

Ulrike Fröber

**Mikrosystembasierte Zellkultivierung und
Zellmanipulation zur Applikation mechanischer
Reize auf Zellen**

Berichte aus der Biomechatronik

Herausgegeben von Prof. Dr. Hartmut Witte

Fachgebiet Biomechatronik an der TU Ilmenau

Band 6

Mikrosystembasierte Zellkultivierung und Zellmanipulation zur Applikation mechanischer Reize auf Zellen

von Ulrike Fröber



Universitätsverlag Ilmenau
2011

Impressum

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Angaben sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Diese Arbeit hat der Fakultät für Maschinenbau der Technischen Universität Ilmenau als Dissertation vorgelegen.

Tag der Einreichung: 12. Juli 2010

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. med. (habil.) Hartmut Witte
(Technische Universität Ilmenau)

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Klaus Liefeth
(Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V., Heilbad
Heiligenstadt)

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gunther O. Hofmann
(Klinik für Unfall- Hand- und Wiederherstellungschirurgie der
FSU Jena)

Tag der Verteidigung: 11. November 2010

Technische Universität Ilmenau/Universitätsbibliothek

Universitätsverlag Ilmenau

Postfach 10 05 65

98684 Ilmenau

www.tu-ilmenau.de/universitaetsverlag

Herstellung und Auslieferung

Verlagshaus Monsenstein und Vannerdat OHG

Am Hawerkamp 31

48155 Münster

www.mv-verlag.de

ISBN 978-3-939473-96-1 (Druckausgabe)

ISSN 1865-9136 (Druckausgabe)

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2010000436

Titelfoto: Dipl.-Biol. Helga Schulze | Bochum

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. med. (habil.) Hartmut Witte danke ich für die herzliche Unterstützung in allen Belangen und Phasen der Promotion. Die Freiheit der eigenen Themenwahl ist ein Geschenk, welches für die wissenschaftliche und persönliche Entwicklung von großer Bedeutung ist.

Meinen beiden lieben Kollegen Dipl.-Ing. Mike Stubenrauch und Dipl.-Ing. Jörg Mämpel kann ich gar nicht genug danken. Die Zusammenarbeit mit euch ist sowohl fachlich, als auch privat von beinahe unschätzbarem Wert für mich.

Frau Dipl.-Biol. Danja Voges stand mir stets als gute Freundin zur Seite. Neben deiner Fachkenntnis im Bereich der biologischen Fragestellungen weiß ich deine hervorragenden gestalterischen Fähigkeiten, deinen unermüdlichen Einsatz bei der Literaturbeschaffung, das Korrigieren der Arbeit und dein stets offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme des Lebens sehr zu schätzen.

Den Kollegen und Projektpartnern, die im Rahmen des Projektes „3D-ECM“ zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt. Frau Dipl.-Inf. Silvia Veronica Lehmann danke ich für ihren Einsatz im Bereich der Softwareentwicklung, und Herr Dipl.-Ing. Robert Fischer unterstützte mich vor allem im Umgang mit den Zellen.

Dr. rer. nat. Cornelius Schilling gab stets neue Denkanstöße und brachte kreative Ideen in die Diskussion ein. Nicht zu vergessen sind alle weiteren Kolleginnen und Kollegen der Fachgebiete Biomechatronik und Arbeitswissenschaften der TU Ilmenau die mich unterstützten.

Stellvertretend für alle Studierenden sei hier Herr Dipl.-Ing. Richard Würfel genannt. Er und viele andere haben durch die Bearbeitung unterschiedlicher Themen zum Entstehen der Arbeit beigetragen.

Meine Eltern und Großeltern, sowie die gesamte Familie haben immer daran geglaubt, dass ich das schaffe. Euer Stolz ist etwas Großartiges.

An dieser Stelle seien noch die beiden wichtigsten Menschen in meinem Leben erwähnt.

Lieber Alex und liebe Linni, ihr habt mir die Kraft gegeben, diese Arbeit zu schreiben.





Kurzzusammenfassung

Die übergeordnete Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist biomedizinischer Art und seit mehr als 150 Jahren anhängig:

Wie verhalten sich Zellen unter definierter Belastung?

In vivo ist die Beobachtung zellulärer Prozesse bisher nicht ohne invasive Methoden möglich. Das verlangt nach einer Lösung *in vitro*, welche die natürlichen Bedingungen adäquat nachahmt und gleichzeitig optimale Bedingungen für die Beobachtung und Beeinflussung der Prozesse bietet. Dass sich dafür Mikrozellkultivierungssysteme (MZKS) eignen, wird in dieser Arbeit nachgewiesen.

Anhand der Analyse des Standes der Technik zur herkömmlichen und zur mikrosystembasierten Zellkultivierung sowie zur Zellmanipulation erfolgt die Ableitung von Anforderungen, welche die Zellkultur und die Nutzer an ein MZKS stellen.

Ein Mikrosystem bildet mit der Kultivierungskammer, den Schlauchanschlüssen, dem integrierten Scaffold, dem optischen und mechanischen Zugang und anderen Bestandteilen die physische Basis des Gesamtsystems. Es wird durch periphere Module zur Versorgung der Zellen und zur Einstellung der Umgebungsbedingungen, zur Beobachtung der Prozesse und Zustände und zur Manipulation der Zellen und technischen Komponenten ergänzt. Dieser Aufbau wird anhand exemplarischer Umsetzungen erläutert. Die Sicherstellung der Biokompatibilität erlaubt die stabile Kultivierung von Zellen außerhalb eines Inkubators.

Diese Infrastruktur bildet die Ausgangsbasis für Konzepte zur definierten Applikation von Reizen auf Zellen. Die existierenden makroskopischen und mikroskopischen Methoden werden dargestellt und ihre Adaptierbarkeit an das vorgestellte mikrosystembasierte Zellkultivierungssystem in Form von Realisierungsvorschlägen wird belegt. Abschließend wird der Gesamtaufbau anhand durchgeführter technischer und biologischer Tests diskutiert.

Nach zellspezifischer Integration der vorgeschlagenen Belastungsvarianten kann nunmehr den Lebenswissenschaften das bisher fehlende Instrument zur Beantwortung der übergeordneten Fragestellung zur Verfügung gestellt werden.





Abstract

The motivating question underlying this work is generated by life sciences, pending for more than 150 years:

How do cells behave under defined load?

In vivo it is not possible to monitor subsiding cellular processes without the use of invasive methods. This demands for a solution in vitro, which mimics natural conditions adequately and offers optimized conditions for observation and manipulation at the same time. For this purpose BioMEMS (Bio Micro Electro Mechanical Systems) for cell are suitable.

By means of analysis of state of the art for conventional macro and for micro system based cell cultivation and manipulation, requirements from cells and from users of such systems are defined.

A micro system with a cultivation chamber, tube connectors, an integrated scaffold, an optical and a mechanical access and other components forms the backbone of the entire system. It is completed by peripheral modules for supply of cells under adequate environmental conditions, observation of cells and processes and manipulation of cells and technical components. This configuration is explained in detail by exemplary realizations. Cell cultivation outside an incubator is feasible, securing biocompatibility.

Considerations of the application of stimuli on cells are founded on this newly developed infrastructure. Existing macroscopic and microscopic methods may be adapted to the system, realizations are suggested. The performance of the entire system is discussed with reference to results of technical and biological tests.

As result of the documented developmental process now a system exists, which after integration of cell-specific loading methods can be used by life scientists conduce to answer questions on cellular behavior.





Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	5
KURZZUSAMMENFASSUNG.....	7
ABSTRACT.....	9
INHALTSVERZEICHNIS	11
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	15
TABELLENVERZEICHNIS	17
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	19
1 EINLEITUNG.....	21
1.1 MOTIVATION	21
1.2 ENTWICKLUNGSBEDARF	22
1.3 PRÄZISIERUNG DER AUFGABENSTELLUNG UND GLIEDERUNG DER ARBEIT.....	24
2 STAND DER TECHNIK	27
2.1 MIKROZELLKULTIVIERUNGSSYSTEME	27
2.1.1 <i>Aufbau existierender Mikrozellkultivierungssysteme.....</i>	<i>32</i>
2.1.2 <i>Zellkultur in Mikrozellkultivierungssystemen.....</i>	<i>35</i>
2.1.3 <i>Umgebungsbedingungen</i>	<i>38</i>
2.1.4 <i>Versorgung.....</i>	<i>41</i>
2.1.5 <i>Beobachtung / Observation</i>	<i>45</i>
2.1.6 <i>Zusammenfassung der Literatur zu Mikrozellkultivierungssystemen.....</i>	<i>45</i>
2.2 ZELLMANIPULATION.....	47
2.2.1 <i>Anwendungsgebiete der Zellmanipulation.....</i>	<i>48</i>
2.2.2 <i>Methoden der Zellmanipulation</i>	<i>49</i>
2.2.3 <i>Mechanische Mikromanipulation.....</i>	<i>52</i>
2.2.4 <i>Manipulationswerkzeuge.....</i>	<i>54</i>
2.2.5 <i>Steuerung der Mikromanipulatoren</i>	<i>55</i>
2.3 APPLIKATION MECHANISCHER KRÄFTE AUF ZELLEN.....	56
3 ANFORDERUNGEN AN EIN ZELLKULTIVIERUNGS- UND HANDHABUNGSSYSTEM	57
3.1 ANFORDERUNGEN ADHÄRENTER SÄUGETIERZELLEN	57
3.1.1 <i>Sterilität.....</i>	<i>58</i>
3.1.2 <i>Temperatur</i>	<i>58</i>
3.1.3 <i>Strömungsverhältnisse.....</i>	<i>59</i>
3.1.4 <i>Zytotoxizität/ Biokompatibilität</i>	<i>59</i>
3.1.5 <i>Medien und Nährstoffe.....</i>	<i>60</i>
3.1.6 <i>Medienwechsel</i>	<i>60</i>
3.1.7 <i>Kohlendioxidgehalt und pH-Wert.....</i>	<i>61</i>
3.1.8 <i>Adhäsionsoberflächen/ Scaffolds/ 3D-Kultur</i>	<i>63</i>
3.1.9 <i>Zelldichteabhängige Proliferationshemmung (Kontakthinhibition).....</i>	<i>66</i>
3.2 ANFORDERUNGEN SEITENS DER NUTZER/ BEDIENER	68
3.2.1 <i>Versorgung mit frischem Medium</i>	<i>68</i>
3.2.2 <i>Optische Beobachtung der Zustände im System.....</i>	<i>68</i>
3.2.3 <i>Eingriff in das System.....</i>	<i>68</i>
3.2.4 <i>Integration des Scaffolds.....</i>	<i>69</i>
3.2.5 <i>Einfache quantifizierbare Besiedelung.....</i>	<i>70</i>
3.3 ZUSAMMENFASSUNG DER WESENTLICHEN ANFORDERUNGEN.....	72

4	KOMPONENTEN DES ZELLKULTIVIERUNGS- UND HANDHABUNGSSYSTEMS	75
4.1	BESCHREIBUNG DES GESAMTAUFBAUS	75
4.2	MIKROSYSTEMPLATTFORM	76
4.2.1	<i>Design und Fertigung</i>	76
4.2.2	<i>Anschluss- und Verbindungstechnik</i>	78
4.2.3	<i>Strömungsverhältnisse</i>	79
4.2.4	<i>Scaffold-Integration und Besiedlungsstrategien</i>	82
4.2.5	<i>Verschluss-/Deckungsstrategien</i>	85
4.2.6	<i>Befestigung auf dem Tisch des Mikroskops</i>	87
4.3	VERSORGUNGSEINHEIT	89
4.3.1	<i>Versorgungsstrategien</i>	89
4.3.2	<i>Gerätechnik</i>	93
4.3.3	<i>Parametererfassung</i>	98
4.3.4	<i>Blasenfreiheit</i>	106
4.4	OPTISCHE BEOBACHTUNGSEINHEIT	108
4.4.1	<i>Aufgaben/Funktionen</i>	108
4.4.2	<i>Aufbau</i>	109
4.4.3	<i>Teilfunktionen/Softwarekomponenten</i>	110
4.5	MANIPULATIONSEINHEIT	125
4.5.1	<i>Charakteristika der technischen Komponenten</i>	125
4.5.2	<i>Steuerung</i>	133
4.5.3	<i>Nutzerschnittstelle</i>	138
4.5.4	<i>Werkzeuge</i>	139
4.5.5	<i>Steuerung der Manipulationseinheit auf Basis der Bildverarbeitung</i>	140
4.5.6	<i>Experimente zur Mikromanipulation</i>	141
4.6	BIOKOMPATIBILITÄT	142
4.7	REINIGUNG UND STERILISATION	143
5	APPLIKATION MECHANISCHER KRÄFTE AUF ZELLEN	145
5.1	MOTIVATION ODER WARUM MAN ZELLEN STIMULIERT	145
5.2	STAND DER TECHNIK	147
5.2.1	<i>Biomechanische Parameter in vivo und in vitro</i>	147
5.2.2	<i>Messmethoden für biomechanische Parameter von Zellen</i>	149
5.2.3	<i>Systematisierung der Beanspruchungsmethoden nach Brown</i>	151
5.2.4	<i>Realisierungsbeispiele: Kräfte auf Zellen in Mikrosystemen</i>	154
5.2.5	<i>Realisierungsbeispiele: Kräfte auf Knochenzellen in Mikrosystemen</i>	156
5.3	REALISIERUNGSKONZEPTE: KRÄFTE AUF ZELLEN IM EIGENEN MZKS	159
5.3.1	<i>Fluidische Beanspruchung</i>	159
5.3.2	<i>Kompressionsbeanspruchung</i>	161
5.3.3	<i>Kombination: Fluidische Beanspruchung und Kompressionsbeanspruchung</i>	163
5.3.4	<i>Dehnung der Substratebene - Membranverformung</i>	163
6	DISKUSSION UND AUSBLICK	165
6.1	ERGEBNISSE DER TESTLÄUFE DER EINZELKOMPONENTEN UND DES GESAMTSYSTEMS ZUM AUFBAU EINER STABILEN ZELLKULTUR	165
6.1.1	<i>Mikrosystem</i>	165
6.1.2	<i>Versorgungseinheit</i>	165
6.1.3	<i>Optische Beobachtungseinheit</i>	166
6.1.4	<i>Manipulationseinheit</i>	167
6.1.5	<i>Software</i>	167
6.1.6	<i>Technische Funktion des Gesamtsystems</i>	168

6.2	ERGEBNISSE DER ANWENDERSTUDIEN IN VARIIERENDEN ANWENDUNGSSITUATIONEN	169
6.2.1	<i>Biokompatibilitätsversuche mit der standardisierten Fibroblasten Zelllinie MC3T3-E1</i>	169
6.2.2	<i>Erste Funktionstests der Mikrosysteme für die Scaffold-Integration mit primären bovinen Chondrozyten</i>	170
6.2.3	<i>Ansiedelung anspruchsvoller Monolayerkulturen mit humanen primären Osteoblasten</i>	171
6.3	REIZAPPLIKATIONSMETHODEN UND VORSCHLÄGE FÜR DEREN UMSETZUNG IM MIKROSYSTEM FÜR MECHANISCHE REIZE	172
6.4	SCHLUSSFOLGERUNG	173
	LITERATURVERZEICHNIS	175
	ANHANG	185
A1	IN MIKROZELLKULTIVIERUNGSSYSTEMEN VERWENDETE ZELLARTEN	185
A2	ZYTOTOXIZITÄT - SCHWELLENWERTE	186
A3	DESIGNVARIANTEN DER MIKROSYSTEME	187
A4	DATENBLATT MCP-D303 (AUSZUG).....	188
A5	METHODEN ZUR ZELLDETEKTION	190
A6	ALGORITHMEN FÜR DAS „IMAGE STACKING“	191
	GLOSSAR	193
	THESEN ZUR DISSERTATIONSSCHRIFT	197
	ERLAUBNIS ZUM WIEDERABDRUCK.....	199





Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von Perfusionsystemen.....	31
Abbildung 2: Diverse Silizium-Glas-Mikrosysteme in Schraub-Klemmverbindung.....	34
Abbildung 3: Messung der Sauerstoffkonzentration im Medium.....	40
Abbildung 4: Simulation des Wandscherstresses an der Chipoberfläche.....	43
Abbildung 5: Darstellung der Durchströmung einer Kulturkammer.....	44
Abbildung 6: Methoden der Zellmanipulation.....	50
Abbildung 7: Abhängigkeit der pH-Werte in Medien von der CO ₂ -Konzentration im Inkubator.....	62
Abbildung 8: Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien und Formen.....	65
Abbildung 9: Mittels 2PP erzeugte Scaffoldstrukturen.....	70
Abbildung 10: Komponenten des Mikrozellkultivierungssystems.....	75
Abbildung 11: Mikrosystemplattform.....	77
Abbildung 12: Verbindungsvorgang, schematische Darstellung.....	78
Abbildung 13: Verschiedene Polymeradapter auf Silizium-Chips.....	79
Abbildung 14: Varianten der Scaffold-Integration.....	83
Abbildung 15: Scaffold-Integration.....	84
Abbildung 16: Teilkomponenten der Manipulationseinheit.....	88
Abbildung 17: Betriebsmodi für die Versorgungseinheit.....	90
Abbildung 18: Betriebsmodi für die Versorgungseinheit.....	91
Abbildung 19: Betriebsmodi für maschinelle Versorgung des Mikrosystems mit Pumpe.....	92
Abbildung 20: Gerätetechnische Komponenten der Versorgungseinheit.....	93
Abbildung 21: Mikrosystem zur Messung der Strömungskräfte in einem Tribometer.....	94
Abbildung 22: Versorgungsaufbau für Medium und zwei Zusätze im Pumpbetrieb.....	95
Abbildung 23: Oben offenes Mikrosystem stabil ohne Überlaufen.....	96
Abbildung 24: Versorgungseinheit.....	97
Abbildung 25: Temperaturregelung für das Mikrosystem.....	99
Abbildung 26: Regelstrecke für die konstante Temperatur von 37 °C.....	100
Abbildung 27: Messmethoden für die Umgebungsparameter.....	103
Abbildung 28: Durchflussmesszelle mit Luer-Anschlüssen.....	104
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Sensorintegration in eine Messkammer.....	105
Abbildung 30: Integration von Sensorelementen in das Mikrosystem.....	106
Abbildung 31: Komponenten der Überwachungseinheit.....	110
Abbildung 32: Bilderfassungssoftware.....	111
Abbildung 33: Bildverarbeitungsalgorithmus zur Detektion von Werkzeugen.....	114
Abbildung 34: Detektierte Nadelspitze mit Koordinaten.....	115
Abbildung 35: Ergebnisse des „Image Stacking“-Algorithmus.....	121
Abbildung 36: Programmablauf der Realisierungsvision.....	122
Abbildung 37: Seitenansicht des Mikromanipulators mit Darstellung der Bewegungsachsen.....	126
Abbildung 38: Darstellung des minimalen und maximalen Arbeitsraumes des Manipulators.....	128
Abbildung 39: Veränderliches Moment.....	129
Abbildung 40: „Ortsfeste“ Konfiguration der CCD-Kamera und des Manipulators.....	133
Abbildung 41: Spezifizierter Regelkreis.....	134
Abbildung 42: Veranschaulichung der regelungstechnisch relevanten Größen p , w und e	135
Abbildung 43: Kalibriervorgang in der XY-Ebene.....	136
Abbildung 44: Kalibrierung der Z-Achse.....	138
Abbildung 45: Werkzeughalter des MM3A-LS (Kleindiek®) mit Nadel.....	139
Abbildung 46: Mikrogreifer der Arbeitsgruppe Rangelow (TU Ilmenau) als Endeffektor.....	139
Abbildung 47: Komponenten der Observations- und Manipulationseinheit.....	140
Abbildung 48: Manipulation von Glasobjekten im Mikrosystem.....	141
Abbildung 49: Federkonstrukte zur Reizapplikation.....	157

