate, Membranen zur Dialyse oder Zellkulturschalen. In aller Regel müssen sie an der Oberfläche so angepasst werden, dass das biologische System im Kontakt zu den gewünschten Reaktionen führt. Komponenten des biologischen Systems sollen mit der Oberfläche mehr oder weniger wechselwirken. Eine messbare Wechselwirkung äußert sich in Adhäsion der Komponenten (Peptide, Proteine, Mikroben oder Säugerzellen) zur Materialoberfläche.

Eine Adhäsion ist erforderlich, um Scaffolds für die Kultivierung von Säugerzellen oder die Immobilisierung von Mikroben und biologisch aktiven Molekülen an technischen Oberflächen zu realisieren.

Häufig ist aber keine oder eine stark verminderte Wechselwirkung gewünscht. Möglichst keine Adhäsion soll beispielsweise an Kontaktlinsen, Stents, Dialysemembranen und Kathetern erfolgen. Im ersten Schritt geht es dabei um die Vermeidung unspezifischer Proteinadsorption. Welcher dieser Fälle eintritt - verminderte oder verstärkte Adhäsion - wird durch die drei beteiligten Teilsysteme bestimmt. Die drei Teilsysteme sind erstens das Material, genauer seine Oberfläche bezüglich chemischer Zusammensetzung und Struktur.

Andererseits beeinflusst die flüssige Phase, das Medium, in dem sich die biologisch aktiven Moleküle und/oder mikrobielle oder Säugerzellen befinden, durch seine Zusammensetzung

und jeweilige Konzentration von Molekülen und Ionen die Wechselwirkung an der Materialoberfläche. Schließlich sind es als drittes Teilsystem die Mikroben oder Säugerzellen selbst, die sehr unterschiedlich auf Bestandteile des Mediums und der angrenzenden Oberfläche reagieren und Einfluss nehmen können.

Insgesamt handelt es sich also um ein sehr dynamisches System „Grenzfläche“. Ausnahmen sind einerseits gegeben, wenn es sich um resorbierbare Materialien handelt oder das Material im Kontakt quillt und Komponenten des Mediums aufnimmt. Im Falle einiger säurebildender Mikroorganismen kann das Material auch korrodiert werden (Biokorrosion). Andererseits kommen tiefere Lagen des Materials in Betracht, wenn aus ihnen vorsätzlich Wirkstoffe freigesetzt werden (drug-release-Systeme) oder Additive aus den Materialien durch die biologische Phase heraus gelöst werden. Diese Fälle sollen hier nicht näher betrachtet werden, da für den überwiegenden Teil der Anwendungen die verwendeten Materialien so gewählt werden, dass mechanische und geometrische Anforderungen erfüllt sind, während die Wechselwirkung mit dem biologischen Medium separat über eine funktionale Oberfläche eingestellt wird. Hierzu wird sowohl die chemische Zusammensetzung der Oberfläche als auch deren geometrische Struktur angepasst.

Eine Übersicht zu den Effekten der verstärkten oder verminderten Wechselwirkung an Oberflächen oder besser Grenzflächen zwischen fester und flüssiger Phase bietet das Schema in Abbildung 1.

Verstärkte Wechselwirkung

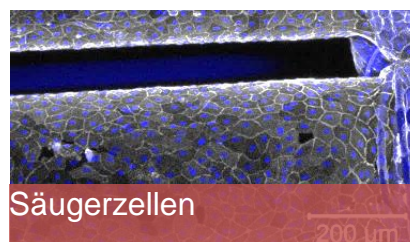
Spezifische Anbindung von Biomolekülen, z. B. für Diagnostik, heterogene Biokatalyse, spezifische Adsorber



Immobilisierte Mikroorganismen, z. B. für biologische Filter



Wachstum, Proliferation und Differenzierung von Zellen; Gewebemodelle, In-vitro-Testkits



Verringerte Wechselwirkung

Verringerte Proteinadsorption, z.B. für Diagnostik, Anti-fouling-Ausrüstung

bakteriophobe, bakteriostatische, bakteriozide Oberflächen

Minimierung von Problemen bei temporären Implantaten, Minimierung von Restenose etc.