Abbildung 50: Miniaturisierung der Zugvariante	158
Abbildung 51: Glasverzugteile des Fachgebietes ANW der TU Ilmenau	160
Abbildung 52: Systemaufbau Direktkontaktmethode	161
Abbildung 53: Hexapodmechanismus im Ilizarow-Fixateur, Übertragung auf das Mikrosystem	162
Abbildung 54: Aufbau des Gesamtsystems	168
Abbildung 55: Biokompatibilitätsversuche mit MC3T3-E1 Zellen	169
Abbildung 56: Abbildung: Versuche mit bovinen Chondrozyten auf Scaffolds im MZKS.....	170
Abbildung 57: Primäre Humane Osteoblasten auf Siliziumzellträger in das MZKS integriert.....	171



Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Varianten der Zellkultur	29
Tabelle 2: Funktionsmodule der Mikrosysteme	33
Tabelle 3: Anwendungsfelder für Mikrozellkultivierungssysteme	36
Tabelle 4: Vor- und Nachteile der Versorgungsvarianten	42
Tabelle 5: Stand der Technik Mikrozellkultivierungssysteme	46
Tabelle 6: Zytotoxizitätsskala nach DIN-EN 10993-5	60
Tabelle 7: Gewebearten und Scaffoldfunktionen nach	66
Tabelle 8: Systemanforderungen	72
Tabelle 9: Simulation des Strömungsverhaltens im Mikrosystem	80
Tabelle 10: Technische Daten des MM3A_LS	126
Tabelle 11: Freiheiten und Bewegungsbereiche des Manipulators	127
Tabelle 12: Maximale Antriebskräfte und -momente der Manipulatoren	130
Tabelle 13: Experimentell ermittelte Positioniereigenschaften der Manipulatoren	131
Tabelle 14: Mechanische Parameter in biologischen Systemen	148
Tabelle 15: Materialeigenschaften einiger Gewebearten	149
Tabelle 16: Zusammenfassung der aktiven Methoden und Techniken für zellul. Biomechanik ..	150
Tabelle 17: Techniken zur mechanischen Stimulation von Zellen	152
Tabelle 18: In MZKS verwendete Zellarten	185
Tabelle 19: Designvarianten für die Integration von Scaffolds in Mikrosysteme	187
Tabelle 20: Literatur zu Bildverarbeitungsmethoden für die Zelldetektion	190
Tabelle 21: „Image Stacking“ Algorithmen	191





Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomkraftmikroskop
BioMEMS	Biologisches Mikro-elektro-mechanisches System
BMP 4	Bone Morphogenetic Protein 4
CAD	Computer Aided Design
CCD	Charge-coupled device
CLSM	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
CPM	Capillary Pressure Microinjection
DLR	Doppelte-Lebenszeit-Referenzierung
DMEM	Dulbeco's Modified Eagles Medium
DOF	Freiheitsgrad
ECM	Extra Zelluläre Matrix (engl: extra cellular matrix)
GaNi	Gallium-Nitrit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
HGM	Hepatocyte growth medium
CSI	Intrazytoplasmische Spermien-Injektion
iba	Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik e. V. Heilbad Heiligenstadt
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITO	Indiumzinnoxid (Indium-tin-oxyde)
IVF	Invitrofertiliation
LED	Light Emitting Diode
MC3T3-E1	Fibroblastenzelllinie der Maus
MEMS	Mikro-elektro-mechanisches System
MM3A-LS	Mikromanipulator drei Achsen-Life Sciences
MZKS	Mikrozellkultivierungssystem
NI	National Instruments
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMMA	Polymethylmetacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RS232	Serielle Schnittstelle
TIF(F)	Tagged Image File Format
2PLSM	Zwei-Photonen Laser Raster Mikroskopie
2PP	Zwei-Photonen-Polymerisation





1 Einleitung

1.1 Motivation

Patienten zu helfen ist nicht nur die treibende Kraft der Medizin, sondern auch der Biomedizintechnik: jener Ingenieurwissenschaft, die es sich zum Ziel gemacht hat, Ärzten technische Hilfsmittel bereitzustellen, welche es Ihnen ermöglichen, präventiv wirksam zu sein, genauere Diagnosen zu stellen sowie Heilung und Rehabilitation unterstützende oder beschleunigende Methoden zu etablieren. Auch das Verständnis für den Ablauf von Heilungsprozessen (klassisch nach Virchow „Pathogenese“, heute programmatisch „Salutogenese“ genannt) kann man mit technischen Hilfsmitteln fördern. Die Biomechatronik greift Fragestellungen der Lebenswissenschaften auf, welche das Verständnis für zelluläre Prozesse und Reaktionen mit technischen Mitteln steigern sollen. Als Beispiel seien hier das Entstehen und Wachstum von Knorpel und Knochen (Chondro- und Osteogenese), die Heilung von Frakturen (Osteoneogenese) und die Degeneration des Knorpels in Gelenken (Arthrose) genannt.

Derartige Fragen sind *in vivo* nicht nur aus ethischen Gründen kaum zu beantworten. Für den Gesamtorganismus stoßen derzeit verfügbare *in vitro*-Analysemethoden und -Messtechniken stoßen an ihre Anwendungs- und Auflösungsgrenzen und sind nur bedingt oder nicht anwendbar. Auch die Übertragung (im mathematischen Sinne „Abbildung“, „Modellierung“) der Prozesse auf *In vitro*-Setups liefert bisher mit den Methoden der Zellkultur und des „herkömmlichen“ Tissue Engineering keine adäquate Plattform, da sie sich (*noch?*) stark von der Situation *in vivo* unterscheidet.

Die Bioreaktortechnik bietet bereits hervorragende Untersuchungssysteme für integrale Betrachtungen an großvolumigen und somit vielzelligen Geweben und Zellschichten als Gewebsanaloga. Den direkten Zugriff auf die einzelne Zelle als Individuum bzw. wenige Zellen im Verband ermöglichen diese Systeme jedoch nicht.

Von großem Interesse ist die Online-Beobachtung von Prozessen: z.B. die Interaktion zwischen Synoviozyten und Chondrozyten bei der Entwicklung einer Osteoarthritis oder einer regulären vs. gestörten Wundheilung. Bisher existiert keine Möglichkeit, definiert und reproduzierbar Prozesse dieser Art zu beobachten. Zur Lösung dieser Aufgabe werden komplexe Systeme benötigt, mit denen man Zell-Zell-Interaktionen außerhalb des Organismus beobachten, simulieren und damit auch untersuchen kann.

Eine Möglichkeit dazu bietet die Technik der mikrosystemgestützten Zellkultivierung. Mikro-elektro-mechanische Systeme (MEMS) zur Anwendung mit oder in biologischen Systemen (BioMEMS) sind mit ihren

vielfältigen Funktionalitäten dazu geeignet, als Experimentalumgebung für zellbiologische Fragestellungen zu dienen (Hung et al. 2004) und (Prokop et al. 2004). Brehm-Stecher & Johnson (2004) definieren BioMEMS als eine Familie von Geräten, welche für die mikroskalige Analyse biologischer Materialien elektrische, mechanische, chemische und/oder mikrofluidische Eigenschaften vereinigen. Diese Systeme sind auf die Integration in einen aus Hard- und Software bestehenden Aufbau angewiesen, denn nur dann kann eine Ausnutzung der charakteristischen Eigenschaften für Zellversuche erfolgen.

1.2 Entwicklungsbedarf

Mikrosystembasierte Zellkultivierer (BioMEMS) in der Arbeit auch als Mikrozellkultivierungssysteme (MZKS) bezeichnet, werden heute zumeist für die Untersuchung von Fragestellungen aus der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung oder der Untersuchung krankhafter Prozesse im Menschen ausgelegt (Stangegaard et al. 2006, Thompson et al. 2004). Geigl & Speicher (2008) beschreiben in ihren Ausführungen eine Reihe von Verfahren für die Einzelzellanalytik. Dazu geschaffene Systeme sind meist große Analyseautomaten oder bieten auch in einer mikrosystemtechnischen Umsetzung dieser Methoden kaum die Möglichkeit, die im System befindlichen Zellen gezielt mechanisch zu beeinflussen, z.B. mechanische Reize zu applizieren.

Dieser Bedarf sei anhand eines Beispiels konkretisiert:

Kenntnisse über der Knochenentstehung und Knochenneubildung bilden die Grundlage für viele Maßnahmen in der Medizin und Medizintechnik. Es ist bekannt, dass Kräfte, die durch äußere und innere Lasten provoziert werden, zur Verformung des Knochens und damit zur Formadaptation führen [vgl. den Überblick über die Hypothesen zur Osteo(neo)genese in Rau (2009)]. Moderne Verfahren der Osteosynthese und Endoprothetik nutzen diese Prozesse und Kenntnisse hierüber zunehmend bewusst. Konkret sei hier der Fixateur externe genannt. Er dient primär zur indirekten, extern stabilisierten Osteosynthese in der orthopädischen und Unfallchirurgie (Greching et al. 1982). Es ist technisch möglich, einen solchen Fixateur externe, bzw. dessen Schrauben zu sensorisieren, Informationen über die an der Frakturstelle wirkenden Kräfte zu erhalten und damit Rückschlüsse auf die zellulären Prozesse zu ziehen (Witte et al. 1999) und (Witte & Günther 1999). Daraus lassen sich Belastungsprofile ableiten, mit denen man in der Lage ist, die Osteosynthese durch gezielte Belastung in Form von Mikrobewegungen zu unterstützen. Diese Form der Messung wurde am Tier erprobt und kam bereits am Menschen im klinischen Versuch zum Einsatz (Hegelmaier 1993). Versuche an Menschen und Tieren sind *in vivo* aus ethischen Gründen nur begrenzt möglich. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse von Beobachtungen an

Tierknochen wegen deren unterschiedlicher Struktur nicht direkt auf den menschlichen Knochen übertragen werden können.

Alle diese Versuche lassen nur Aussagen im makroskopischen Bereich zu (max. bis zur Lupenvergrößerung - den Knochen, den Kallus oder den eigentlichen Bruch betreffend). Die Beschreibungen der mikroskopischen Prozesse an den Zellen im Gewebsverbund selbst bleiben bisher hypothetisch. Das legt die Strategie nahe, die Prozesse bevorzugt *in vitro* zu beobachten, um die Zellen und ihre Reaktionen auf Beanspruchungen zu beobachten (über die Beziehung von Belastung und Beanspruchung im Pauwel'schen Sinn (siehe Witte et al. 2003). Bisher sind existierende Makrosysteme zur Zellkultivierung nicht dazu geeignet, sich diesen die einzelne Zelle oder nur wenige Zellen betreffenden Fragestellungen zu nähern, um sie ohne zu große Invasivität befriedigend zu beantworten.

Es wird ein System benötigt, mit dem man

- Zellen wie *in vivo* halten kann,
- Zellen manipulieren kann,
- Zellen ohne unkontrollierten Einfluss reproduzierbar beobachten kann und
- Zellen wie *in vivo* („physiologisch“) reizen kann.

Hat man ein solches System, kann man Provokationsstrategien entwickeln, um systematisch physiologische Reize zu applizieren und die Antworten der Zellen auf diese Reize in Form von Signalen zu erfassen. In der hier vorgelegten Arbeit soll die technische Basis für insbesondere biomechanische Versuche zur Applikation von Kräften auf adhärente Zellen oder auf Zellverbände gelegt werden, wobei sonstige physiko-chemische (incl. neuro-immuno-endokriner) Einflüsse überlagert werden können.

Mit Hilfe der Zellkultivierung in Petri-Schalen ist man diesem Ziel in den letzten Jahren schon näher gekommen, jedoch weisen diese Techniken im Vergleich zur Situation *in vivo* deutlich andere Bedingungen auf. Um Interaktionen adhärenter Zellen mit anderen adhären Zellen und mit Ihrer Umgebung untersuchen zu können, bedarf es durchströmter dreidimensionaler (3D) Zellkulturen. Herkömmliche Zellkulturgefäße bieten zwar geeignete Umgebungen zur Aufzucht der Zellen, jedoch entspricht diese Art der Kultivierung im ruhenden Medium nicht dem realen Umfeld der Zellen. Bioreaktoren bieten im makroskopischen Maßstab die Möglichkeit, natur-analoge Umgebungen zu liefern. Jedoch läuft eine Entwicklung der Zellen (Zellen wachsen und proliferieren, teilen sich) dort meist ohne Kontrolle der Zustände im System ab, insbesondere visuelle Kontrollen sind nicht möglich. Auch der gezielte Eingriff und die Probenentnahme sind nur eingeschränkt möglich. Die Versuchsreihen sind in der Regel auf den Einsatz von

Inkubatorstechnik angewiesen, um die erforderlichen Umgebungsbedingungen zur Zellkultivierung zu schaffen.

Die Kultivierung von Zellen in 3D (dreidimensional) im durchströmten, temperierten Mikrosystem unter Zuhilfenahme von Stützstrukturen, die der extrazellulären Matrix (ECM) nachempfunden sind („Scaffolds“; engl. für „Baugerüst“), bietet die Möglichkeit, naturnähere Bedingungen zu schaffen und sich den zellulären Prozessen anzunähern. Es können extrem kleine Probenmengen getestet werden, und somit kann auch seltenes Probenmaterial fragmentiert eingesetzt werden (Paläontologie, Forensik).

Zusammengefasst: Fragestellungen der Biologie und Medizin (insbesondere der Funktionellen Morphologie) liefern logische und aktuelle Motivationen für die Entwicklung mikrosystemtechnischer Modulsysteme zur Kultivierung adhärenter Zellen auf dreidimensionalen künstlichen ECMs sowie von deren Komponenten zur Versorgung, Beobachtung und Manipulation sowohl des Mikrosystems als auch der Zellen im System.

Praktisch erforderlich auf dem Weg zur Entwicklung eines solchen Systems ist die Bearbeitung und Beantwortung verschiedener unterlagerter Fragestellungen aus der Medizin, der Zellbiologie und den Ingenieurwissenschaften.

1.3 Präzisierung der Aufgabenstellung und Gliederung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung eines mikrosystembasierten Zellkultivierungssystems, das die Handhabung technischer und biologischer Komponenten ermöglicht und die definierte Beeinflussung der im System befindlichen Zellen erlaubt. Gemäß dieser Definition ist somit ein biomechatronisches System zu entwickeln.

Vor einer Integration von Mechanismen für die standardisierte und reproduzierbare Zellreizung und Signalanalyse zwecks Identifikation der Reaktionen steht die Realisation der Grundfunktion: die von Inkubatoren unabhängige Langzeitkultivierung adhärenter Säugetierzellen mit der Möglichkeit der Manipulation und Beobachtung in Echtzeit. Die Maßnahmen zur Erreichung dieses Zieles bilden folgerichtig den Schwerpunkt der vorgelegten Schrift.

Damit müssen sich die Analysen zum Stand der Wissenschaft und Technik primär mit den Themen „Mikrozellkultivierungssysteme“, „Zellmanipulation“ und „Applikation mechanischer Kraftgrößen auf Zellen“ auseinandersetzen, wobei die Ausführungen zu existierenden Vorarbeiten zur Erleichterung der Lesbarkeit (und nicht unbedingt chronologisch) der logischen Abfolge des Entwicklungsprozesses angepasst sind.

Aus der Analyse der verfügbaren Forschungsergebnisse, der Fragestellung und aus den in vorgesehenen Anwendungsbereichen gesetzten Forderungen lassen sich jene übergreifenden Anforderungen an ein komplexes System ableiten, welche durch die zu untersuchenden Zellen und den Anwender an die Gestaltung und Funktionsweise eines komplexen Zellkultivierungs- und Manipulationssystems gestellt werden. Im (erweiterten) Sinne der Biomechatronik handelt es sich dabei um die Sicherung der Biokompatibilität (Witte & Schilling 2008).

Es gilt, die Handhabung definierter Zellzahlen zur Integration in das Mikrosystem zu erlauben, eine stabile Perfusion zu erzielen, definierte Belastungen aufzuprägen und im Falle spezieller Erfordernisse direkt in das System eingreifen zu können. Wünschenswert ist die Vermeidung direkter menschlicher Einflüsse durch Automatisierung unter kontinuierlicher Beobachtung des Geschehens im System. Als Teilziel sei die Etablierung einer stabilen, extern versorgten Kultur definiert.

In dieser Arbeit werden nur die zellkulturtechnischen Aspekte für adhärente Zellen aufgezeigt und nicht biologische Theorien und Hypothesen zur Knochenbildung überprüft, dazu sei auf Hegelmaier (1993), Claes et al. (2000) und Rau (2009) als Grundlage zukünftig geplanter umfangreicher (Anwender-) Studien verwiesen. Im Zentrum dieser Arbeit stehen die ingenieurtechnischen Maßnahmen zur verlässlichen Inbetriebnahme eines Versuchsaufbaus. Der Systemaufbau und die damit erreichte technische Umsetzung des Anforderungskataloges werden beschrieben und in Relation zur vorhandenen Literatur gesetzt.

Erst nach der Darstellung des Gesamtsystems ist es möglich, sich den Teilthemen konkretisierter Aufgabenstellungen erneut zuzuwenden. Denn nur, wenn die prinzipielle Funktion der Zellkultivierung gewährleistet ist, können Parameter geändert werden, um Variationen an den Zellen zu bewirken. In einem weiteren Kapitel werden erste, aus den Forschungsarbeiten entwickelte, bereits in das Mikrosystem integrierbare, Realisationsvarianten für die Applikation mechanischer Lasten auf Zellen vorgestellt und diskutiert.

Zum Abschluss erfolgt die diskursive Auseinandersetzung mit den Inhalten der Arbeit unter Einbezug der Ergebnisse aus verschiedenen Testläufen und Untersuchungen in Anwendungssituationen.





2 Stand der Technik

Aus der Problemanalyse ergibt sich als erste Handlungsnotwendigkeit, den Ist-Zustand der Forschung und Entwicklung zur Zellkultivierung zwecks Erzeugung zwei- und dreidimensionaler Zellkonstrukte zu erschließen. Das gilt sowohl für die als Laborstandard angesehenen Petri-Schalen- und Kulturflaschen-Systeme, als auch für die mikrosystemtechnischen MZKS und deren Funktionen. Ebenfalls erläutert werden Methoden zur Manipulation von Zellen.

2.1 Mikrozellkultivierungssysteme

Zellen werden aus verschiedenen Gründen *in vitro* kultiviert. Zum einen nutzt man die Kultur von Zellen, die sich sehr schnell „... vermehren sollen, um mit hoher Effizienz ein Bioprodukt wie z.B. ein Medikament oder einen Impfstoff zu synthetisieren.“ (Minuth et al. 2002, S. 1). Zum anderen dient sie als „Tissue Engineering“ unter anderem zur Herstellung funktioneller Gewebe und Organteile auf der Basis von kultivierten Zellen zur Unterstützung der Regeneration. Die Technik der Zellkultivierung hat sich auch als gängiges Instrument der medizinischen Forschung etabliert. Mit ihrer Hilfe ist man in der Lage, Fragen das System „Zelle“ betreffend zu beantworten, die *in vivo* nicht zu klären wären.

Noch immer gültig ist nach Literaturdurchsicht die Feststellung von Minuth et al. (2002, S. 144), dass die Qualität der künstlich hergestellten Konstrukte bisher nicht ausreichend ist. Künstlich gezüchtetes Leberparenchym erreicht nur einen Bruchteil der Entgiftungsleistung im Vergleich zu jener im Organismus (Minuth et al. 2002). Das Gleiche gilt auch für Knorpel- und Knochenkonstrukte, die in statischen Kulturen eine kaum belastbare ECM ausbilden (Paetzold et al. 2009). Diese Feststellung liefert die Begründung für die vielen Aktivitäten auf dem Gebiet der Entwicklung adäquater Zellkulturgefäße, -werkzeuge und -methoden.

In den letzten Jahren hat sich für die Gewebezüchtung aus verschiedenen Gründen die Verwendung von Einwegprodukten durchgesetzt. Die sichere Handhabung ist hierbei prioritär. Bei Einwegprodukten können Kontaminationen durch verschmutzte Kulturgefäße nahezu ausgeschlossen werden. Nicht zu vernachlässigen ist aber auch die Tatsache, dass Einwegprodukte eine große Gewinnspanne für die Hersteller solcher Gefäße bieten, so dass durch aggressives Marketing auch retrospektiv als suboptimal identifizierte Gefäße und Materialien die Chance hatten, sich auf dem Markt als Standard zu etablieren.

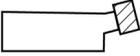
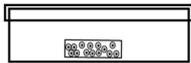
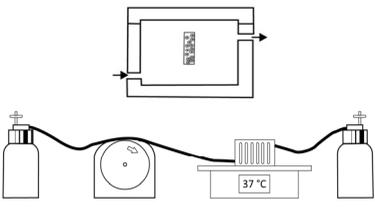
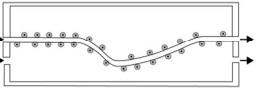
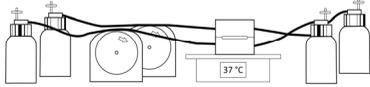
Zur Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Konstrukten nutzt man Trägermaterialien, an denen die Zellen anhaften und in welche sie einwachsen

können. Diese Trägermaterialien werden, wie zuvor bereits eingeführt, als „Scaffolds“ bezeichnet. Der Scaffold wird üblicherweise auf den Boden des Gefäßes gelegt und mit Zellen besiedelt. Es ist auch möglich, die Zellen direkt auf den Boden des Gefäßes auszubringen (Minuth et al. 2002, S. 182). So erreicht man durch die Zugabe von Seren zwar, dass sich die Zellen in der Kulturschale sehr schnell vermehren, sie bilden aber ohne Scaffold kein zur Transplantation geeignetes Gewebekonstrukt, sondern nur einen sogenannten Monolayer. Die Aufzucht dreidimensionaler Strukturen in einem System, bei welchem die einzige Fluidströmung vom selten stattfindenden Wechsel des Mediums herrührt, führt dazu, dass Zellen im Inneren des Scaffolds schlecht mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden.

Es müssen Kulturmethode zur Anwendung kommen, die den physiologischen Bedingungen nahe kommen und somit die Ausbildung differenzierter Eigenschaften begünstigen (Minuth et al. 2002, S. 182). Tabelle 1 zeigt Varianten der Kultur für Monolayer und dreidimensionale Gewebekonstrukte nach Minuth et al. (2002) S. 182. Die Anordnung in der Tabelle ist von „einfach“ zu „an Anforderungen angepasst“ sortiert.



Tabelle 1: Auflistung der Varianten der Zellkultur nach (Minuth et al. 2002)

Zellkulturvarianten	Darstellung aus (Minuth et al. 2002)
a) Monolayerkulturen; eine Vielzahl verschiedener Kulturgefäße: Petri-Schalen, Kulturflaschen, Titerplatten	
b) Scaffold mit aufpipettierten Zellen auf dem Boden eines Kulturgefäßes	
c) Scaffold hängend in langsam rotierendem Kulturmedium	
d) Scaffold in aufrecht gelagertem rotierendem Gefäß; die Rotationbeschleunigungen simulieren eine „Mikrogravitation“	
e) Scaffold in Perfusionscontainer eingesetzt; Nährlösung mit Peristaltikpumpe aus Mediumreservoir gesaugt, strömt durch Perfusionscontainer; verbrauchtes Medium fließt in ein Abfallgefäß	
f) Zellen als Monolayer an Wänden durchströmter Hohlfasern (Abwandlung von e)	
g) Scaffold für Epithelgewebe im Gradientencontainer (basaler und luminaler Bereich) mit verschiedenen Medien durchströmt zur Nachbildung der Situation <i>in vivo</i>	

Experimente mit proliferierenden Zellen dauern meist nur wenige Tage, wohingegen sich die Zucht von Geweben über Wochen erstreckt. Dafür muss eine stabile Kulturumgebung geschaffen werden.

Die derzeit häufig und auch im folgenden Entwicklungsprozess verfolgte Strategie für die Herstellung künstlicher Gewebekonstrukte besteht darin, die positiven Eigenschaften der herkömmlichen Kulturmethode so miteinander zu kombinieren, dass während der gesamten Kultivierungszeit optimale Bedingungen vorherrschen. Entscheidend ist dabei die ebenfalls in Tabelle 1e) gezeigte Realisierung der Perfusion mit jederzeit „frischem“ Medium. Die routinemäßigen Laborprozesse zur Kultivierung erfordern einen hohen gerätetechnischen Aufwand. Der Ablauf einer Zellkultivierung im Perfusionscontainer gliedert sich folgendermaßen:

Petri-Schalen dienen als Behälter für die „Aussaat“ der Zellen. Es erfolgt die Vorkultivierung und Vermehrung der Zellen durch Aufteilen und Umsetzen aus einem Kulturgefäß in mehrere weitere Gefäße, unter Verdünnung (Passage) auf dem Boden eines Kulturgefäßes aus Kunststoff oder Glas (Kulturflasche, Petri-Schale) in einer Reinraumwerkbank. Danach erfolgt im Brutschrank die Besiedelung der Trägerstrukturen für den Perfusionsbetrieb ohne Infusion mit den für optimale Bedingungen nötigen Medienwechselforgängen. Nach Adhäsion der Zellen wird der Perfusionsbetrieb aufgenommen. Für die Entnahme von Material zur Beobachtung unter dem Mikroskop oder zur Durchführung mikrobiologischer Tests in Analyseautomaten müssen die Proben aus dem Inkubator entnommen und wieder in der Reinraumwerkbank gehandhabt werden. In Abbildung 1 wird sowohl die schematische (1a) (Minuth et al. 2010) als auch die realisierte Variante (1b) (Minuth & Strehl 2007) einer solchen Perfusionskultur dargestellt. Die Kulturkammer hat hier einen Durchmesser von 13 mm und dient der Aufnahme von Gewebestücken.

Es gibt viele ganz praktische Motivationen, die beschriebenen komplexen Systeme zu miniaturisieren und die Abläufe zu vereinfachen. Das gilt insbesondere für die Beobachtung der Interaktionen weniger Zellen mit anderen Zellen oder mit sie umgebenden Materialien. Ziele sind hierbei die Reduktion der Prozessschritte, des Materialaufwandes, die Vereinfachung und Stabilisierung der Kultivierung und somit in Summe die Verbesserung der Ergebnisse der Zellkultivierung.



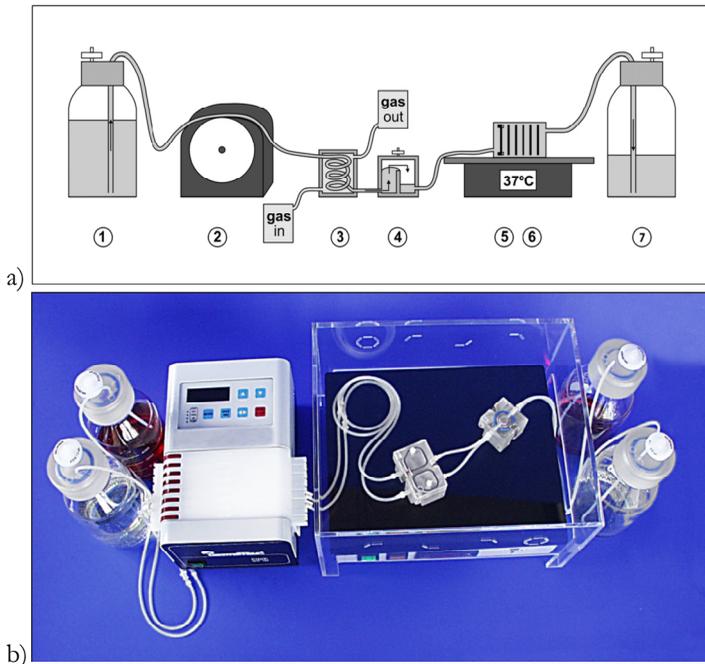


Abbildung 1: Aufbau von Perfusionssystemen

a) Schematischer Aufbau eines Perfusionssystems (Minuth et al. 2010)

1) Medienreservoir, 2) Peristaltikpumpe, 3) Gasaustauscher, 4) Blasenfänger, 5) Heizer, 6) Perfusionscontainer, 7) Abfallbehälter

b) Realisierter Aufbau eines solchen Perfusionssystems (Minuth & Strehl 2007)

Seit etwa 20 Jahren beschäftigen sich Forscher (Ince & Beekman 1990) und (Focht 1996) auch mit der Entwicklung von MZKS, welche die herkömmlichen Prozesse im Labor durch ein erweitertes Funktionsspektrum unterstützen sollen. Dabei handelt es sich um komplexe Aufbauten, die aus Mikrosystemen und damit verbundenen technischen Makro-Komponenten bestehen. Der aktuelle Stand der Entwicklungen soll hinsichtlich der Funktionen und Komponenten existierender MZKS im Folgenden näher beschrieben werden:

- allgemeine technische Daten, die den Aufbau und die Eigenschaften des Mikrosystems als Haupt-/Basiskomponente beschreiben, werden angegeben;
- die Versorgungseinheit, welche eine Perfusionskultur und die erforderlichen Umgebungsbedingungen ermöglicht, wird beschrieben;

- die Beobachtungseinheit, welche die Überwachung des Systems und der im System befindlichen Zellen und Strukturen gestattet, wird erläutert, soweit vorhanden, und
- Abläufe und Details der Zellkultivierung werden dargestellt.

2.1.1 Aufbau existierender Mikrozellkultivierungssysteme

Die Durchsicht der Literatur zu MZKS ergab als Maße für das Äußere der zentralen Mikrosysteme eine Spanne von minimal 10 mm bis maximal 80 mm für Breite und Länge (Hsieh et al. 2009) und (Chang et al. 2003). Dabei ist diese Größe von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen spielt es eine Rolle, ob das System für die Untersuchung einer oder mehrerer Zellen vorgesehen ist, was zwangsläufig einen Einfluss auf die Größe der Kultivierungskammer hat. Zum anderen gibt es auch einen Trend zur Miniaturisierung. So kann man feststellen, dass die Systeme aus den frühen neunziger Jahren eher größer sind und die aktuellen Systeme bis auf Ausnahmen deren Abmessungen deutlich unterschreiten.

In der vorhandenen Literatur werden alle Mikrosysteme mittels Kanalstrukturen versorgt. Eine Ausnahmestell das Mikrosystem von Jager et al. (2002) dar, bei dem es sich um eine Kultivierungseinheit handelt, die lediglich ein Gefäß ist. Bei den beschriebenen Kanalstrukturen unterscheidet man zwischen Haupt- und Nebenkanälen. Hauptkanäle dienen zumeist der Versorgung der Systeme. Sie sind ca. 50 μm bis 300 μm tief (Tourovskaja et al. 2005) und (Thompson et al. 2004) und zwischen 15 μm und 250 μm breit (Tourovskaja et al. 2005) und (Klank et al. 2002). Sehr kleine Kanalstrukturen (2 μm Tiefe mal 2 μm Breite (Hung et al. 2005) und (Hung et al. 2004)) dienen unter anderem der Strömungsbeeinflussung. Die Gestaltung der Kanäle ist an die erwünschten Strömungen und hierfür zu erzeugenden Strömungsprofile angepasst. Sie unterscheiden sich somit je nach Anwendung und Betriebsart.

Die Kanäle münden, wenn vorhanden, in eine Kultivierungskammer. Es existieren Systeme, welche keine Kammern besitzen. Die Kultivierung erfolgt direkt in den Kanälen (Tourovskaja et al. 2005), (Thompson et al. 2004) und (Klank et al. 2002). Sind jedoch Kammern vorhanden, haben diese Seitenlängen zwischen 0,1 mm und 22 mm, oder sie sind rund und haben einen Durchmesser von 1 mm bis 22 mm (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004) und (Hing et al. 2000). Auch die Tiefe ist sehr unterschiedlich und liegt zwischen 0,01 mm (Chang et al. 2003) bis 0,05 mm (Prokop et al. 2004) und (Leclerc et al. 2003) und 0,5 mm (Hing et al. 2000). In Jager et al. (2002) werden Kammern mit den eher kleinen Abmessungen von 0,1 mm mal 0,1 mm und einer Tiefe von 0,01 mm bis 0,02 mm für Einzelzellstudien genutzt. Die mittelgroßen Kammern von 0,825 mm mal 0,045 mm (Prokop et al. 2004) werden zum Trennen und Manipulieren genutzt. Auch hier lässt sich ähnlich

wie bei der Gesamtgröße der Zusammenhang feststellen, dass die Kammergrößen zum einen stark von der geplanten Anwendung abhängen und zum anderen, dass die in den Artikeln ab dem Jahr 2000 beschriebenen Kammern eher klein ausgelegt werden. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die Entwicklung der Mikrosystemtechnik, deren neue Verfahren zur Herstellung der beschriebenen Systeme zum Einsatz kommen.

Je nach Einsatzfeld enthält ein Mikrosystem eine Einzelkammer oder ein Array aus mehreren Kammern (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004), (Thompson et al. 2004), (Moriguchi et al. 2002) und (Powers et al. 2002).

Viele der Systeme sind hybrid aufgebaut. „Hybrid“ bedeutet, dass sie zum Beispiel durch Schrauben, thermisches Bonden oder Kleben aus verschiedenen Baugruppen zu einem System zusammengefügt werden. Es ist möglich, funktionelle Module oder Komponenten abzugrenzen, die in den Systemen enthalten sind. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Module und jene Funktionen, die sie während der Zellkultur erfüllen und die Häufigkeit, mit der sie in der Literatur beschrieben sind.

Tabelle 2: Funktionsmodule der Mikrosysteme

Modul	Funktion	Häufigkeit
Kanalstrukturen	Befüllung, Versorgung Spülung, Besiedelung	95 %
Gradientenreaktoren	Konzentrationsänderungen	5 %
Filterstrukturen / Siebstrukturen	Filterung, Fangen, Halten Strömungsbeeinflussung	5 %
3D-Strukturen / Scaffolds	Mehrdimensionale Zellkultivierung	5 %
Reservoirs	Medienver- und -entsorgung Einbringen von Analyseflüssigkeiten	50 %
Mikropumpen	Ver- und Entsorgung	5 %
Temperaturregel-strukturen	Messen, Heizen, Kühlen	50 %
Beweglicher Deckel	Sterile Abdeckung Eingriff in das System	5 %
Elektroden und Sensoren (außer Temperatur)	Zustandsüberwachung	10 %

In den in der Literatur beschriebenen Systemen sind nie alle dieser Komponenten enthalten, sondern immer nur einzelne dieser Module. Je nach Anwendungsfall werden Strukturen hinzugefügt, oder es wird auf sie verzichtet.

Allen Systemen, welche von Medium durchflossen werden, ist das Vorhandensein von Verbindungen mit der Systemumgebung über sogenannte

„Zugänge“ gemein. Sie besitzen mindestens je einen Ein- und einen Auslass für das Einbringen und Entfernen eines Mediums. Ein Mikrosystem, welches einen Gradientenreaktor darstellt, hat mindestens zwei Zugänge (Thompson et al. 2004). An diese werden auf verschiedene Arten Schläuche oder Reservoirs angeschlossen. Eine verbreitete Methode ist das Einkleben von Stahlnadeln mit Epoxidharz (Stangegaard et al. 2006) und (Hung et al. 2004). Hierfür kommen Flachbettkanülen zum Einsatz, über deren genormten Verbindungsanschluss (Luer-Lock-System) ein Schlauch angekoppelt werden kann. Eine Standardmethode, die sich für alle Anwendungsfälle bewährt hat, existiert bisher nicht. Weitere Varianten sind das Bohren von Löchern für Schlauchanschlüsse (Di Carlo et al. 2006), die Verwendung von 0,9 mm-Stahlverbindern oder das chemische Bonden von Silikonschläuchen, wie es in Tourovskaia et al. (2005) und Li et al. (2005) beschrieben ist. Es existieren auch Varianten, die sowohl eingebettete Teflonschläuche als auch einen Teflonring als Reservoir (Chang et al. 2003) enthalten. Angaben über die Dichtigkeit und Stabilität dieser Verbindungen existieren nicht. Ebenfalls unbekannt sind die durch die Anschlüsse vergrößerten Abmessungen der Gesamtsysteme. Entwicklungen an der Technischen Universität Ilmenau (Hohmann et al. 1999), die sich mit Schraub-Klemm-Verbindungen beschäftigten, haben den Vorteil, zusammen mit der fluidischen Konnektierung auch eine Halterung der empfindlichen Mikrosysteme zu bieten (siehe Abbildung 2). Das jeweilige Mikrosystem wird mit den fluidischen Öffnungen in die aus Aluminium und Kunststoff bestehende Halterung geschoben. Über das Einschrauben der UNF-Verbinder (Unified national fine thread, amerikanisches Einheits-Feingewinde) wird das System zum einen über einen Klemmmechanismus mechanisch fixiert und gleichzeitig fluidisch dicht angeschlossen.

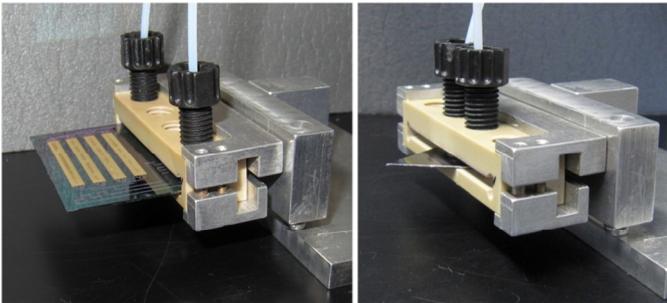


Abbildung 2: Diverse Silizium-Glas-Mikrosysteme in Schraub-Klemmverbindung

Ein häufig zum Einsatz kommender Werkstoff ist Polydimethylsiloxan (PDMS), insbesondere das biokompatible Sylgard® 184 (Dow Corning, USA)



(Di Carlo et al. 2006). Es bietet mehrere entscheidende Vorteile: niedriger Preis in der Herstellung, optische Transparenz und Permeabilität für Gase. Dennoch ist zu bemerken, dass PDMS meist nur als nicht-tragende Komponente, als Deckel oder Schicht mit Kanal- und Kammerstrukturen zum Einsatz kommt. Stabile Basismaterialien, die sich durchgesetzt haben, sind Glas (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004), (Tourovskaja et al. 2005) und (Thompson et al. 2004), das häufig auf das PDMS gebondet als oberste Abdeckschicht eingesetzt wird, und Silizium (Li et al. 2005), (Chang et al. 2003), (Moriguchi et al. 2002) und (Powers et al. 2002). Silizium wird verwendet, da hier das Erzeugen von Strukturen und das Versehen mit Spezialbeschichtungen nahezu unbegrenzte Möglichkeiten bieten. Kommt Silizium zum Einsatz, wird es häufig mit gebondetem Glas oder PDMS kombiniert.

Alle verwendeten Materialien müssen bioinert und biokompatibel sein. Weitere Materialien, die für die Mikrosysteme selbst, aber auch für Sensor- und Heizerstrukturen zum Einsatz kommen, sind Polymethylmethacrylat (PMMA) (Stangegaard et al. 2006), Polypyrol (Jager et al. 2002), Silikon, Indiumzinnoxid (ITO) (Hung et al. 2005, Huang & Lee 2007), Gold, Platin, Stahl und Teflon (Jager et al. 2002), (Huang & Lee 2007). Hergestellt und bearbeitet werden diese Materialien mit den herkömmlichen Methoden der Mikrosystemtechnik. Dazu zählen vorrangig die Lithografie, das Ätzen und die Abformung.

2.1.2 Zellkultur in Mikrozellkultivierungssystemen

Über die Durchführung der Zellkultivierung und die hierfür erforderlichen Experimentalbedingungen wird in der Literatur ausführlich berichtet. Hier zeigen sich Gemeinsamkeiten, aus denen sich Standardbedingungen und -prozesse ableiten lassen. Es sind Ähnlichkeiten zur herkömmlichen Kultur in Petri-Schalen und Kulturflaschen erkennbar. Es kommen die gleichen Sterilisationsmethoden zum Einsatz: Spülung mit 70%igem Ethanol, Autoklavieren und die Plasmasterilisation. Hier sind keine Unterschiede zur Qualität der Sterilisation im Vergleich zur Petri-Schale auszumachen und die Entscheidung für das jeweilige Sterilisationsverfahren wird entsprechend der zum Einsatz kommenden Materialien ausgewählt.