Abbildung 1: Wechselwirkung an der Grenzfläche von Materialien im Kontakt mit biologischen Systemen

2. Die Materialien

Als Materialien werden in der Medizintechnik überwiegend und zunehmend polymere Werkstoffe verwendet. Argumente für deren Verwendung sind vor allem: geringes spezifisches Gewicht, einfache Formgebung, Modulation der elastischen Eigenschaften ist möglich, gegebenenfalls kontrollierte Resorbierbarkeit, günstiger Preis. Je nach Anwendung kommen neben den mechanischen Eigenschaften auch weitere Eigenschaften in Betracht. Dies sind für Kontaktlinsen die Transparenz und die Sauerstoffdurchlässigkeit (Beispiel für Werkstoffe sind verschiedene Silikone). Für diagnostische Gebrauchsgegenstände wie Mikrotiterplatten sind dies ebenfalls optische Eigenschaften wie etwa ein niedriger Fluoreszenzhintergrund, um die optischen Messergebnisse nicht zu verfälschen (Beispiel für eine entsprechende Werkstoffklasse sind Cyclo-Olefin-Copolymere COCs, bekannt ist der Werkstoff Topas von Ticona aus dieser Gruppe). Für die Dialyse ist die Fähigkeit Hohlfasermembranen mit definiertem Trennvermögen durch Einstellung der Porengrößenverteilung im Spinnprozess herstellen zu können von großer Bedeutung (hier werden vor allem verschiedene Polysulfonblends verwendet). Als weitere Materialien finden PVC, verschiedene Polyester Acrylate, Polyurethane sowie Polycarbonat Einsatz. Hohlfasern für extrakorporale Gasaustauschersysteme zeichnen sich durch die hohe Gaspermeabilität des verwendeten Kunststoffes aus wie beispielsweise Polymethylpenten PMP.

Randbedingung ist, dass für diese Werkstoffe ein akzeptiertes Sterilisationsverfahren angegeben werden kann. Die Werkstoffe müssen die mechanischen und erforderlichen zusätzlichen Eigenschaften des Volumenmaterials bei Raum- und Körpertemperatur erfüllen. Darüber hinausgehende Eigenschaften können vorzugsweise durch eine Oberflächenbearbeitung eingestellt werden, da eine Einstellung über Additivierung der Kunststoffe zwar möglich ist, aber deren eben genannten Volumeneigenschaften beeinflussen würde.

Allen genannten Polymeren ist gemein, dass sie im Kontakt mit biologischen Systemen, (wässrige Umgebung) stabil sind, allerdings auch kaum Wechselwirkungen eingehen, weil kaum funktionelle Gruppen, die über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, über induzierte Dipole oder über Wasserstoffbrücken und dergleichen wechselwirken könnten, vorhanden sind. Aufgabe der Oberflächenmodifikation ist es je nach Anforderung polare oder chemisch reaktive funktionelle Gruppen zu erzeugen, oder Schichten abzuscheiden, die die Biokompatibilität verbessern, z.B. durch Vermeiden der Migration von Additiven aus den Kunststoffen.