Tabelle 3: Anwendungsfelder für Mikrozellkultivierungssysteme

Anwendungsfelder für MZKS	Literaturquelle
Zellkulturtests	(Huang & Lee 2007)
Genexpressionsprofile, Vergleich zur Flaschenkultur, Lebendzellmonitoring	(Stangegaard et al. 2006) und (Thompson et al. 2004)
Quantifizierung der Zellkultur	(Di Carlo et al. 2006), (Hung et al. 2005) und (Hung et al. 2004)
Medikamentenscreening	(Hung et al. 2004)
Differenzierung, Lebendzellmonitoring	(Tourovskaja et al. 2005) und (Hing et al. 2000)
Proteinanalyse	(Li et al. 2005)
Hochdurchsatzanalysen	(Thompson et al. 2004)
Einzelzellstudien	(Jager et al. 2002) und (Ince & Beekman 1990)
Wirkung von Scherstress auf die 3D-Kultur	(Powers et al. 2002)
Detektieren, Manipulieren, Trennen, Charakterisieren; Signalübertragung, Beweglichkeit, Verformbarkeit, Stoffwechsel, Sekretion, morphologische Veränderungen, Oberflächenankopplung, nekrotisches Wachstum, Apoptose	(Prokop et al. 2004)

Tabelle 3 zeigt Anwendungsgebiete für die mikrosystembasierte Zellkultivierung adhärenter Zellen. In die Zellkammern wurden sehr verschiedene Zellzahlen von einigen hundert Zellen pro ml bis zu ca. drei Millionen Zellen pro ml eingebracht. Begründungen für diese Variationen wurden nicht angegeben. Je nach Zellart wird zwischen einer Viertel Stunde und 18 Stunden ohne Perfusion abgewartet, bis die Zellen in der Kammer adhärirt sind. Die Kultivierungsdauer ist von der Art des Versuches abhängig und liegt bei mindestens einem Tag und bis zu 21 Tagen für „Langzeitkultivierungen“.

Für die Kultivierung von Zellen wurde in den 1950er- bis 1970er-Jahren eine Reihe an Medien entwickelt, die bis heute in unveränderter Form zum Einsatz kommen. Für die Kultivierung im Mikrosystem, die ohne Inkubator abläuft, werden überwiegend Medien mit Hydrogencarbonatpuffersystem benutzt, die CO₂-unabhängig sind. Dazu gehören RPMI-1640, Leibovitz's L-15 Medium (Chang et al. 2003), Gibco® Zellkulturmedium, welches HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)) als biologisch

verträgliche Puffersubstanz enthält (Huang & Lee 2007), (Stangegaard et al. 2006) und (Hung et al. 2005). Häufig eingesetzt wird auch DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Di Carlo et al. 2006), (Tourovskaja et al. 2005), (Leclerc et al. 2003) und (Huang & Lee 2007), welches ein Standardmedium für Säugetierzellen darstellt.

Weiterhin zum Einsatz kommen HGM (Hepatocyte Growth Medium) (Powers et al. 2002) und Medium 199 (Ince & Beekman 1990). Bei der Langzeitkultivierung wird das bei einigen bekannten Systemen im Kreis zirkulierende Medium nach zwei bis vier Tagen ausgetauscht.

Für ein besseres Anwachsverhalten in den Mikrostrukturen werden diese zum Teil mit speziellen Proteinen beschichtet, wie es auch bei Petri-Schalen üblich ist (Poly-D-Lysin (Li et al. 2005), Poly-L-Lysin (Jager et al. 2002), Kollagen Typ I (Thompson et al. 2004), Fibronectin (Leclerc et al. 2003)). Es ist jedoch fraglich, ob nach mehrmaligen Spülvorgängen und Sterilisation im Sauerstoff-Plasma eine Wirkung erhalten bleibt (Jager et al. 2002).

Ein ernstes Problem bei der Kultivierung in Mikrostrukturen ist die Blasenbildung durch bei Temperaturänderungen ausgasendes Medium. Sollten Luftblasen über Schläuche in die Kultivierungskammern gelangen, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese aufgrund der Sieb- und Fangstrukturen und der engen Kanäle in der Kammer hängen bleiben und somit kein Medium mehr über den Zellen zu finden ist. Für kurze Zeiträume ist das Vorhandensein von Luft im System nicht schädlich, solange sich eine Flüssigkeitsschicht über den Zellen befindet. Jedoch führen länger anhaltende Trockenzustände zum Absterben der Zellen, dem sogenannten „Trockenfallen“. Diese Problematik ist bereits seit den Anfängen der Mikrofluidsysteme bekannt (Ince & Beekman 1990), und man begegnet ihr auf mehrere Arten. Das Vorheizen des Mediums vor dem Einbringen (Stangegaard et al. 2006) und (Ince & Beekman 1990) in das Mikrosystem verhindert eine Blasenbildung beim Aufheizen. Vorhandene Blasen kann man mit einer Durchspülung (Hung et al. 2004), (Powers et al. 2002) und (Ince & Beekman 1990) der Systeme entfernen. Das ist allerdings nur möglich, solange sich keine Zellen im System befinden, oder man muss die maximalen Scherraten beachten. PDMS hat eine gewisse Permeabilität für Gase. So können auch Blasen entfernt werden (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004), (Thompson et al. 2004), (Leclerc et al. 2003) und (Ince & Beekman 1990). Das ist jedoch ein sehr langsamer Prozess, der von der Fläche und Dicke der PDMS-Schicht abhängig ist. Charati & Stern (1998) haben mit Hilfe von Simulationen und Experimenten die Permeabilität verschiedener Polymere nachgewiesen. Der experimentell ermittelte Diffusionsquotient für Sauerstoff durch PDMS beträgt laut Charati & Stern (1998) $41 \times 10^6 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (anteiliges Freivolumen 0,33, Temperatur = 308 K).

Alle Varianten zur Verhinderung bzw. Unterdrückung der Blasenbildung, die heute genutzt werden, waren bereits zu den Anfängen der mikrosystembasierten Zellkultivierung bekannt (Ince & Beekman 1990). Am häufigsten setzt man auf die Permeabilität der Materialien. Im Prinzip kommt die vorherige Durchspülung der Kultivierungskammer indirekt zum Einsatz, wenn auch nicht mit dem primären Ziel der Erlangung der Blasenfreiheit, denn befüllt werden alle Systeme vor dem Einbringen der Zellen. Eingebracht werden Zellen über die Hauptkanäle mittels Spritzen bzw. Pipetten. In Hung et al. (2004) ist ein spezieller „Lade-Kanal“ für diesen Vorgang beschrieben. All diese Kanallösungen haben jedoch das Problem, dass eine Quantifizierung der Zellen in der Kammer nur über eine Auswertung mikroskopischer Bilder möglich wird.

2.1.3 Umgebungsbedingungen

Die Betrachtungen zum Umgang mit zu gewährleistender Sterilität, Temperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxidmenge und dem pH-Wert lassen sich unter dem Begriff „Umgebungsbedingungen“ zusammenfassen. In der herkömmlichen Zellkultivierung kommt ein Inkubator zum Einsatz, der ein für die Zellen geeignetes Klima realisiert. Viele der in der Literatur beschriebenen Mikrosysteme werden ebenfalls in einer solchen Atmosphäre benutzt (Di Carlo et al. 2006), (Di C. et al. 2006), (Tourovskaja et al. 2005) und (Chang et al. 2003). Das bringt jedoch Einschränkungen für die Handhabung und die Echtzeit-Beobachtung mit sich. Als Alternative werden teilkubierte Mikroskope verwendet, was allerdings eines hohen gerätetechnischen Aufwandes bedarf (Thompson et al. 2004) und (Prokop et al. 2004). Hierbei wird der gesamte Aufbau mit einer Inkubatorkammer umgeben. Angestrebt werden Lösungen, die komplett unabhängig von der Inkubation sind. Dafür muss sichergestellt werden, dass das Mikroklima trotzdem allen Anforderungen entspricht.

Die Soll-Temperatur liegt bei allen Säugerzellkulturen bei 37 °C. Erreicht wird diese bei inkubatorunabhängigen Realisierungen durch Temperaturmessung und Regelung der Wärmezufuhr in das Medium („Heizen“) (Stangegaard et al. 2006) und (Ince & Beekman 1990), über Heizung des Mikroskoptisches (Thompson et al. 2004), oder über Heizerstrukturen, die in das Mikrosystem integriert werden (TIO) (Hung et al. 2005) und (Huang & Lee 2007). Auch die Integration von Heizspulen (Hing et al. 2000) und (Ince & Beekman 1990) stellt eine Lösung dar. In Stangegaard et al. (2006), Ince & Beekman (1990) und Hing et al. (2000) kommen Thermistoren bzw. Mikrotemperatursensoren aus Platin und Gold (Huang & Lee 2007) zur Messung und Regelung der Temperatur zum Einsatz.



Eine Kontrolle des pH-Wertes erfolgt nur bei Stangegaard et al. (2006) und Huang & Lee (2007) durch Messung mit einem pH-Meter oder über den Farbumschlag des mit Phenolrot versetzten Mediums. Der physiologische pH-Wert ist artspezifisch und liegt beim Menschen bei $7,40 \pm 0,03$.

Im Inneren der Inkubatoren beträgt die CO_2 -Konzentration 5 %. In der Raumluft beträgt die CO_2 -Konzentration nur 0,3 %. Das führt zur Verschiebung des pH-Wertes in den toxischen Bereich. Zur Einstellung des erforderlichen pH-Wertes werden wie im Abschnitt „Zellkultur“ beschrieben gepufferte Medien verwendet (Stangegaard et al. 2006), (Hung et al. 2005), (Ince & Beekman 1990) und (Huang & Lee 2007). Neben dem bereits erwähnten biologischen Puffer HEPES kommt auch Buffer All (Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Erhöht sich der Kohlendioxidgehalt der Kultur, hat das ein Absinken des pH-Wertes zur Folge. Ist der Gehalt an Natriumhydrogenkarbonat erhöht, bewirkt dies wiederum eine Neutralisierung des pH-Wertes (Minuth et al. 2002).

Des Weiteren vertraut man auch hier auf die Möglichkeit des Gasaustauschs bei PDMS (Prokop et al. 2004) und (Chang et al. 2003) und geht davon aus, dass auf diesem Weg ausreichend CO_2 und Sauerstoff an die Kultur gelangen. Minuth et al. (2002) sprechen von gaspermeablen Schläuchen als „Lunge“ des Systems. Damit der Austausch optimal funktionieren kann, müssen möglichst lange Strecken, kleine Innendurchmesser und dünne Wandstärken realisiert werden, was zu einer großen Oberfläche für die Gasdiffusion führt. Das aufgeführte Beispiel eines Schlauches mit einem Innendurchmesser von 1 mm, einer Wandstärke von 1 mm und einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 ml/h führt bei einer Raumtemperatur 37°C und den damit verbundenen Raumatmosphärenbedingungen für Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit einem pH-Wert von 7,4 zu einer Sauerstoffkonzentration von >190 mm Hg (Minuth et al. 2002). Abbildung 3 zeigt, dass in der künstlich geschaffenen Atmosphäre eines Inkubators deutlich weniger Sauerstoff in IMDM vorzufinden ist als in einer Perfusionskultur unter Raumluftbedingungen.



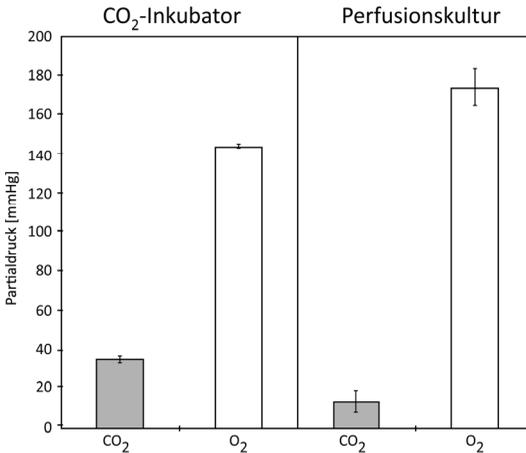


Abbildung 3: Messung der Sauerstoffkonzentration im Medium nach (Minuth et al. 2002, S. 119) links) IMDM im Inkubator rechts) IMDM in einer Perfusionskultur unter Raumluftatmosphäre

Leclerc et al. (2003) geben in ihrer Publikation folgende Berechnungsvorschrift für den Sauerstoffverbrauch $X_{O_2consumption}$ im Mikrosystem an:

$$X_{O_2consumption} = N_{cell/cm^2} \cdot X_{onecells} \cdot S_{device} \quad (1)$$

N_{cell/cm^2} bezeichnet die Zellzahl der im Mikrosystem befindlichen Zellen. Der Sauerstoffverbrauch einer einzelnen Zelle pro Sekunde $X_{onecells}$ wird zum Beispiel für Hepatozyten laut Rotem et al. (2004) mit $1 \times 10^{-16} \text{ mol}/\text{cell} \cdot \text{s}$ angegeben. S_{device} kennzeichnet die Zellkulturfläche (Bereich des Mikrosystems auf dem sich Zellen ansiedeln, in der Regel der Boden der Kultivierungskammer). Damit ist es möglich, einen Schätzwert für den Sauerstoffverbrauch anzugeben, ob die durch Diffusion in das System eindringenden Gasmengen (siehe 2.1.2) zur Versorgung der Zellen ausreichend sind.

Als Sterilisationsvarianten gelten UV-Licht (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004), (Prokop et al. 2004), (Leclerc et al. 2003) und (Huang & Lee 2007), Autoklavieren (Tourovskaja et al. 2005), (Powers et al. 2002) und (Ince & Beekman 1990) und das Spülen mit 70 %igem Ethanol (Di Carlo et al. 2006), (Powers et al. 2002) und (Ince & Beekman 1990). Welche dieser Varianten zum Einsatz kommt ist von der Eignung der verwendeten Materialien für diese Prozesse abhängig.

2.1.4 Versorgung

Im Gegensatz zu den Umgebungsbedingungen, die vor allem durch physikalische und chemische Parameter charakterisiert werden, wird unter Versorgung der Prozess der Einbringung der erforderlichen Medien und der Abführung der Abfallprodukte verstanden.

Zumeist besteht die Versorgungsstrecke der MZKS aus den Komponenten: Mikrosystem, Schlauchverbinder, Schläuche, Pumpen und Reservoir.

Als zentraler Bestandteil der Versorgungseinheit kommen unterschiedliche Pumpentypen zum Einsatz. Am häufigsten werden Spritzenpumpen (Stangegaard et al. 2006), (Di Carlo et al. 2006), (Hung et al. 2005), (Hung et al. 2004), (Prokop et al. 2004) und (Hing et al. 2000) verwendet. Die in Leclerc et al. (2003) oder Powers et al. (2002) in einer Miniaturversion verwendete Peristaltikpumpe wird abgelehnt, da sie Nachteile mit sich bringe, was die Blasenfreiheit und die Kontinuität des Flusses betrifft. Die Befüllung wird nicht den Pumpen überlassen, sondern manuell durchgeführt. Das Medium wird mit einer über Luer-Lock angeschlossenen Pipette oder Spritze direkt in das Reservoir und die Kanäle des Mikrosystems eingebracht (Powers et al. 2002). Einige Autoren schreiben über die Verwendung gravitationsgetriebener so genannter „constant flow syringes“ (Tourovskaja et al. 2005) und (Thompson et al. 2004). Bei diesen Systemen macht man sich die auf eine Flüssigkeit wirkende Gravitationskraft zu Nutze, die das System mit Medium aus einem höher gelagerten Reservoir versorgt. Auch an der Technischen Universität Ilmenau wurde bisher mit dieser Methode gearbeitet (Fröber et al. 2008). Für den Laborbetrieb ist diese Vorgehensweise eine kostengünstige und vor allem einfach zu realisierende Versorgungsvariante.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der in der Literatur beschriebenen Versorgungsvarianten und deren Vor- und Nachteile.



Tabelle 4: Vor- und Nachteile der Versorgungsvarianten

Versorgungsvariante	Vorteile	Nachteile
Gravitationsgetrieben	Einfacher Aufbau, kostengünstig	Kontrolle der Flussrate nur ungenau möglich, veränderliche Flussmenge durch Abnahme der Medienmenge im Reservoir
Peristaltikpumpe	Kontrolle der Flussrate	Blasenbildung, Diskontinuität / Pulsation
Kolbenhubpumpe	Kontrolle der Flussrate, kontinuierliche Versorgung	Steuerung über PC aufwändig, kostenintensiv
Mikro-Peristaltikpumpe mit Medienreservoir	Kontrolle der Flussrate	bei Funktionsausfall kein Eingriff möglich

Jene Schläuche, die zum Einsatz kommen, zeichnen sich durch ihre hohe Flexibilität aus. Polytetrafluorethylen (PTFE), Vinyl und Silikon sind geeignete Materialien. Bereits im Abschnitt 2.1.1. wurde auf den Anschluss dieser Versorgungsstrecken an das Mikrosystem eingegangen. Die jeweils verwendete Anschluss- und Verbindungstechnik wird im Folgenden näher erläutert. In Ince & Beekman (1990) werden die Schläuche mittels konischer Bohrungen und Stopfen ohne Kleber in das System eingebracht. In den Arbeiten von Tourovskaia et al. (2005) und Chang et al. (2003) wird hingegen von „vergossenen, eingebetteten“ Schläuchen gesprochen, was impliziert, dass hier Zusatzmaterialien in Form von Klebstoffen oder Versiegelungsmaterialien zum Einsatz kommen, die wiederum einen Einfluss auf die Zellkultur haben können. Ein weiterer Ansatz ist die Verbindung einer Stahlnadel mit einem Schlauch und deren Versiegelung von außen über einen Schrumpfschlauch (Prokop et al. 2004). Auch hier ist in keinem der untersuchten Artikel etwas über die Qualität der Verbindung zu finden. Aus eigenen Versuchen kann jedoch abgeschätzt werden, dass diese Varianten keine optimale Lösung darstellen.

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Pumpen wird eine kontinuierliche laminare Durchströmung der Mikrosysteme erreicht. Nur im Falle eines erforderlichen Medienwechsels und während der ersten Adhäsionsphase wird auf eine diskontinuierliche Betriebsart umgeschaltet. Über die Ansteuerung der Pumpen ist in den Artikeln nichts erwähnt, wobei dieser Aspekt jedoch für den Anspruch der einfachen Handhabung eine wichtige Rolle spielt.

Die zum Einsatz kommenden Flussraten richten sich in erster Linie nach den Anforderungen der Zellen. Um in den kleinen Kavitäten ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu haben und ausreichend Stoffwechselprodukte

abzutransportieren, bedarf es einer Mindestfließgeschwindigkeit, die auch vom Volumen abhängig ist. Die Flussraten vorhandener Systeme liegen zwischen $0,07 \mu\text{l}/\text{min}$ und $75 \mu\text{l}/\text{min}$.

Es muss unterschieden werden, ob die Strömung nur zur Versorgung und Aufrechterhaltung der Lebensbedingungen im Mikrosystem dient oder ob eine gezielte Beeinflussung der Differenzierung an den Zellen vorgenommen werden soll. Zur Versorgung wird der optimale Wert laut Hung et al. (2004) für das verwendete Mikrosystem mit HeLa-Zellen (siehe Tabelle 18 In MZKS verwendete Zellarten im Anhang A1) zu $0,12 \mu\text{l}/\text{min}$ angegeben. Liegen die Werte wie in Leclerc et al. (2003) jedoch in relativ hohen Bereichen (minimal $5 \mu\text{l}/\text{min}$, maximal $20.000 \mu\text{l}/\text{min}$) ist hingegen davon auszugehen, dass hier mittels der Strömung direkter Einfluss auf die Zellen genommen werden kann, soll oder genommen wird. Einige der Literaturquellen sprechen auch von einer Simulation der Strömungsverhältnisse im Mikrosystem. Dazu wird die Finite-Elemente-Methode eingesetzt (Di Carlo et al. 2006, Hung et al. 2005, Huang & Lee 2007 und Powers et al. 2002). Die Graphiken in

Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen das simulierte Strömungsverhalten in verschiedenen MZKS-Komponenten, in Abb. 5 im Vergleich mit dem Experiment.

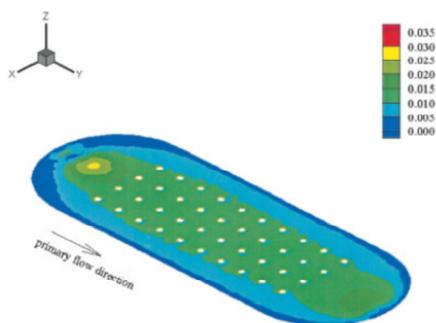


Abbildung 4: Simulation des Wandscherstresses an der Chipoberfläche (Powers et al. 2002)

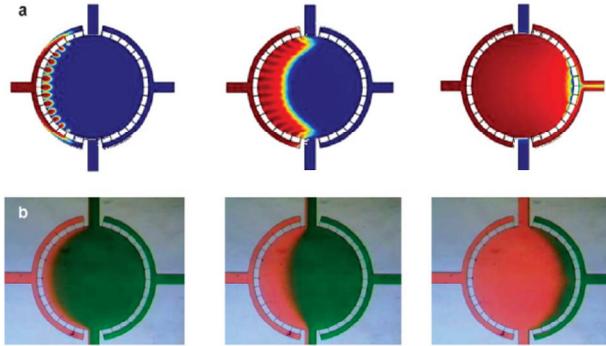


Abbildung 5: Darstellung der Durchströmung einer Kulturkammer von links nach rechts mit $2 \mu\text{l}/\text{min}$ (Hung et al. 2005)

- a) Simulation
b) farbige Tinte

Vor allem mit Hilfe solcher Simulationen kann abgeschätzt werden, welchen Scherkräften eine Zelle in einem durchströmten Mikrosystem ausgesetzt ist. Insofern Informationen zum applizierten Scherstress in den Publikationen getroffen werden, wird ausgeschlossen, dass er die physiologische Einflussgrenze erreicht (Thompson et al. 2004, Powers et al. 2002). Das wird derart realisiert, dass die Zellen aufgrund der Versorgungskanalpositionierung die Scherbewegung durch das Medium gar nicht „sehen“ (Stangegaard et al. 2006) und (Ince & Beckman 1990) oder, dass der Wert unter dem physiologischen Wert von $0,01 \text{ N}/\text{m}$ (Di Carlo et al. 2006) liegt. Allerdings widerspricht sich die Literatur, da in Tourovskaia et al. (2005) gesagt wird, dass Scherstress zwischen $0,005 \text{ N}/\text{m}$ und $0,1 \text{ N}/\text{m}$ unter anderem den Phänotyp, die Vitalität, die Metabolismen oder die Proteinexpression verändere.

Aus den Aussagen zu Strömungsbedingungen in MZKS in der Literatur lässt sich zusammenfassend Folgendes ableiten:

- Kontrolle oder Beeinflussung der Scherraten durch Durchströmungsgeschwindigkeiten und Flussbeeinflussung ist erforderlich und wünschenswert.
- Gezielte Manipulation zur Änderung des Verhaltens der Zellen ist möglich.
- Es gibt Grenzwerte, bis zu denen die wirkenden Strömungskräfte keinen Einfluss auf die kultivierten Zellen haben.

2.1.5 Beobachtung / Observation

Entscheidend für die Beobachtung sind die optischen Eigenschaften des Mikrosystems und somit der Kulturkammer, in welcher sich die Zellen befinden. Es muss gewährleistet sein, dass das System optisch transparent ist. Selbst Systeme, die ein undurchsichtiges Material wie Silizium oder Stahl enthalten, sind durch die Verwendung von PDMS oder Glas nur von einer Seite durchsichtig ausgelegt. Alle in der Literatur beschriebenen Mikrosysteme bieten die Möglichkeit, die Zustände im System mit verschiedenen Mikroskoptypen zu beobachten. Verwendet werden Phasenkontrastmikroskope, Fluoreszenzmikroskope, Invertierte Mikroskope und auch die Zwei-Photonen Laser Raster Mikroskopie (2PLSM) (Powers et al. 2002).

Erfasst werden die mikroskopischen Bilder in allen Fällen mittels CCD-Kameras (Charge-coupled Device). Nur in Stangegaard et al. (2006) wird im Zusammenhang mit der Bilderfassung und Verarbeitung eine NI-LabView® (National Instruments, Germany) basierte Software zur Sprache gebracht. Meist kommen Standardbildverarbeitungsprogramme wie Adobe® Photoshop® oder imagePro® zum Einsatz.

2.1.6 Zusammenfassung der Literatur zu Mikrozellkultivierungssystemen

Die Analyse der vorhandenen Literatur ergab, dass eine Vielzahl an BioMEMS zur Zellkultivierung existiert. Zumeist sind dies komplexe Aufbauten, die sich im Detail (Aufbau, Komponenten, Materialien, Herstellung) deutlich unterscheiden.

Tabelle 5 zeigt hierzu eine Übersicht. Auf Basis dieser Tabelle war es möglich, den Stand der Technik zu erfassen und verschiedene Systeme direkt miteinander zu vergleichen. Sie eignet sich ebenfalls als Referenz für die eigenen Arbeiten, indem der Grad der Realisation für spezielle technische und biologische Fragestellungen durch andere Forschergruppen näher betrachtet werden kann.

Festzustellen ist, dass es seit Jahren Bestrebungen gibt, die Zellkultivierungsumgebungen zu miniaturisieren. Die Gründe dafür sind vielfältig. Wesentlich ist jedoch die Tatsache, dass mittels der BioMEMS die Möglichkeit besteht, einzelne oder wenige Zellen gezielt zu untersuchen. Die jeweilige wissenschaftliche Fragestellung definiert die Funktionen der BioMEMS. Als nachteilig ist diesbezüglich zu bewerten, dass Modularität und somit Funktionsvarianz in den seltensten Fällen gegeben sind. Ebenfalls ist es nur bei wenigen Systemen möglich, direkten Eingriff in die Entwicklung der Zellen zu nehmen, beziehungsweise definierte Zellmengen einzubringen.

Die Ergebnisse der Recherche belegen die bereits im Abschnitt 1.2. identifizierte wissenschaftliche Lücke. Mikrosystembasierte mechanische Belastung von Zellen in inkubator-unabhängigen Systemen unter Online-Beobachtung existiert derzeit nicht, wird aber aufgrund der biologisch, medizintechnischen Fragestellungen nachgefragt. Die wesentlichen Systemkomponenten wurden vorgestellt (Mikrosystem, Zellkultur, Versorgung, Umgebungsbedingungen, Scaffolds, Beobachtung). In den meisten Fällen steht die Zellkultivierung im Vordergrund, und der wichtige Aspekt der Handhabung bleibt außen vor. Komponenten zur Manipulation und Beanspruchung von Zellen werden in separaten Kapiteln untersucht. Sie gelten in der Regel nicht als Komponenten des Gesamtsystems.

Tabelle 5: Stand der Technik Mikrozellkultivierungssysteme

Die Tabelle ist online veröffentlicht und zu finden unter:
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:ilm1-2010000436>



2.2 Zellmanipulation

Zellen sind Objekte, deren Handhabung, insbesondere deren einzelne Handhabung, vom Menschen nur schwer von Hand durchzuführen ist, da die Größe der Objekte zwischen 5 µm und 500 µm liegen. Daher ist es erforderlich, für die verschiedenen biologischen und medizinischen Handhabungsaufgaben technische Geräte zu nutzen, deren Präzision und Reproduzierbarkeit jene der menschlichen Hand übertreffen. Literatur, die sich mit der Kultivierung von Zellen in Mikrosystemen befasst und den Aspekt der Manipulation gleichermaßen mit in Betracht zieht, existiert nicht. Aber losgelöst von der mikrosystembasierten Zellkultivierung ist eine große Vielzahl an Literatur zur Manipulation von Zellen zu finden.

Für die Zellmanipulation eignen sich insbesondere mechanische Mikromanipulatoren. Dieser Begriff fällt häufig im Zusammenhang mit mikrorobotischen Systemen für Handhabungsprozesse. Die Handhabung/Handhabetechnik wird in der Lehrschrift „Präzisionsrobotertechnik“ (Kallenbach 1981, S. 12) folgendermaßen definiert:

„Handhaben ist das Aufnehmen, Halten, Positionieren und Ablegen eines Objektes ohne beabsichtigte Veränderungen von Form und Beschaffenheit des Objektes.“ und „Handhabetechnik ist daraus abgeleitet die Gesamtheit aller materiellen Mittel und Verfahren zum Handhaben von Objekten. Dazu gehört zunächst eine Einrichtung, die in der Lage sein muss, auf ein zu handhabendes Objekt vorübergehend Kraft auszuüben, um es aus einer gegebenen Situation entfernen, festhalten und in einer neuen Situation wieder freigeben zu können. Das ist der Greifer...“.

Diese strenge Definition des Begriffs Handhabung erfasst die Einsatzgebiete für die Zellmanipulation jedoch nicht umfassend, da hier zum einen auch gezielte Eingriffe zur Veränderung von Objekten vorgenommen werden (*In vitro*-Fertilisationstechniken IVF) und andere Werkzeuge genutzt werden (zum Beispiel Kapillaren oder Ösen). Der Begriff „Mikromanipulation“ nach Abbott ist für die mechanische Zellmanipulation treffender: ...robotic manipulation of objects with characteristic dimensions in the millimeter to micrometer range..“ (Abbott et al. 2007, S. 92). Diese Definition ist angelehnt an Johansson (1995), der den Mikromanipulator nach der Aufgabe oder der Größe definiert: „...Gerät, das kleinere Dimensionen hat als klassische Uhrmacherbauteile (µm-mm), und das die Möglichkeit hat, sich zu bewegen, Kräfte zu übertragen und Objekte zu manipulieren [...] in einer Arbeitsumgebung mit Dimensionen im Mikrometer und Submikrometerbereich...“

Der Manipulator ist nach (Kallenbach 1981, S. 13) ein: „...gesteuertes technisches Hand-habesystem mit Greifer und Greiferführung zum

räumlichen Verlagern von Objekten.“ Ersetzt man den Greifer durch eine allgemeinere Formulierung mit „Werkzeug“ und ergänzt die Größenordnung der Objekte, lässt sich diese Festlegung auch für das in dieser Arbeit beschriebene System nutzen.

Unter dem Aspekt der verschiedenen Definitionen der Mikromanipulation muss auch der Begriff „Zellmanipulation“ umfassend definiert werden. 1881 beschäftigte sich Robert Koch mit der Vereinzelung von Mikroorganismen mit Hilfe der Plattengussverfahren. In den 1950er und 60er Jahren gab es erste Ansätze, Zellen mit Hilfe mechanischer Instrumente während der Beobachtung mit dem Mikroskop zu beeinflussen (Otto 1954,) und (Skerman 1968). Aktuelle Literatur begründet die Erfordernis der Manipulationstechniken für Zellen anhand der geringen Objektgrößen und bezeichnet nicht nur mechanische Techniken zum Halten und Positionieren von Zellen, sondern auch direkte Eingriffe in die Zelle und die Messung mechanischer Eigenschaften der Zellen als „Zellmanipulation“ (Abbott et al. 2007).

Unter dem Begriff „Zellmanipulation“ versteht man somit die Handhabung von Zellen sowohl mit als auch ohne Veränderung der mechanischen und biologischen/genetischen Eigenschaften der Zellen. Ausgehend von der Begriffsklärung lassen sich Anwendungsfelder erläutern und deren technische Realisationen beschreiben.

2.2.1 Anwendungsgebiete der Zellmanipulation

Geigl & Speicher (2008, S. 407) beschreiben „... verschiedene Techniken zur Einzelzell-analyse mit besonderem Schwerpunkt auf neue Verfahren zur Amplifikation des gesamten Genoms und anschließender hochauflösender Auswertung mittels Array-techniken.“. Die Anwendungsgebiete der Zellmanipulation sind vor allem in den Bereichen der Grundlagenforschung, der Bearbeitung klinischer Fragestellungen und der forensischen Anwendungen zu finden. Die im Folgenden aufgezählten Anwendungsfelder stellen einen Abriss der Möglichkeiten dar und sind beispielhaft als am häufigsten vorkommende Varianten zu sehen. Ein Anspruch auf Vollständigkeit wird nicht erhoben.

Die Anwendungsfelder lassen sich unterteilen in:

- Handhabung von Zellen und Zellmaterial:
 - Zellentnahme (Selektion),
 - Positionieren, Greifen, autonome Manipulation einzelner Zellen oder Moleküle (Nelson et al. 2008),
 - Automatisierung der Zellkultivierung (Desai & Pillarisetti 2007) und
 - Auswahl bestimmter Zellen mit besonderen Eigenschaften, Isolation von Zellen zur Erzeugung einer „reinen, sauberen“ Kultur, Adressierung



spezieller Positionen im Medium, stabile Positionierung für die Beobachtung (Brehm-Stecher & Johnson 2004).

- Direktes Eingreifen:
 - Injizieren von Material in Zellen (Nelson et al. 2008, Desai & Pillarisetti 2007),
 - Einzelzell-PCR (Polymerase-Kettenreaktion), Vervielfältigung der DNA (Brehm-Stecher & Johnson 2004) und
 - Intrazytoplasmische Spermien-Injektion (CSI), Pronuclei-DNA-Injektion, Gentherapie (Einfügen von Genen in Zellen) (Desai & Pillarisetti 2007).
- Messung von Zellparametern:
 - Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften von Biomembranen (Nelson et al. 2008),
 - Hochdurchsatzverarbeitung biologischer Proben (Desai & Pillarisetti 2007),
 - Messung der chemischen Bindung, diskreten Bindungen und anderer Interaktionskräfte und
 - Physikalische oder strukturelle Charakteristiken einer individuellen Zelle (Brehm-Stecher & Johnson 2004).

2.2.2 Methoden der Zellmanipulation

Für die unterschiedlichen Anwendungsfelder werden verschiedene Werkzeuge und Methoden ihrer Steuerung benötigt. In der Literatur wird häufig zwischen berührungslosen Methoden und Methoden mit direktem Zellkontakt unterschieden (Nelson et al. 2008) und (Brehm-Stecher & Johnson 2004), wobei nur die klar einzuordnenden Methoden Optische Pinzette, Dielektrophorese (ohne Kontakt) und mechanische Manipulation (mit Kontakt) aufgezählt werden. Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der wesentlichen Methoden mit deren Untersetzung sowie auch eine Reihe spezieller Methoden, die in Sonderfällen zum Einsatz kommen. Vor allem die fluidische Manipulation und Laserdissektion lassen sich nur schwer in „mit Kontakt“ und „berührungslos“ einordnen.

Aufgrund der fortwährenden Entwicklungen der angegebenen Technologien auch ist eine strikte Unterteilung in zweidimensional (2D) und dreidimensional nicht möglich. Viele der strikt zweidimensionalen Verfahren (z.B.: Optische Pinzette) lassen sich durch geschickte Kombination mit anderen Verfahren oder durch mehrfaches Anwenden auf alle Raumrichtungen erweitern. Wobei dann fraglich ist, ob man von echter Dreidimensionalität sprechen kann, wenn diese nur seriell erreicht wird.

Aus diesen Gründen wird in Abbildung 6 auch nur auf die Optionen „2D/3D“ und „mit Kontakt/berührungslos“ hingewiesen.

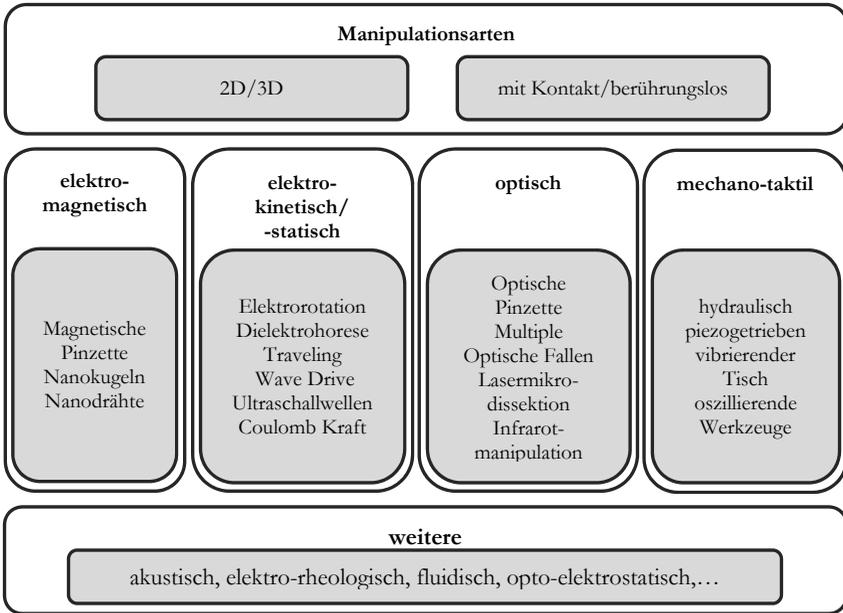


Abbildung 6: Methoden der Zellmanipulation

Der folgende Abschnitt beschreibt einige der in der Literatur dargestellten Methoden, wobei den mechano-taktilen Varianten eine Sonderstellung zu Teil wird, da diese zum einen die am häufigsten genutzten und zum zweiten auch die für die Zielstellung dieser Arbeit relevanten Manipulationsmethoden sind.

Einige Autoren stellen vor die Darstellung der eigenen Realisierungen einen Überblick der existierenden Methoden. Fröhlich & König (2000) konzentrieren sich dabei insbesondere auf Methoden zur Aufnahme von Zellen, wie zum Beispiel die „Back to Tip“-Methode, die mit Mikrokapillaren arbeitet, die Lasermikromanipulation (Optische Pinzette und Lasermikrodissektion). Kommerziell sind derartige mit hohem gerätetechnischem Aufwand verbundenen Systeme von Eppendorf und Zeiss erhältlich.

Optische Methoden sind überwiegend durch die Anwendung von Laserlicht für Optische Pinzetten und für die Mikrodissektion gekennzeichnet. Die Grundlagen dafür legte bereits Ashkin (1970) mit seiner Beschreibung der Wirkung von durch die Streuung des Lichtes verursachten Kräften auf Teilchen mit Größen im Mikrometerbereich. So wird es möglich Zellen mittels hochkollimiertem fokussiertem Lichtes einzufangen, zu bewegen, zu ziehen und zu schneiden (Brehm-Stecker & Johnson 2004). Auch wenn kein

physikalischer Kontakt besteht, ist eine Zerstörung der Zellen durch das Licht möglich.

Kombiniert man mehrere optische Fallen miteinander, kann man für das Fangen mit Licht ungeeignete Partikel auch indirekt zwischen zwei gefangenen Partikeln halten (Visscher et al. 1993). Dafür benötigt man jedoch die Echtzeit-3D-Information, die mittels spezieller bilateraler Konfokaler Laser Raster Mikroskopie (CLSM) ermittelt werden kann. Optische Pinzetten können besonders für Transportprozesse zum Einsatz kommen, indem man sie mit mikrofluidischen Strukturen kombiniert (Luo et al. 2007).

Bei der Lasermikrodissektion werden Zellen auf einer Membran ausgeschnitten und mittels der Lichtenergie in ein anderes Gefäß katapultiert. So gewinnt man Proben einzelner Zellen für die Einzelzellanalyse (Emmert-Buck et al. 1996).

Weitere Anwendungsfelder der optischen Manipulation sind der automatisierte optische Manipulator zum Fangen biologischer Partikel von Buican et al. (1987) und der Zellsortierer von Wang et al. (2005).

Elektromagnetische bzw. magnetische Methoden sind all jene, bei denen mit Magnetkräften gearbeitet wird. In den meisten Fällen wird ein gerichtetes elektromagnetisches Feld aufgebaut, mit dessen Hilfe es möglich ist, mit magnetischen Partikeln markierte Zellen zu manipulieren und mechanische Kräfte zu applizieren (Spero et al. 2008). Magnetische Pinzetten bieten gegenüber der Optischen Pinzette den Vorteil, dass auch die Ausführung von Rotationsbewegungen möglich wird (Gosse & Croquette 2002).