3. Biologische Systeme

Als biologische Systeme kommen Biomoleküle, Zellen und Zellverbände in Betracht. Diese Komponenten können zunächst Moleküle sein wie etwa Peptide, Proteine, Enzyme, Antikörper etc. Diese sind üblicherweise in einer wässrigen Phase suspendiert. Damit diese sich zum Beispiel im Napf einer Mikrotiterplatte gleichmäßig verteilen, muss die Oberfläche der Mikrotiterplatte benetzbar (hydrophil) sein. Diese Eigenschaft kann durch eine entsprechende Behandlung mit einem oxidierenden Reagenz oder mit einer Plasmabehandlung bei Normal- oder reduziertem Druck erreicht werden. Es entstehen an der Kunststoffoberfläche sauerstoff- und stickstoffhaltige Funktionen, die vom Wasser benetzt werden, aber auch unterschiedlich stark die biologisch aktiven Moleküle binden können. Aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungsmechanismen (elektrostatisch, Wasserstoffbrücken, van der Waals, Solvation) und der Tatsache, dass die Eigenschaften von Proteinen nicht nur vom pH-Wert und der Temperatur, sondern auch von der Wechselwirkung mit einer Oberfläche selbst verändert werden können, ist Proteinadsorption ein hochkomplexes Geschehen. Ist beispielsweise Blut die zu untersuchende Substanz, so wird sich die Oberfläche zunächst mit Albumin bedecken, weil es als relativ kleines Molekül ist und daher einen vergleichsweise großen Diffusionskoeffizienten hat und zudem auch in der größten Konzentration, verglichen mit den vorhandenen Eiweißstoffen, vorliegt. Im Laufe der Zeit wird es dann von stärker bindenden Proteinen verdrängt (Vroman-Effekt). Für die Zellen, seien es mikrobielle Zellen oder auch Säugerzellen ist die Wechselwirkung mit einer Werkstoffoberfläche immer durch derartige biologisch aktive Moleküle vermittelt. So kann man mit der Belegung mit geeigneten Proteinen oder auch nur wirksamen Sequenzen aus einem Protein die Adhäsion an einer Oberfläche befördern. Ein oft bemühtes Beispiel ist die Anbindung von RGD an Oberflächen (einem Peptid aus drei Aminosäuren, das ein häufiger Bestandteil der sog. extrazellulären Matrix ist) zur verbesserten Zelladhäsion. Für Säugerzellen, ebenso wie für mikrobiellen Zellen, kann davon ausgegangen werden, dass sie sich die Oberfläche, auf der sie dann siedeln, durch Freisetzung von entsprechenden Molekülen auf Protein-, oder Polysaccharidbasis vorbereiten. Damit lassen sich die Fragen der Adhäsion wiederum auf die molekulare Ebene reduzieren und die Komponenten des verwendeten Mediums, in dem die Zellen vorhanden sind, spielen ihrerseits eine zentrale Rolle für die Vermittlung oder Vermeidung von Adhäsion. Schließlich lässt sich über die Struktur der Oberfläche auch darauf Einfluss nehmen, welche extrazellulären Matrixproteine gebildet werden.

4. Modifikation der Oberflächen

Um nun die Struktur und chemische Zusammensetzung von Oberflächen in Nanometerdimensionen für die intendierte Wechselwirkung mit biologischen Systemen zu konditionieren, stehen eine Reihe von Präparationsmethoden zur Verfügung. Diese können in nasschemische Methoden und solche, die aus der Gasphase betrieben werden, unterteilt werden. Zu den Verfahren aus der flüssigen Phase gehören im weiteren Sinne alle Arten von Lackieren, Sol-Gel-basierte Techniken, Drucktechniken, galvanische Abscheidung, stromlose Abscheidung, Tauchbeschichtung und die Behandlung mit starken Oxydationsmitteln. Um eine Oberflächenbehandlung auf wenige nanometerdicke Grenzflächen zu beschränken, sind die beiden letztgenannten Techniken am besten geeignet. Als Verfahren aus der Gasphase kommen Verdampfen, chemische Gasphasenabscheidung, Kathodenzerstäubung und plasmabasierte Verfahren infrage. Mit diesen Verfahren lassen sich sehr dünne Schichten abscheiden, wobei mit dem letztgenannten Verfahren definiert chemische Funktionen an Polymeroberflächen generiert werden können