Für *elektrokinetische/-statische Methoden* der Zellmanipulation werden elektrische Felder genutzt. Besonders bekannt sind die sogenannten Paul'schen Käfige oder Penning traps. Brehm-Stecher & Johnson (2004) beschreiben die Elektrokinetische Manipulation, Elektrorotation und die Dielektrophorese. Bei letzterer kann man Zellen basierend auf ihren dielektrischen Eigenschaften fangen, bewegen, trennen und konzentrieren. Dieses Verfahren kommt bei der Durchflusszytometrie zum Einsatz.

Böttcher (2005) beschreibt gravitationsgetriebene Lab-On-Chip-Systeme, bei denen „mittels hochfrequenter elektrischer Felder zwischen Mikroelektroden, die in einen Glaskanal ragen“, Mikropartikel oder Zellen manipuliert werden können. Die Dielektrophorese ist eine berührungslose Manipulation.

Besonderes Augenmerk sei auch auf *fluidische Manipulation* gerichtet, da diese eine einfach zu realisierende Manipulationsmethode ist, denn die Versorgung Zellen erfolgt in Mikrosystemen fluidisch. Jedoch stellt sich die genaue Dimensionierung der wirkenden Kräfte als schwierig dar. Zum Beispiel basieren die Arbeiten von Beebe et al. (2002) auf den mikrofluidischen Eigenschaften kleiner Kanalstrukturen, wie sie auch im natürlichen Vorbild,

egal ob in Pflanze oder Tier vorkommen. Er sieht darin einen Vorteil gegenüber der klassischen Mikrotropfenmethoden. Brevig et al. (2003) hingegen experimentieren mit der gezielten Veränderung der Strömungsbedingungen in offenen Mikrosystemen. Zu bemerken ist, dass die genaue Analyse fluidischer Methoden selten möglich ist, da sich die im Inneren der Mikrosysteme wirkenden Kräfte nur schwer messen lassen.

Im Mikrobereich dominieren zwischen Endeffektoren, Objekten und Substraten Adhäsionskräfte in Form von van der Waals-Kräften, Kapillar- und elektrostatischen Kräften. Untersucht wurde das Phänomen, dass beim Einsatz eines *oszillierenden Endeffektors* die Anziehungskräfte zwischen Endeffektor und Objekt verringert und zwischen Objekt und Substrat vergrößert werden. Dies wird experimentell und simulativ dargelegt (Wantanabe & Jiang 2006). Anwenden lässt sich dies für Lösungsvorgänge allerdings nur an Luft. Für den weit häufigeren Einsatz unter Wasser eignet sich diese Methode wegen der deutlich höheren Viskosität des Mediums wahrscheinlich nicht.

Der an den (vorrangig literarischen) Visionen von Lem, Adams und Drexler orientierte Ansatz von (Chrush & Podaima 2002) zur *Intrazellulären Manipulation* sei hier nur kurz erwähnt, da nicht auszuschließen ist, dass sich „Cytobots“, die so klein sind, dass sie im Inneren der Zelle agieren, in den nächsten Jahrzehnten zur Manipulation an/in Zellen durchsetzen. (Chrush & Podaima 2002) legen Designvorschläge dar, die auf Micro- und Nanotechnologien basieren, jedoch würde die Realisierung von Nanomechaniken die Weiterentwicklung der Designs verlangen.

2.2.3 Mechanische Mikromanipulation

Die ersten beschriebenen Manipulatoren sind am Mikroskop angebrachte Werkzeughalter, die von Hand bedient oder ausgerichtet werden. Laut Brehm-Stecher & Johnson (2004) sind die ersten Versuche zur mechanischen Manipulation bereits 1951 dokumentiert worden.

Ebenfalls ohne aktive Teile funktioniert der Manipulator von Skerman (1968), der über einen Magneten an der Objektivhalterung befestigt wird. Skerman gelang es damit, Bakterien auf der Oberfläche einer Agarplatte zu verschieben. Auch Sherman (1973) beschreibt einen solchen mechanischen Manipulator (MPM-0-100, Affiliated Mfgs. Inc., Whitehouse, USA) zur Manipulation von Hefezellen.

Im Gegensatz dazu nennen Codourey et al. (1995) den im Rahmen des Projektes „Nanorobotics“ an der ETH Zürich entwickelten Manipulator einen Roboter, da sich dieser frei im Raum bewegen kann. Eine weitere Entwicklung in diese „autonome“ Richtung ist nicht zu beobachten. Alle beschriebenen Systeme werden direkt am Mikroskop angebracht und sind fixiert.



Yanagida et al. (1998) vergleichen die Ergebnisse der CSI mittels Hand und mittels Manipulator. Es zeigen sich signifikant bessere Ergebnisse durch die Arbeit mit einem Manipulator, sowohl bei den Befruchtungsraten, als auch bei den folgenden Schwangerschaften. Bei dem beschriebenen Manipulator handelt es sich um einen Nadelhalter der Firma Leitz und einen Mikromanipulator mit piezoelektrischen Elementen (Manipulator: PMM-MB-AController: PMAS-CT-140, Prime Tech Ltd., Tsuchiure, Ibaragi, Japan).

Kim et al. (2004) beschreiben ein mikrorobotisches System zur Messung mechanischer Kräfte einzelner Zellen (Zebrafischeier). Eine detaillierte Erläuterung der Gerätetechnik erfolgt nicht.

Kawase et al. (2009) stellen ebenfalls einen Piezomikromanipulator vor, der zur CSI benutzt wird. Ishoy et al. (2006) nutzen einen Mikromanipulator (MultiControl 2000 ITK Lahnau, Germany) und den Eppendorf Transjector 5246 für die Manipulation einer Mikrokapillare in einer 12 mm-Bohrung, welche sich in einem 3 mm dicken Objektträger befindet. Über die Realisierung der Bewegungen in der dritten Dimension (der Höhe) erfolgt keine Aussage.

Eine weitere mechanische Zellmanipulationstechnik ist die Capillary Pressure Microinjection (CPM). Diese wird mit einem computergesteuerten mikrorobotischen System mit einem Freiheitsgrad von drei durchgeführt. Mittels einer piezogetriebenen Pipette kann man die CSI durchführen (Desai & Pillarisetti 2007).

Xu & Li (2008) und Xu et al. (2009) nutzen einen zweidimensionalen Mikromanipulator mit Piezoantrieb. Dieser hat einen großen, unflexiblen Aufbau, erfasst einen Arbeitsbereich von $260\ \mu\text{m}$ mal $260\ \mu\text{m}$ und arbeitet mit einer Genauigkeit von $0,73\ \mu\text{m}$ und bis $1,02\ \mu\text{m}$. Gesteuert wird er über einen Servomotor.

Einen MEMS-basierten Mikrogreifer mit integrierter Zwei-Achsen-Kraft-Rückkopplung stellen Liu et al. (2009) vor. Der Manipulator hat einen Freiheitsgrad von drei, der eine kraft-kontrollierte mikrorobotische Zellmanipulation (Aufheben, Transportieren, Platzieren) ermöglicht. Damit kann schnell auf Veränderungen der Größe und Steifigkeit von Zellen reagiert werden. Die Steuerung erfolgt unter Nutzung eines Bildverarbeitungsalgorithmus. Genutzt wird diese Technik zur Messung zellulärer Kräfte. Über die Gerätetechnik des Manipulators wird nichts berichtet.

Thielecke et al. (2005) fanden heraus, dass mechanische Methoden mit Nadeln als Werkzeug besonders schonend einsetzbar sind, wenn man die Geräte extrem langsam ($8\ \text{nm/s}$) bewegt. Auf diese Weise werden keine Zellen geschädigt oder von der Adhäsionsfläche abgerissen.

Die Technik zur Manipulation wird in der Regel mittels des piezoelektrischen Effekts oder mit Gleichstromschrittmotoren angetrieben (Abbott et al. 2007). Es kann festgestellt werden, dass die gravierenden Neuerungen nicht im gerätetechnischen Bereich liegen, sondern in der Realisierung der Dreidimensionalität, der Krafterückkopplung und der Bildverarbeitung. Diese Aspekte finden sich im Abschnitt Steuerung (2.2.5.) wieder und werden dort näher beleuchtet. Einem großen Wandel unterliegen ebenfalls die zum Einsatz kommenden Werkzeuge, die am Manipulator befestigt werden und heute bereits selbst aktuiert sein können. Der folgende Abschnitt befasst sich mit existierenden Ansätzen für Manipulationswerkzeuge.

2.2.4 Manipulationswerkzeuge

Skalierungseffekte führen dazu, dass Oberflächenspannungen, elektrostatische Kräfte und van der Waals-Kräfte zu nahezu unüberwindbaren Hindernissen werden. Schon die im Makroskopischen einfache Aufgabe, ein Bauteil aufzunehmen und an einer neuen Position abzulegen, stellt im Mikroskopischen eine große Herausforderung dar (Abbott et al. 2007). Die Manipulation von Teilen im Mikrometerbereich erfordert den Einsatz miniaturisierter Werkzeuge mit Endeffektoren, deren Abmessungen denen der zu manipulierenden Objekte entsprechen (Abbott et al. 2007).

Schon zu den Anfängen der Zellmanipulation wurden scharfe Spitzen, Knöpfe und Mikroschlingen als geeignete Werkzeuge beschrieben. Nakao et al. (2001) gelang es, einzelne Objekt eines Größes unter 1 mm mit einer Nadel als Werkzeug zu manipulieren, deren Spitze so groß war wie das zu handhabende Objekt. Das Mikroobjekt befand sich in einer Platte mit Haltestrukturen und konnte unter Echtzeitbeobachtung verschoben und rotiert werden. Greifer, Haken, Schaufeln, Fangkörbe (Skerman 1968) und Patch-Clamp-Werkzeuge ergänzten dieses Portfolio.

Eines der häufigsten Werkzeuge ist wie bereits erwähnt eine feine Glaspipette, welche mittels eines Unterdrucks Zellen zerstörungsfrei halten und positionieren kann (CPM), um dann mit anderen Werkzeugen Eingriffe an der Zelle durchzuführen (CSI).

Neben den beschriebenen Instrumenten arbeiten vor allem asiatische Wissenschaftler häufig mit Werkzeugen, die mittels zweier Nadeln menschliche Finger oder „Essstäbchen“ nachahmen. Tanikawa et al. (1996) zeigen eine Zwei-Finger-Mikrohand, die in der Lage ist, Glaskugeln mit einem Durchmesser von 2 μm aufzunehmen, diese zu platzieren und zu drehen. Ebenfalls eine automatisierte Mikromanipulation mittels zweier Nadelspitzen, die wie eine menschliche Hand funktionieren, präsentieren Suzuki et al. (2003). Damit kann man Objekte aufheben und rotieren. Der Mechanismus des haltenden mikrorobotischen Manipulators ist als Parallelkinematik realisiert,

basierend auf der Funktionsweise einer „Stewart-Plattform“ und hat je Nadel einen translatorischen Freiheitsgrad von drei.

Neue Fertigungstechnologien der Mikrosystemtechnik und neue Materialien erlauben heute die Entwicklung komplexer Werkzeuge. Dazu gehören Polymer-MEMS-basierte Greifer (Chronis & Lee 2004), Mikrogreifer, die Elektrostatik, thermische Expansion, den piezoelektrischen Effekt, den Magnetismus oder die Eigenschaften von Form-Gedächtnis-Metallen nutzen (Abbott et al. 2007). Das gilt gleichermaßen für mit Sensoren versehene Mikropinzetten, die eine Variante der Mikrogreifer sind (Choi et al. 2008). Auch Volland et al. (2007) beschreiben siliziumbasierte Mikrogreifer, die thermisch gesteuert werden.

2.2.5 Steuerung der Mikromanipulatoren

Die meisten mechanischen Mikromanipulatoren, die mit Werkzeugen versehen sind, werden auf Basis einer optischen Überwachung gesteuert. Bei einer Bedienung von Hand, zum Beispiel über einen Joystick, wird das aktuelle Mikroskopbild auf einem Bildschirm angezeigt. Diese Variante kommt bei den meisten kommerziell verfügbaren Gesamtsystemen (Eppendorf AG, Carl Zeiss AG) zum Einsatz.

Soll die Steuerung automatisiert werden, werden neben visuellem Feedback (Wang et al. 2007) weiterführende Ansätze genutzt, wie zum Beispiel der Einsatz einer Kraftsensorik für ein Force-Feedback oder eine Umsetzung von Kraftmesswerten für ein akustisches Feedback (Mitsubishi et al. 1993). Oft findet eine Kombination mehrerer Konzepte statt, um eine dreidimensionale Steuerung zu realisieren (Nelson et al. 2008).

Um die visuellen Methoden zu verbessern, gibt es Realisierungsvarianten, welche die Werkzeuge mit Markern versehen (optische Faser als Leuchtpunkt) (Kawaji et al. 1999).

Bei allen Steuerungskonzepten wird die Realisierung der kontrollierten Bewegung in der dritten Dimension entweder gar nicht angesprochen oder als kompliziert und aufwändig zu realisieren dargestellt. Der Einsatz einer Darstellung als 3D-virtuelle Realität ist ein Ansatz, der über die Errechnung von Tiefeninformation über einen Fokusscan erreicht wird (Kawaji et al. 1999). Ebenfalls über die Bildverarbeitung arbeitet der Algorithmus von Buerkele et al. (2001). Bei dessen „MINIMAN“ Robotern wird eine Nadelspitze detektiert und für die dritte Dimension eine Triangulation mittels Laser vorgenommen.



2.3 Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen

Als Ziel der Arbeit wurde die Entwicklung eines Mikrosystems festgelegt, dass die Aufprägung mechanischer Kräfte auf ausgewählte Zellen in der Kultur ermöglicht. Daher ist die ausführliche Auseinandersetzung mit Theorien dazu und verfügbaren Systemen unerlässlich. Auf die Erläuterung der Literatur zu diesem Teilgebiet wird an dieser Stelle vorerst verzichtet, da wie zuvor bereits begründet zuerst die Basis gelegt werden muss, um später auf diesen wesentlichen Punkt zurück zu kommen. Die Erläuterung der recherchierten Methoden erfolgt in Kapitel 5 im Anschluss an die Beschreibung des Systemaufbaus des selbst entwickelten Grundsystems.



3 Anforderungen an ein Zellkultivierungs- und Handhabungssystem

Aus den umfangreichen Analysen zum Stand der Technik in allen für das Ziel der Arbeit - die Entwicklung eines mikrosystembasierten Zellkultivierungs- und Handhabungssystems zur Applikation mechanischer Reize auf adhärente Zellen - relevanten Bereichen lassen sich die Anforderungen für die Ausgestaltung der Systemkomponenten ableiten:

- Zellkultivierung,
- MZKS,
- Bildverarbeitung,
- Mikromanipulation,
- Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen.

Die Zusammenstellung der Anforderungen erfolgt aus Sicht des Anwenders, dieser handelt letztlich „in Vertretung“ der Bedürfnisse der Zellkultur selbst.

3.1 Anforderungen adhärenter Säugetierzellen

Für die Beschreibung der Anforderungen ist anzumerken, dass sich einige nicht primär den Bedarfen der Zelle oder den Bedarfen und Bedürfnissen der Anwender zuordnen lassen, sondern dass es Überschneidungen der „Interessen“ gibt. Das gilt zum Beispiel für die Versorgung mit frischem Medium. Zum einen ist eine qualitativ und quantitativ ausreichende Versorgung eine zwingende Forderung der Zellen, jedoch muss die Handhabung dieses Vorgangs auch benutzerfreundlich gestaltet werden. Diese Doppel- und Mehrfachforderungen werden immer vom Ursprung der Forderung ausgehend beschrieben. Im Normalfall ist das die Zelle, denn zum Beispiel müsste ohne deren Anspruch auf adäquate Versorgung kein Medium getauscht werden.

Als Ausgangsbedingungen für die Anforderungsformulierung kann bemerkt werden, dass es ein Ziel ist, der Situation wie sie Zellen *in vivo* vorfinden möglichst nahe zu kommen. Die Handhabung muss einfach und möglichst automatisierbar sein. Durch die Festlegung von Parametern werden Steuerung und Regelung der Prozesse realisierbar.

Zellen im Organismus sind physiologisch solchen Stabilisierungs- und Regelungsprozessen unterworfen. Eng damit im Zusammenhang ist der Begriff der Homöostase zu sehen. Nach (Hentschel & Wagner 1990) bezeichnet der Begriff die „... physiologische (normale) Stabilität des Stoffwechsels, der Körpertemperatur, des Blutdrucks usw. und ihre



Verteidigung gegenüber den Störungen der Umwelt. Die Aufrechterhaltung der Homöostase wird vom vegetativen Nervensystem gesteuert.“ Wesentliche Komponenten dieser Selbstregulationseigenschaften werden den Zellen durch das Entnehmen aus dem menschlichen Körper genommen. Daher muss die Regulation teilweise vom die Zellen beherbergenden System übernommen werden. Penzlin (1991) beschreibt die natürliche Umwelt der Zellen als „ein körpereigenes extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen“. Die Regulationsmechanismen sorgen dafür, dass sich die „chemische Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften trotz des intensiven Stoffaustausches mit den aktiven Körperzellen in der Regel nur wenig ändern.“ Die natürlichen Regelmechanismen müssen an dieser Stelle durch den Anwender nach den Bedürfnissen der Zelle sichergestellt werden.

3.1.1 Sterilität

Mit Hilfe verschiedener Sterilisationsverfahren soll erreicht werden, dass Mikroorganismen und Viren abgetötet werden, welche die Zellkultur beeinflussen und schädigen könnten. Sicher ist jedoch, dass keines der Verfahren zu einer 100 %-igen Abtötung der Keime führt (Lindl & Gstraunthaler 2008) – „Sterilisation“ ist ein Euphemismus für „möglichst weitgehende Desinfektion“, der Übergang ist rein definitorisch.

3.1.2 Temperatur

Die Temperatur, welcher die kultivierten Zellen ausgesetzt werden, muss für Zellen humaner Herkunft bei stabil 37 °C liegen (Schmitz 2009 S. 44). Die Schwankungen der Inkubatoren werden durch die jeweiligen Hersteller im Allgemeinen mit maximal +/- 0,5 °C angegeben. Das erfordert ein ebenfalls stabil temperiertes Medium, damit alle intra- und extrazellulären Prozesse der Signalübertragung und des sonstigen Stoffaustausches wohlgeordnet und störungsfrei ablaufen (Schmitz 2009). Eine detailliertere Angabe zu tolerierbaren Schwankungen als zuvor angegeben ist in der Literatur nicht zu finden, was mit der Individualität verschiedener Zellarten und Zellen zusammen hängt. Bei nicht-humanen Zellen ist zudem von anderen Basaltemperaturen auszugehen. Abweichende Werte nach unten sind zeitlich begrenzt tolerabel, solange sich keine unkontrollierten Eiskristalle bilden. Es wird lediglich der Stoffwechsel der Zelle quantitativ herunter gefahren. Eine Abweichung hin zu höheren Temperaturen führt ab ca. 40 °C (reversibel) und ab ca. 42 °C (irreversibel) zu Schädigungen, da einige der in der Zelle enthaltenen Eiweiße denaturieren. Eine Regelung der Temperatur der Versorgungsmedien in den physiologischen Bereich von 37 °C ist zwingend erforderlich. Konkrete Angaben über die Höhe und die Dauer der tolerierbaren Abweichungen vom genannten Optimum von 37 °C werden in

der zugeordneten Literatur nicht gemacht. Die Befragung verschiedener Fachleute blieb ebenfalls ergebnislos. Daher wird für diese Arbeit als Standardwert der Schwankungsbereich der handelsüblichen Inkubatoren von $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ als Anforderung der Zellen an die Kultur angenommen.

Eine der Hauptquellen für einen unkontrollierten Wärmeeintrag stellt die Beleuchtung des Mikroskops dar, auch wenn mit Kaltlichtquellen gearbeitet wird. Besonders für ein Echtzeit-Monitoring, bei welchem längere Beleuchtungszustände erforderlich sind, sind Maßnahmen zu ergreifen, die eine unzulässige Erwärmung der Zellkultur verhindern.