5. Beispiele

1. *Beispiel:* In Abbildung 2 (links) ist die Benetzbarkeit einer Oberfläche in Abhängigkeit von einem entscheidenden Parameter, dem sog. Tastverhältnis des Beschichtungsverfahrens dargestellt. Bei dem Verfahren handelt es sich um eine gepulste Plasmaabscheidung, wobei aus einem Gasgemisch aus Argon und CHF₃, einem fluorierten Kohlenwasserstoff, eine dünne fluorhaltige und im Ergebnis teflonartige Schicht erhalten wird. Indem man die Entladung pulst und das Tastverhältnis des Pulsens variiert, bekommt man in Abhängigkeit vom Tastverhältnis einen bestimmten Bedeckungsgrad der zu beschichteten Oberfläche. Bei sehr kurzen Plasmapulsen überwiegt eher ein Abtrag an der Oberfläche, die Oberfläche wird gereinigt und rauer. Mit steigendem Tastverhältnis wird dann die Oberfläche immer mehr bedeckt. Die Benetzung der Oberfläche ist bei kleinem Tastverhältnis eher gut, wenig teflonartige Beschichtung. Diese nimmt dann zu und es wird bei einem Tastverhältnis von 1, sprich kontinuierlich brennendem Plasma, eine geschlossene teflonartige Schicht mit einer Dicke von ca. zwei Nanometern erreicht. In dem Zwischenbereich ist die Schicht nicht geschlossen und die Benetzbarkeit setzt sich aus dem Ausmaß der jeweiligen hydrophilen und hydrophoben Anteile zusammen. Dieser Zusammenhang lässt sich tensiometrisch wie dargestellt verfolgen. Die Frage ist, ob diese partielle nanometerdünne Schicht auch von Zellen registriert wird. Abbildung 2(rechts) zeigt, dass für die Ansiedlung von Zellen auf den so erhaltenen Schichten ein vergleichbarer Verlauf erhalten wird und man annehmen kann, dass die hier verwendeten

Zellen umso besser adhäreren je hydrophiler die Oberfläche ist. Es zeigt sich auch, dass dieser Prozess der Zelladhäsion unter der Berücksichtigung der Oberflächencharakteristik Zeit braucht, weil sich zunächst ein optimales Verhältnis von adhärierenden Molekülen einstellen muss. Die Adhäsion von Zellen kann auch zelltyp-spezifisch beeinflusst werden. Die Einführung von verschiedenen funktionalen Gruppen auf Oberflächen durch Plasmabehandlung mit diversen Prozessgasen zeigte beispielsweise gegensätzliche Adhäsionsvorlieben der beiden Hautzelltypen Fibroblasten und Keratinozyten. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass die Oberflächenchemie zunächst auf die Proteinadsorption und diese auf die Zelladhäsion einwirkt.

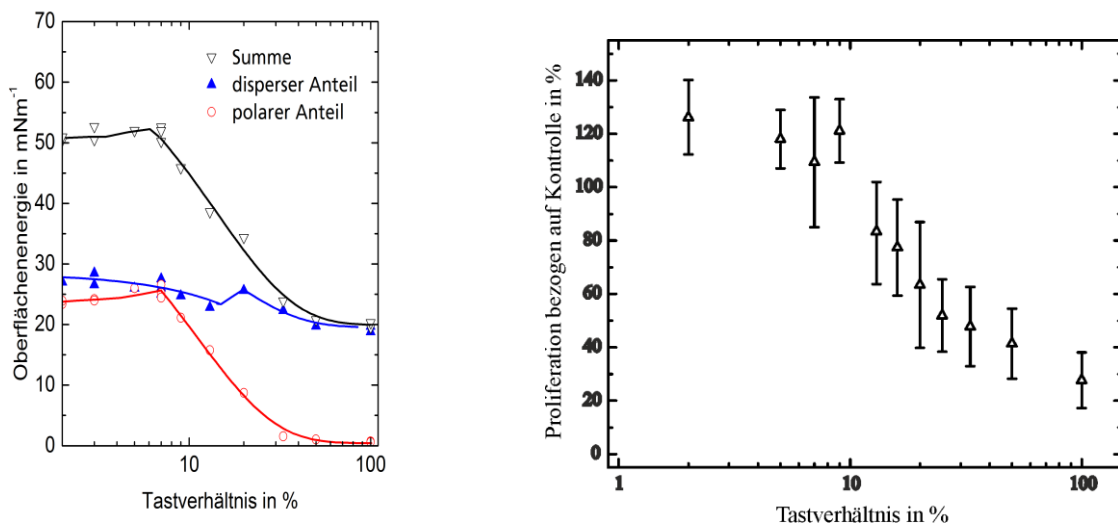


Abbildung 2: links: Oberflächenenergie in Abhängigkeit vom Tastverhältnis des Beschichtungsverfahrens. Das Tastverhältnis bestimmt hier den Bedeckungsgrad mit einer Beschichtung niedriger Oberflächenenergie rechts: Besiedelung der nach linkem Abbildungsteil hergestellten Oberfläche mit primären Fibroblasten nach drei Tagen[1,2].

2. *Beispiel:* Stents werden in Blutgefäßen eingesetzt, um diese offen zu halten. Üblicherweise reagiert der Organismus darauf, indem er dieses Material als Fremdkörper identifiziert und verkapselt. Damit „wächst“ der Stent wieder zu und verliert seine Funktion. Um dies zu vermeiden, sind zwei Strategien denkbar und werden auch umgesetzt. Erstens, man rüstet den Stent so aus, dass potentiell adhärerende Zellen durch „drug-release“ geschädigt werden und keine Anhaftung erfolgt, oder man versucht, die „richtigen“ Zellen anzulocken, die dann eine „naturidentische Neointima“ auf dem Stent bilden, sodass er nicht mehr als Fremdkörper erkannt wird. Ein Ansatz hierzu ist die Bereitstellung von Aptameren, die die sogenannten Vorläuferzellen aus dem Blut anlocken sollen. In Abbildung 4 sind Stentoberflächen, die mit einem Parylen in einem sog. CVD-Prozess beschichtet und dann

mit Aptameren ausgerüstet worden sind, gezeigt. Auf dieser Ausrüstung scheinen die Vorläuferzellen bevorzugt zu wachsen. Es ist allerdings eine offene Frage, ob die Aptamere selektiv genug nur die Vorläuferzellenzellen anziehen.

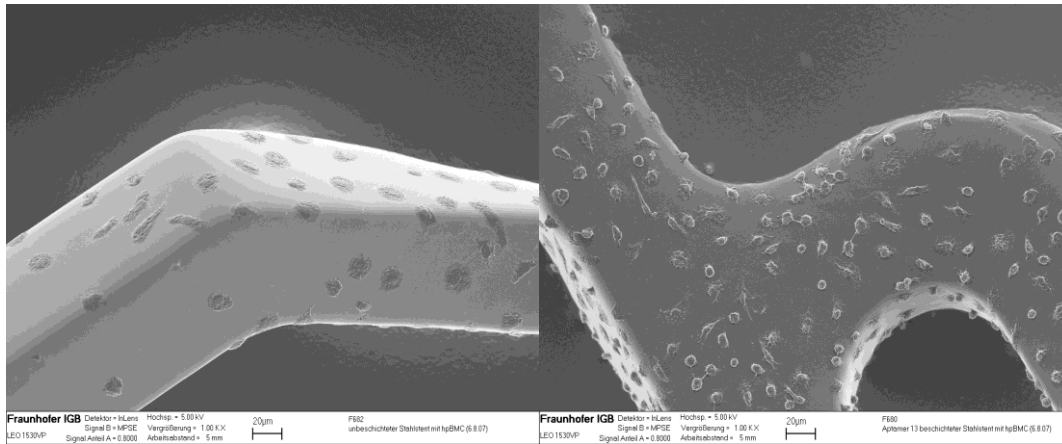


Abbildung 4: Besiedelung eines Stents mit Vorläuferzellen. Links unbeschichtet, rechts mit Parylen und Aptameren beschichtet [©Fraunhofer IGB].

3. *Beispiel:* In den Abbildungen 5 sind strukturierte Oberflächen gezeigt. Die Oberflächen sind sowohl chemisch als auch morphologisch strukturiert. Im ersten Fall wird die Strukturierung von den Zellen (grüne Punkte) nicht erkannt oder ignoriert. Im zweiten Fall siedeln die Zellen nur auf den roten Oberflächen (hydrophil), während die schwarze Oberfläche (hydrophob) gemieden wird. Genauer betrachtet bevorzugen sie auf den hydrophilen Arealen die unebenen Stellen. Somit ist die Rauigkeit neben der Benetzbarkeit ein möglicher Einflussfaktor. Auch die elastischen Eigenschaften der roten und schwarzen Areale sind unterschiedlich und mögen einen Einfluss haben. Schließlich ist bekannt, dass die interzelluläre Kommunikation eine Rolle beim Ansiedeln der Zellen spielt. Für den Zelltyp, der hier die Strukturen unterscheidet, spielt Kalzium in der Kommunikation eine wichtige Rolle. Die roten Areale enthalten sehr viele Säuregruppen, die das im Medium vorhandene Kalzium bevorzugt binden, und damit eine kalziumreiche Umgebung bilden. Zu welchem Anteil die genannten Faktoren jeweils die Zelladhäsion bestimmen, ist nicht bekannt.