3.1.3 Strömungsverhältnisse

Befindet sich eine Zelle im Organismus, ist sie stetigen Strömungen und Kräfteinwirkungen ausgesetzt (siehe Abschnitt 5.1). Daher ist davon auszugehen, dass eine Perfusionskultur die realen „Lebensbedingungen“ der Säugerzelle „korrekter“ abbildet, als eine statische Kultur in der Kulturflasche oder Petri-Schale.

Im Inneren des Mikrosystems sollte gewährleistet werden, dass an allen Stellen die gleichen Bedingungen vorherrschen. Die durch die Strömung verursachten Kräfte, die auf die kultivierten, adhärenen Zellen wirken, dürfen den physiologischen Wert von $0,01\text{ N/m}$ nicht überschreiten (Di Carlo et al. 2006), sonst führt das zu Reaktionen der Zellen in Bezug auf Differenzierung und Wachstum. Beeinflusst werden durch wirkende Strömungskräfte unter anderem die Viabilität, der Phänotyp, der Metabolismus und die Protein-Expression (Tourovskaja et al. 2005). Höhere Scherkräfte könnten auch zum Ablösen der Zellen vom Untergrund oder der ECM führen. Zu beachten ist dabei, dass Zellen je nach Entwicklungsstadium auch unterschiedlich stark an Oberflächen haften. Von Ablösung bedroht sind sie besonders unmittelbar nach Teilungsprozessen. Grenzwerte dafür lassen sich nicht angeben, da die gemessenen Ablösekräfte unter anderem von der verwendeten Zellart, dem Material auf dem sie adhären und auch der Messmethode abhängen (Yamamoto et al. 1998).

Andererseits kann der Umstand, dass mittels gezielt applizierter Strömungen Zellreaktionen provoziert werden können, gezielt für die Reiz-Reaktions-Forschung genutzt werden (siehe Abschnitt 5.1).

3.1.4 Zytotoxizität/Biokompatibilität

Zytotoxizität ist die Schädigung des Gewebes oder der Zellen durch chemische Substanzen. Anhand der in der DIN-EN 10993-5 definierten Zytotoxizitätsskala können Materialien beurteilt und verglichen werden. Zur Anwendung in den Zellkultivierungssystemen sollten nur jene Materialien

kommen, von denen bekannt ist, dass Zellen sie akzeptieren und somit keine zytotoxische Wirkung erfahren (Stufe 0). Das stellt sicher, dass keine Beeinflussung der Zellen durch das Material geschieht. Materialien der Stufe 1, welche einer leichten Hemmung entspricht, sind nur anzuwenden, wenn davon ausgegangen werden kann, dass das relevante Ergebnis der Zellkultur durch die toxische Wirkung nicht beeinflusst wird, es sei denn, es kommen Zytotoxine gewollt zur Beeinflussung der Zellkultur zum Einsatz. Die Unterteilung der Stufen der Zytotoxizität sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Eine weiter detaillierte Beschreibung ist im Anhang unter A2 zu finden (DIN_EN 10993-5 2009).

Tabelle 6: Zytotoxizitätsskala nach DIN-EN 10993-5 (2009)

Zytotoxizitätsklasse	Bezeichnung	Materialeigenschaft
0	Akzeptanz	Das Material ist nicht toxisch.
1	Leichte Hemmung	Das Material ist schwach toxisch.
2	Deutliche Hemmung	Das Material ist mäßig toxisch.
3	Toxizität	Das Material ist stark toxisch.
+0	Stimulation	Das Material wirkt kanzerogen.

3.1.5 Medien und Nährstoffe

Je nach Art der zu kultivierenden Zellen muss eine sorgfältige Auswahl des Mediums und geeigneter Zusatzstoffe erfolgen, da nur so optimales Wachstum gewährleistet werden kann. Um häufigen Medienwechsel im geschlossenen Systemkreislauf zu verhindern, sollten temperaturstabile Medien verwendet werden. Wenn dies nicht der Fall ist, zerfallen Vitamine und Mineralien, da diese nicht hitzestabil sind, auch bereits im physiologischen Temperaturbereich (Schmitz 2009). Thermostabile Medien können zudem bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.1.6 Medienwechsel

In statischen Kulturen befindet sich eine definierte Menge an Medium, welches die kultivierten Zellen umgibt. Durch den Metabolismus der Zellen werden bestimmte Inhaltstoffe der Medien verbraucht, bzw. für die Synthese von Stoffwechselprodukten umgesetzt. Auch Temperaturen von ca. 37 °C führen auf lange Sicht zu Änderungen der Eigenschaften des Mediums.

Abfallprodukte verschieben den pH-Wert des Mediums in den sauren Bereich. Daher muss es bei Langzeitkulturen regelmäßig ausgetauscht werden. Die Wechselzyklen sind abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, dem Metabolismus und der Vitalität der Zellen (Schmitz 2009). Das gilt auch für die Perfusionskultur, wenn in einem geschlossenen Kreislaufsystem gearbeitet wird. Die einzuhaltenden Wechselintervalle sind von Zellart zu Zellart unterschiedlich. Bei langsam wachsenden Zellen wird ein Wechsel immer nach der Faustregel „montags-donnerstags-montags“ empfohlen. Bei Zellen mit höherer Aktivität, die schnell wachsen sollen, soll eher „montags-mittwochs-freitags-montags“ ein Austausch stattfinden (Lindl & Gstraunthaler 2008). Diese Angaben entsprechen Werten für die statische Zellkultur. Versuche mit Perfusionskulturen bei Projektpartnern haben gezeigt, dass für einen geschlossenen Kreislauf ein Wechsel seltener erforderlich ist. Entzieht man dem Medium Nährstoffe und reduziert somit die Stoffwechselaktivität und damit die Entstehung von Abbauprodukten, ist eine weitere Verlängerung des Wechselzyklus möglich (mündliche Mitteilung; D.B. Jones, 2010). Es ist jedoch unklar, ob diese „Verarmung“ Einflüsse auf die Zellentwicklung hat.

Während der Kultivierung reichert sich das Medium mit Stoffwechselprodukten an und es sind zelllinienspezifische Wachstumsfaktoren, koloniestimulierende Faktoren, Interferon und Hormone im Medium vorzufinden, die das Wachstum der Zellen begünstigen. Zu beachten ist, dass aus diesem Grund viele Zellen einen kompletten Wechsel des Mediums nicht gut tolerieren (Schmitz 2009). Es gibt mehrere Möglichkeiten, diesem Problem zu begegnen. Zum einen kann eine geringfügige Restmenge an Medium im Kulturkreislauf verbleiben. Zum anderen kann das Medium konditioniert werden, in dem man aus dem alten Medium die für die Zellen relevanten Bestandteile zurückgewinnt und wieder rückführt (Schmitz 2009).

3.1.7 Kohlendioxidgehalt und pH-Wert

Der ideale pH-Wert für die Zellkultivierung liegt laut Lindl & Gstraunthaler (2008) zwischen 7,2 und 7,4. Das physiologische Optimum ist von Zellart zu Zellart unterschiedlich.

Setzt man dem Medium Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), als eine anorganische Puffersubstanz zu, dann ist der pH-Wert dieses Mediums vom CO_2 -Gehalt im Brutschrank abhängig (Lindl & Gstraunthaler 2008).

Abbildung 7 zeigt diesen Zusammenhang. Die erforderlichen Gaskonzentrationen für eine optimale Aufzucht von Zellen mit ungepufferten Medien werden meist durch die gezielte Begasung der mit Filterstrukturen versehenen, permeablen oder nicht komplett verschlossenen Kulturgefäße erreicht. Für Sauerstoff beträgt der Wert der Konzentration in der

Umgebungsluft von 21 %, für Kohlenstoffdioxid werden in der Regel 5 % angegeben, also um Zehnerpotenzen gegenüber der Konzentration in der Umgebungsluft angereichert.

Der CO_2 -Gehalt gepufferter Medien steht mit der Bikarbonatkonzentration des Mediums im Gleichgewicht und bedingt den pH-Wert der Kultur. Durch den Metabolismus der Kultur werden in Abhängigkeit von der Syntheseaktivität der Zellen saure Produkte und CO_2 gebildet (Schmitz 2009). Daher wird dem Medium NaHCO_3 als Puffersubstanz zugegeben. Sinkt der pH-Wert unter das Optimum, wird ein Medienwechsel erforderlich (Kochel 2004).

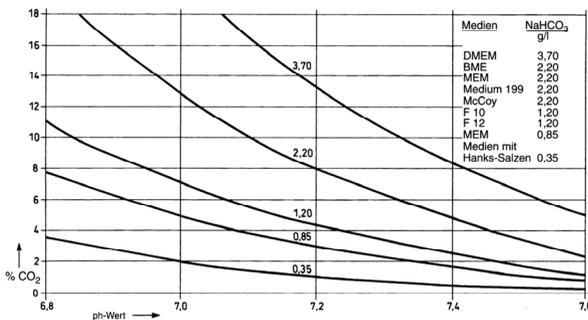


Abbildung 7: Abhängigkeit der pH-Werte in Medien von der CO_2 -Konzentration im Brutschrank (Lindl & Gstraunthaler 2008, S. 73)

Der Einsatz gepufferter Medien soll zudem absichern, dass keinerlei zusätzlicher gerätetechnischer Aufwand erforderlich ist, um das Mikrosystem außerhalb eines Inkubators zu betreiben.

Neben den speziellen Medien ist es mit dem entsprechenden gerätetechnischen Aufwand auch möglich, das Medium vor dem Einbringen in das Mikrosystem mit den erforderlichen Gaskonzentrationen anzureichern (zu „konditionieren“). Ein Gasaustausch ist durch die Verwendung ausreichend langer Polymerschläuche und deren Permeabilität erreichbar (siehe 2.1.2 und 2.1.3.). Ebenfalls kann man einen Oxygenator verwenden, um das Medium vor Eintritt in das Mikrosystem zu präparieren.

Bezüglich der hier angesprochenen Themen existieren Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend diskutiert werden. Die Beantwortung folgender Aspekte ist Bestandteil der Zusammenarbeit in weiterführenden Verbundprojekten im Rahmen des Thüringer Forschungsschwerpunktes „Grenzflächenfunktionalisierung und Biointerfaces“:

- Was passiert in der 3D-Kultur mit den Zellen im Inneren?
- Wie ist die Sauerstoffversorgung der inneren Strukturen und Zellkonstrukte sichergestellt?
- Welche zusätzlichen Maßnahmen müssen ergriffen werden, um auf Inkubatoren komplett verzichten zu können?
- Gibt es bezüglich der Toleranz von Zellen gegenüber bestimmten Gaskonzentrationen (Sauerstoff, Kohlendioxid) Grenzwerte? Welche Schwankungen werden toleriert?

3.1.8 Adhäsionsoberflächen/Scaffolds/3D-Kultur

Die Frage ist, welche Oberflächenbeschaffenheit ein Kulturgefäß haben muss, damit Zellen optimal darauf anhaften. Um diese Fragestellung zu beantworten, muss betrachtet werden, wie die Anheftung der Zellen auf der Materialoberfläche abläuft. In Schmitz (2009) steht dazu folgendes:

„Die Zell-Substrat-Adhäsion ist ein natürlicher Verankerungsmechanismus, der als mehrstufiger Prozess abläuft. Im serumhaltigen Medium enthaltene Signalstoffe und Proteine absorbieren unspezifisch an der Oberfläche des Zellkulturgefäßes, in diesem Fall des Mikrosystems beziehungsweise des Scaffolds. Die negativ geladenen Zellen absorbieren zweiwertige Kationen an diesen Oberflächen (Kalzium, Magnesium). Der eigentliche Kontakt wird durch Adhäsionsfaktoren der ECM erreicht. Das sind zum Beispiel Fibronectin bei Fibroblasten und Laminin bei Epithelzellen. Während der eigentlichen Anheftung binden eigene Proteoglykane aus der ECM an die Peptidsequenzen der Proteine aus dem Medium. Danach beginnt die Ausbreitung und Proliferation der Zellen.“

Der hier beschriebene Ablauf zeigt die Komplexität des Zusammenspiels der einzelnen Faktoren: Material, Medium und Zellen.

Zusätzliches Einbringen die Adhäsion begünstigender Faktoren oder eine veränderte Oberfläche können die Haftung der Zellen an künstlichen Oberflächen unterstützen. Dass definierte Oberflächenrauigkeit eine Rolle bei der Adhäsion spielt, steht außer Frage (Uhlemann et al. 1999). Zu klären ist, welcher Einfluss sich zeigt und wie stark dieser ausgeprägt ist. Eigene Untersuchungen an strukturiertem Glas und Silizium weisen zwar darauf hin, dass sehr feinkörnige Untergründe abgelehnt werden. Es lässt sich jedoch bisher keine statistisch abgesicherte verallgemeinerbare Aussage dazu treffen. Bei der Auswahl neuer Oberflächenstrukturen zur Unterstützung der Kultivierung bestimmter Zellarten sind immer Versuche durchzuführen, die eine Eignung einer Oberfläche zellartspezifisch sicherstellen.



3D-Zellkultur/Scaffolds

Die Kultur von Zellen erfolgt heute in der Regel in Form von Monolayern in Petri-Schalen. Diese „zweidimensionale“ Kultur repräsentiert die realen Zustände in Geweben jedoch nicht adäquat. Diese Erfahrung motiviert Ansätze, mehrschichtige Zellstrukturen zu schaffen.

Mit Hilfe definierter Bewegungen der Zellen während der Kultivierung ist es möglich „Multizellsphäroide“ zu erzeugen. Diese kugeligen Gebilde haben jedoch den Nachteil, dass Zellen in der Mitte des Konstruktes schlechter und eventuell sogar nicht ausreichend versorgt werden und dass es somit langfristig zum Absterben des Sphäroids kommen kann. Solche Systeme weisen zumindest andere mechanische Parameter auf als Vergleichsgewebe aus dem Organismus, was erweiterte Definitionen des „Physiologischen“ notwendig macht.

Durch die Besiedelung von Filtereinsätzen aus Polycarbonat, Nitrocellulose oder Keramik mit Porengrößen von 0,45 µm bis 8 µm (Schmitz 2009) und deren Schichtung („Sandwich-Technik“) ist es ebenfalls möglich dreidimensionale Konstrukte zu erzeugen.

Matrices/Scaffold/Support

In Minuth et al. (2002, S. 318) werden Scaffolds definiert als „...Trägerstrukturen, die den Zellen als Wachstumsunterlage oder dreidimensionales Gerüst dienen und die räumliche Organisation des Gewebes unterstützen.“. Diese Strukturen bestehen aus Materialien, an denen Zellen haften. Dabei interagieren die Zellen mit den Materialien.

Die Eigenschaften der Zellen werden folgendermaßen beschrieben. Die Oberflächen sind hydrophil (benetzbar). Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der Wirkstoffoberfläche. Durch eine chemische Modifikation ist es möglich, Proteine anzubringen, die eine Anheftung beeinflussen. Wichtige Eigenschaften sind die Porengrößen und auch die Gestalt der Poren, die durch die Verbindung zwischen den Poren definiert wird. Abbildung 8 zeigt verschiedene Ausgestaltungen von Scaffolds, von denen die Varianten a) und b) unregelmäßig und c) regelmäßig strukturiert sind.



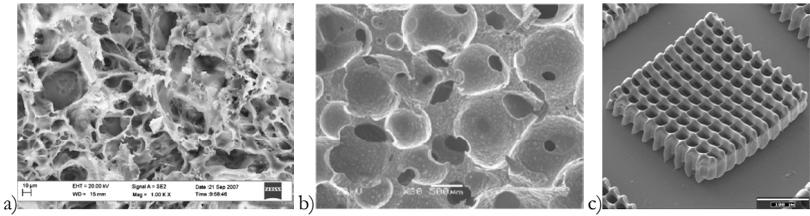


Abbildung 8: Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien und Formen
 a) SEM Aufnahme eines Polyurethan Schaumes (Zawadzak et al. 2009)
 b) Hydroxylapatit/Polyurethan-Komposit Scaffold (Wang et al. 2009)
 c) mit 2PP am iba e. V. Heiligenstadt hergestellter Ormocere®-Scaffold

Materialien, welche zur Anwendung kommen, sind entweder technisch hergestellt (Polymermaterialien, Polysaccharide: Dextran, Chitosan, Hyaluronsäure und Kompositmaterialien) oder aus biologischen Geweben gewonnen (Kollagene aus z.B. Schlachtabfällen). Sie können zweidimensional oder dreidimensional ausgelegt werden.

Allen Materialien ist gemeinsam, dass sie nicht optimal für die Differenzierung der Zellen sind. Dabei spielt es keine Rolle, welche Zellart zum Einsatz kommt. Die Interaktion zwischen Zelle und Biomaterial ist laut Minuth et al. (2002) nicht ausreichend untersucht. Die Eignung der Scaffoldmaterialien ist bisher nicht vorhersagbar. Das bedeutet, dass heute nur das Experiment Erkenntnisse über die Zell-Scaffold-Interaktion bringen kann. Ebenfalls anzumerken ist, dass unter diesen unbefriedigenden Bedingungen Experimente wiederholt werden müssen, sobald sich auch nur ein Parameter ändert, der sowohl die Zellen als auch das Material betrifft.

Einige Fakten sind jedoch bekannt. Die Materialgestaltung hängt vom zu züchtenden Gewebe ab. Die Form richtet sich nach der natürlichen räumlichen Organisation der Zellen *in vivo* (Minuth et al. 2002) (das entspricht in den Lebenswissenschaften begrifflich dem Gewebe aus Zellen und ECM). Tabelle 7 zeigt die Eigenschaften, die seitens der Scaffold-materialien für die Kultur spezieller Gewebe explizit geboten werden sollten.

Tabelle 7: Gewebearten und Scaffoldfunktionen nach (Minuth et al. 2002)

Gewebeart	Scaffoldeigenschaften/-funktionen
Epithelgewebe	Oberflächen besiedeln Rheologischem Stress standhalten
Bindegewebe	Binnenräume des Scaffolds besiedeln ECM-Bildung durch künstliche ECM (Scaffoldmaterial) unterstützen
Neurales Gewebe	3D besiedeln Zielgerichtetes Wachstum der Dendriten und Axone für synaptische Kontakte untereinander bahnen
Muskelgewebe	Flexibles Material um Kontraktion zu ermöglichen

Bekannt ist, dass die definierte Strukturierung von Scaffoldmaterialien das Einwachsenverhalten der Zellen positiv beeinflusst. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die zu kleine Rasterung einer „Woodpile“-Struktur ($< 30 \mu\text{m}$) das Einwachsen hemmt (Weiß et al. 2008), da Zellen „ungern“ allein in Öffnungen einwachsen, sondern den Zellverbund bevorzugen, was größere Strukturierungen erfordert. Jedoch existiert auch hier wieder eine Obergrenze (ca. $120 \mu\text{m}$), an der die Zellen eher an den die Löcher verbindenden Stützstrukturen anhaften und nicht einwachsen (Weiß et al. 2008).

Bioabbaubare Scaffolds

Nach Erfüllung der Stütz- und Wachstumsfunktion und Aufbau der gewünschten Zellkonstrukte sollen die Scaffoldmaterialien abgebaut werden. Bei diesen Abbauprozessen, die lokal fokussiert beginnen, kommt es häufig zur Abgabe zellschädigender Abbauprodukte. Findet keine Durchspülung oder kein Medienwechsel statt, führt insbesondere die kumulierende Übersäuerung zur Schädigung des gesamten Gewebes. Daher ist es ratsam, eine Perfusionskultur zu ermöglichen, welche die Kultur mit frischem Medium versorgt und Abfallstoffe abtransportiert (Minuth et al. 2002).

3.1.9 Zelldichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition)

Wachsen Zellen auf dem Boden eines Kulturgefäßes, erreichen sie während der Proliferation ein Entwicklungsstadium, in dem der gesamte besiedelbare Bereich bedeckt ist und zwischen den Zellen ein enger Kontakt besteht. Dieser Zustand wird „Konfluenz“ genannt. Werden die Zellen in diesem Stadium nicht weiter subkultiviert (passagiert), kommt es zur so genannten „Kontaktinhibition“, und die Zellen wachsen nicht weiter. Der Begriff der Kontaktinhibition verweist implizit auch auf den entgegengesetzten Zustand.