4. *Beispiel:* Strukturierte Funktionalisierung von Oberflächen mit biologischen Komponenten gelingt zunehmend auch über klassische und innovative Verfahren für die Übertragung von „Biotinten“ wie Stempeln, Drucken oder auch laserbasierte Verfahren. Antikörperbibliotheken beispielsweise werden mittels Kontaktdruckverfahren punktförmig auf Oberflächen aufgebracht und als Sensoren für den Nachweis bestimmter biologischer Moleküle eingesetzt. In den vergangenen Jahren können Biomoleküle und Zellen auch mittels Inkjetdruckverfahren

oder über Laserpulse auf Oberflächen appliziert werden, sodass beliebige Flächen und Muster mit Sensormolekülen funktionalisiert oder passiviert werden können.

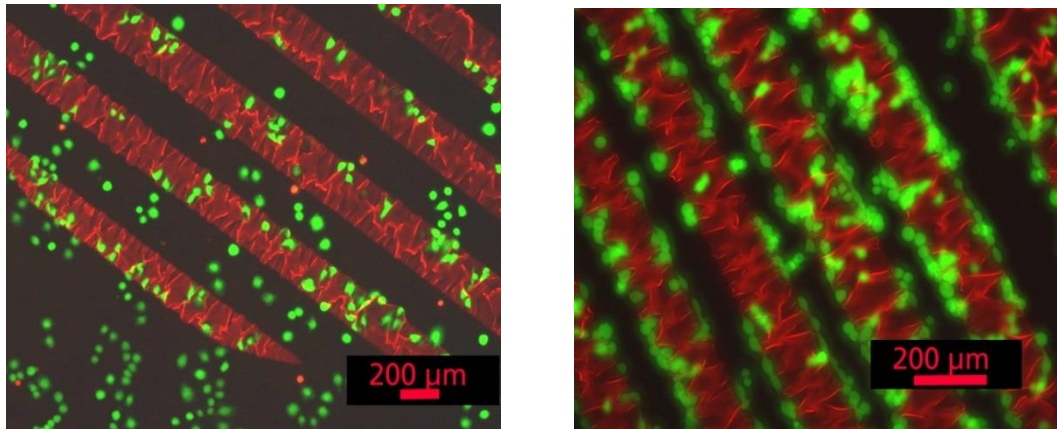


Abbildung 5: Links: hydrophile Struktur (rot) auf hydrophoben Untergrund (schwarz) wird von Rhabdomyosarcoma-Zellen(grün) nicht wahrgenommen. Rechts die Struktur wird von Ratteninsulinoma-Zellen(grün) wahrgenommen[3]

6. Ausblick

Mit diesem Beitrag soll gezeigt werden, dass Materialoberflächen als eine Komponente der Grenzfläche zwischen Materialien und biologischen Systemen die Interaktion mitbestimmen. Somit kann durch die Oberflächenarchitektur das Verhalten von biologischen Systemen beeinflusst werden. Hierzu sind allerdings auch noch viele Fragen offen. Insbesondere die Frage der Ausrüstung von Stents, aber auch überhaupt die Frage von Oberflächen mit optimaler Blutverträglichkeit ist keineswegs gelöst und Gegenstand laufender Untersuchungen.

[1] J. Barz, M. Haupt, U. Vohrer, H. Hilgers, C. Oehr, Surface and Coatings Technology Volume 200, Issues 1–4, 2005, pp 453–457

[2] J. Barz, M. Haupt, K. Pusch, M. Weimer, C. Oehr, Plasma Processes and Polymers Special Issue: Biomedical Applications of Plasma Processes Volume 3, Issue 6-7, 2006 pp 540–552

[3] V. Sciarratta, K. Sohn, A. Burger-Kentischer, H. Brunner, C. Oehr, Plasma Processes and Polymers Special Issue: Biomedical Applications of Plasma Processes Volume 3, Issue 6-7, 2006 pp 532–539