Sind Zellen zu dünn ausgebracht, wachsen sie ebenfalls nicht optimal. Es muss daher bereits bei der Aussaat der Zellen darauf geachtet werden, dass die Zellen in einer geeigneten Dichte ausgesät werden.



3.2 Anforderungen seitens der Nutzer/Bediener

3.2.1 Versorgung mit frischem Medium

Die Anforderungen der Zellen bezüglich Inhalten und Qualitäten der Medien bedingen die zuvor beschriebenen regelmäßigen Wechsel des Versorgungsmediums. Um sich von der herkömmlichen Variante, dem Abpipettieren der statischen Kultur und dem erneuten Auffüllen, lösen zu können, ist eine automatisierbare Versorgungsvariante in Form einer Fließkammer zu fordern.

Die Fließkammer kommt den realen Bedingungen *in vivo* näher als die statische Zellkultur, und neben den positiven Effekten, die allein durch die stetige Versorgung mit frischem Medium erreicht werden, können auch die Strömungszustände im Mikrosystem gezielt dazu genutzt werden, die Kultur zu beeinflussen (siehe 3.1.3. und 3.1.8.)

3.2.2 Optische Beobachtung der Zustände im System

Die Kulturgefäße, welche bisher standardmäßig genutzt werden, ermöglichen eine einfache lichtmikroskopische Beobachtung im Durchlichtverfahren. So können mittels einfacher digitaler Bilderfassung die Zustände der Zellen dokumentiert werden. Unterstützend kommen verschiedene Färbemethoden zum Einsatz, die bestimmte Zustände und Komponenten der Zellen hervortreten lassen und deren Beurteilung zulassen. Diese Bedingungen müssen für das neu entwickelte System ebenfalls gelten.

Es wird seitens der Nutzer eine optische Beobachtungseinheit gefordert, die folgende Hauptfunktionen besitzen muss:

- Beobachtung und Überwachung des Gesamtsystems (Funktionstüchtigkeit des Mikrofluidsystems und Aufrechterhaltung der erforderlichen Bedingungen),
- Detektion, Beobachtung und Beurteilung der Zellen anhand morphologischer Merkmale (Farben im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie, Größe der Zellen, Form, Anzahl, Verteilung, Position) und
- Ermittlung der Steuerungs- und Regelungsparametern für den Einsatz von Manipulationswerkzeugen.

3.2.3 Eingriff in das System

Mechanische Manipulation

Je nach zu erfüllender Aufgabe benötigt man diverse Eingriffsmöglichkeiten in ein MZKS, welche an die Manipulationswerkzeuge sehr unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich des Grades an Komplexität stellen.

Gefordert wird zum einen die zerstörungsfreie und nahezu einflussfreie Manipulation von Zellen und Komponenten der Kultivierungsplattform (Mikrosystem und Scaffold) in Form von Transport- und Auswahlprozessen und Positionierungen.

Eine mechanische Manipulationseinheit muss auch für Zusammenbau (z. B. Deckelung) und Instandhaltung des Mikrosystems einsetzbar sein.

Desweiteren werden durch den Nutzer Möglichkeiten der chemischen Manipulation gefordert, bei der mit Hilfe des Manipulators und eines geeigneten Werkzeuges Analysesubstanzen direkt an die geforderte Stelle gebracht werden. Das beinhaltet sowohl zellexterne (kontaktfreie) als auch injizierende Methoden.

Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen zur Differenzierungsbeeinflussung

Die Beeinflussung von Zellen in ihrer genetischen und morphologischen Entwicklung durch Applikation mechanischer Reize ist wissenschaftlich belegt (Brown 2000) und (Cao et al. 1997). Dies ist ebenfalls eine seitens des Nutzers geforderte Eingriffsmöglichkeit in das System. Weitere Erläuterungen folgen in Kapitel 5.

3.2.4 Integration des Scaffolds

Soll das Mikrosystem zur Kultivierung von Gewebekonstrukten genutzt werden, müssen Gerüststrukturen in den Systemen zum Einsatz kommen, die der jeweiligen Gewebart eine Ansiedlungsmöglichkeit liefern (siehe 3.1.8). So entstehen nicht nur mehrlagige Zellschichten, sondern dreidimensionale Strukturen. Dafür kommen die bereits zuvor beschriebenen porösen Hilfsmaterialien zum Einsatz. Neben der Schwierigkeit, das geeignete Material für eine bestimmte Zellart zu finden, muss vor allem bedacht werden, dass die geringen Dimensionen im Mikrosystem einfache Handhabung und Integration deutlich erschweren.

Die Anforderungen, die seitens der Anwender an die Scaffold-Integration gestellt werden, sind demnach:

- die Eignung für das gewünschte Gewebe,
- die Herstellbarkeit innerhalb des beschränkten Raumangebotes im Inneren des Mikrosystems und
- die Herstellung direkt im Mikrosystem oder die spätere Integrierbarkeit.

Neben den in Abschnitt 3.1.8 genannten existierenden Materialien für Scaffolds als künstliche ECM soll hier insbesondere auf die Methode der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Scaffoldherzeugung verwiesen

werden. In Weiß et al. (2008) und Fröber et al. (2009c) wird das Verfahren näher beschrieben. Abbildung 9 zeigt Scaffolds, die mittels der 2PP hergestellt wurden. Zu erkennen ist, dass diese Strukturen extrem klein sind.

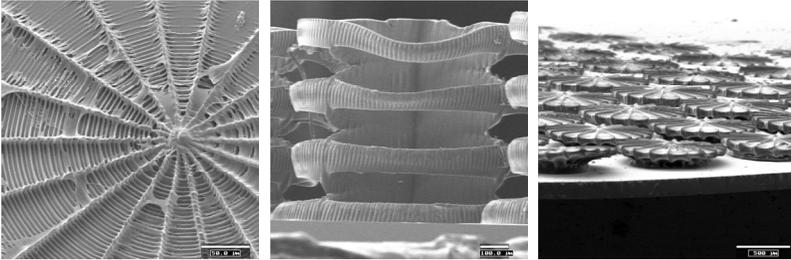


Abbildung 9: Mittels 2PP erzeugte Scaffoldstrukturen (hergestellt am iba e.V. Heiligenstadt, Bilder TU Ilmenau)

In herkömmlichen Kultivierungsgefäßen wäre es nicht möglich, derartige Scaffolds zu besiedeln und zu untersuchen. Ein neu zu entwickelndes Mikrosystem muss hier vor allem eine deutliche Unterstützung im Hinblick auf Handhabbarkeit liefern. Für mit der 2PP erzeugte Strukturen gibt es mehrere Integrationsmöglichkeiten. Einige davon sind:

- Erzeugung direkt im Mikrosystem durch Einbringen eines polymerisierbaren Materials.
- Loses Einbringen der Scaffolds durch eine Öffnung im Glasdeckel, ohne Fixierung. Anschließend erfolgt der Verschluss des Systems mit einem Deckel.
- Erzeugung des Scaffolds auf einer Trägerstruktur, die in das System eingebracht wird.

Die deutlichen technologischen Unterschiede der Integration weisen darauf hin, dass Entwicklungsbedarf besteht. Eine geeignete Variante muss der Aufgabe entsprechend ausgewählt werden.

3.2.5 Einfache quantifizierbare Besiedelung

Um ein Fortspülen zu verhindern, ist es bei Perfusionssystemen gängige Praxis, dass die Zellen nach dem Einbringen in das System keinerlei Scherstress ausgesetzt werden. Zellen werden in die Systeme eingebracht und über Zeitspannen zwischen 0,5 Stunden und 12 Stunden ohne Durchströmung kultiviert, um eine ausreichend hohe Anhaftung der Zellen an der Oberfläche sicher zu stellen.

Weitere Randbedingungen sind:

- Zellen müssen in genau bekannter Anzahl in eine Kultivierungskammer eingebracht werden, damit man für Auswertungen eine Referenzzahl hat.
- Zellen sollen sich nur in der Kammer und nicht in den Zuführungskanälen befinden, da dies die Strömungsverhältnisse und somit indirekt die Zellen in der Kulturkammer in ihrer Entwicklung beeinflussen könnte.
- Zellen müssen ohne mechanische Beeinflussung an den Ort der Kultivierung gelangen, um sicherzustellen, dass sie sich nicht reaktiv verändern.



3.3 Zusammenfassung der wesentlichen Anforderungen

Zusammenfassend lassen sich die in Tabelle 8 enthaltenen Anforderungen feststellen. Sich bedingende Anforderungen wurden gegenübergestellt. Offene Felder in der Darstellung verdeutlichen, dass es Bedingungen gibt, die einseitig (entweder seitens der Zellen oder seitens der Nutzer) gestellt werden.

Tabelle 8: Systemanforderungen

Zellen	Nutzer
Sterilität	Sterilisierbarkeit
Definiert 37 °C in der Kulturkammer	Regelbarkeit der Temperatur
Kontrollierbarkeit der Strömungsbedingungen (ohne Einfluss auf Zellentwicklung < 0,1 mN/cm ²)	Allzeit kontrollierbare Medienversorgung
Einsatz von Materialien der Zytotoxizitätsstufe 0- „Akzeptanz“	
Verwendung der Zellart entsprechender thermostabiler Medien	
Sauerstoffgehalt = 21 %, Kohlendioxidgehalt = 5 % im Inkubator, ohne Inkubator pH-Wert über Medienpufferung oder Zusatzkomponenten sicherstellen	Parameterbeobachtung
Geeignete Adhäsionsoberflächen, eventuell Beschichtung	
3D-Kultur wünschenswert	
Unterstützende Scaffoldstrukturen	Handhabbare Komponentenintegration
Auswahl geeigneter Zelldichten zur Vermeidung der Kontaktinhibition	Quantifizierbarkeit der Besiedelung
	Zustandsbeobachtung und –beurteilung des Systems und der Zellen
	Eingriffsmöglichkeit in das System jederzeit, für Manipulation an Zellen, Scaffolds und Systemkomponenten
	Definierte Applikation mechanischer Reize
→Technische Komponenten und Prozesse dürfen die Zelle nicht ungewollt beeinflussen.	→Systemkomponenten dürfen nicht konkurrieren.

Eine wesentliche Aufgabe in den der Dissertationsschrift zugrundeliegenden Arbeiten bestand darin, bei der Systementwicklung mit jeder realisierten Funktion diese Bedingungen einzuhalten. Die Realisierung einer Forderung darf nie eine andere Forderung ausschließen, denn das könnte dazu führen, dass das Gesamtexperiment scheitert oder die Ergebnisse unbrauchbar werden, weil nicht in allen Fällen abzuschätzen ist, welche Konsequenzen eine Nichteinhaltung einer Forderung für die Zellkultur mit sich bringt.

Das auf Grundlage dieser Forderungen konzipierte Gesamtsystem wird im folgenden Kapitel vorgestellt.





4 Komponenten des Zellkultivierungs- und Handhabungssystems

4.1 Beschreibung des Gesamtaufbaus

Die Entwicklung eines Systems zur Kultivierung von Zellen und deren Beeinflussung mit anschließender Analyse steht als Fernziel für diese Arbeit. An erster Stelle vor der Einflussnahme steht jedoch die stabile perfundierte Kultur mit der Möglichkeit der Echtzeitbeobachtung und gegebenenfalls des Eingriffs. Aus den zuvor hergeleiteten Anforderungen lässt sich folgendes Gesamtkonzept festlegen:

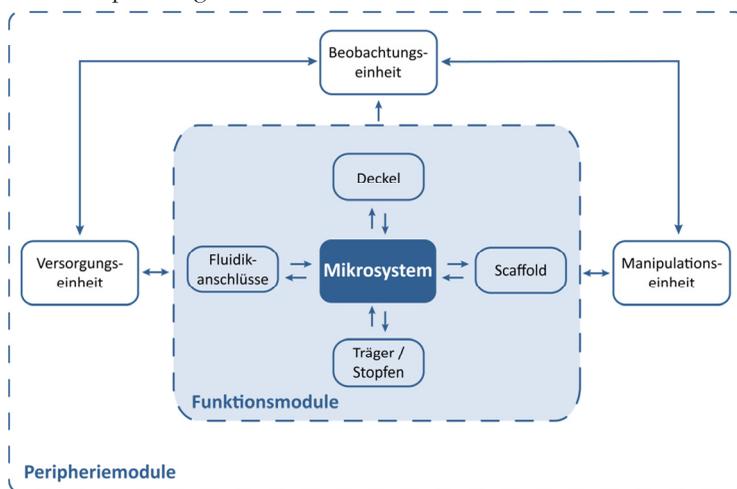


Abbildung 10: Komponenten des Mikrozellkultivierungssystems

Ein MZKS für die Anwendung in der Applikation mechanischer Kräfte auf kultivierte Zellen ist ein komplexes System, das neben der Hauptkomponente, dem Mikrosystem, viele periphere Komponenten wie Einheiten zur Beobachtung, Versorgung und Manipulation benötigt. Abbildung 10 zeigt die Grundstruktur dieses Systems, welches in (Fröber et al. 2009) bereits teilweise vorgestellt wurde. Ergänzt wird diese Struktur um eine Beanspruchungseinheit. In den folgenden Abschnitten werden der Realisierungsgrad der vier Komponenten (Mikrosystem, Versorgung-, Beobachtungs- und Manipulationseinheit) sowie Aspekte der Biokompatibilität, Reinigung und Sterilisierbarkeit des mikrosystembasierten Zellkultivierungs- und Handhabungssystems erläutert. Für die fünfte noch nicht umgesetzte Komponente „Beanspruchungseinheit“ werden im Anschluss in einem separaten Kapitel integrierbare Realisierungsvarianten vorgestellt.

4.2 Mikrosystemplattform

Das Herzstück des Gesamtsystems bildet ein fluidisches Mikrosystem, welches über eine spezielle auf nanostrukturierten Interfaceregionen basierende Anschluss- und Verbindungstechnik an die peripheren Systemkomponenten angeschlossen wird. Über die Integration strömungsbeeinflussender (Mikrosystem-)Bauteile ist es möglich, für die Zellkultur optimale Versorgungsbedingungen einzustellen.

Für die Besiedelung der im Zentrum des Mikrosystems befindlichen Kultivierungskammer mit Zellen und für das Einbringen von Scaffolds werden verschiedene Lösungsvarianten erläutert und diskutiert. Variationen des Mikrosystems für den Einsatz der Mikromanipulation über eine Öffnung im Glasdeckel verlangen zur Sicherstellung der optimalen Kulturbedingungen die Auseinandersetzung mit mehreren Strategien für Verschluss- und Deckelung. Für das Mikrosystem als kleinste Einheit des Gesamtsystems mit zentraler Bedeutung ist eine sichere Fixierung und Positionierung obligat.

Die folgenden Abschnitte stellen die Mikrosystemplattform im Detail vor.

4.2.1 Design und Fertigung

Die Basisstruktur besteht aus Silizium. Auf einem 100 mm-Wafer (Dicke 500 μm) ist eine Vielzahl verschiedener Systemwürfe möglich, die dann mittels Fotolithografie und Trockenätzprozessen hergestellt werden. Sandstrahlen und nasschemische Ätzprozesse werden genutzt, um ein Glas-Substrat (Borofloat®, Dicke 200 μm) zu strukturieren, welches als Deckel anodisch auf den prozessierten Siliziumwafer gebondet wird. Im Anschluss werden die Systeme durch Sägen voneinander getrennt.

Die in der Literatur beschriebenen bevorzugten Materialien zur Herstellung von Biomikrosystemen sind durchsichtige Polymere. Allerdings gelten viele der postulierten Vorteile wie niedrige Kosten nur für den Anwendungsfall als häufig genutztes Wegwerfprodukt. Für die Forschung und Spezialanwendungen sind Systeme aus Silizium durchaus geeignet, da das Design und die Herstellung aufgrund der gut etablierten Mikro-bearbeitungs- und Herstellungsmethoden als unkompliziert gelten. Die nahezu unbegrenzten Strukturierungs- und Beschichtungsmöglichkeiten der Oberfläche und die wegen der Leitfähigkeit des Siliziums einfache Realisierbarkeit elektrischer Kontakte sind weitere positive Eigenschaften, die ausgenutzt werden können.

Verwendet man Silizium, muss eine transparente Deckelung hinzukommen, um die Beobachtbarkeit der kultivierten Zellen zu erhalten.



Mit Hilfe der Methoden der Mikrosystemtechnik können Strukturen und Funktionen an die speziellen Bedürfnisse des jeweiligen Experimentes angepasst werden.

Das hier vorgestellte Mikrosystem stellt eine Flusskammer dar. Es ist auf die speziellen Anforderungen einer dreidimensionalen Perfusionskultur für ECM-bildende Zellen (z.B. Chondrozyten, Fibroblasten) angepasst, aber problemlos auch für Monolayerkulturen ohne Scaffold (z. B. Osteoblasten) geeignet sowie für die Kultivierung ein- oder wenigzelliger größerer Lebewesen wie Pantoffeltierchen, kleinen Krebsen oder Algen einsetzbar. Es besteht aus mindestens einer runden Hauptkammer (derzeit realisierter Durchmesser 3 mm, Tiefe 0,25 mm, Volumen 1,77 μl) in welcher das Zellmaterial kultiviert und Scaffolds integriert werden. Diese Kammer ist von Siebstrukturen variabler Breite umgeben, die zur Konditionierung des Medienflusses dienen und die Zellen und Organismen im Inneren der Kammer halten. Verschiedene Kanalstrukturen für die Zuführung und den Abtransport des Mediums mit einer Breite 1 mm und einer Tiefe von 250 μm befinden sich auf dem System. Die Temperaturregelung erfolgt über Wärmetauscher, die in Form von mäanderartigen Kanalstrukturen in das Mikrosystem integriert sind. Für den Anschluss der Schlauchadapter zur Medienversorgung und für elektrische Kontakte sind ebenfalls Verbindungs-“ports“ mit nanostrukturiertem Silizium auf der Rückseite des Systems vorhanden.

Der Zugang zum System ist sowohl von oben als auch unten möglich. Optional sind: Experimentierkanäle, getrennte Kultivierungskammern, Kammern und Kanäle zur Probennahme für analytische Prozesse. Die Gesamtgröße eines Systems ist vom jeweiligen Scaffold und den Abmessungen der Subsysteme abhängig und liegt mit gefügten Polymerverbindern im Bereich einiger Zentimeter für Breite, Länge und Höhe (siehe Abbildung 11).

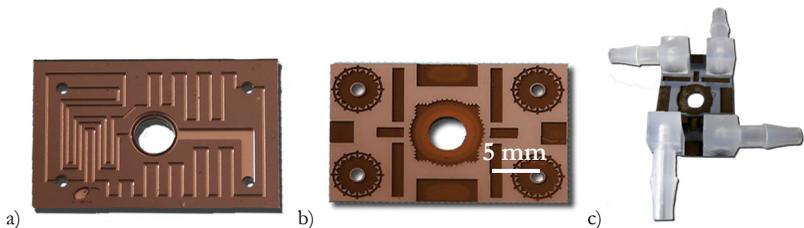


Abbildung 11: Mikrosystemplattform
a) Vorderseite, b) Rückseite, c) mit Luer-Verbindern

4.2.2 Anschluss- und Verbindungstechnik

Die zuvor beschriebenen Flächen aus nanostrukturiertem Silizium auf der Siliziumseite des Mikrosystems bilden eine Interface-Region für Adapter aus Polymeren. Diese ermöglicht das klebe- und klemmfreie Anschließen fluidischer Versorgungsstrukturen (Stubenrauch et al. 2009a). Dieser Aspekt ist insbesondere für die Erfüllung der Forderung nach Biokompatibilität wichtig, da die meisten Klebstoffe auf Zellen oder Zellkulturen schädlich wirken.

Das nanostrukturierte Silizium besteht aus kleinen Nadeln (10 μm bis 25 μm Länge, 0,5 μm bis 1 μm Durchmesser, durchschnittliche laterale Dichte: 2 Millionen Nadeln pro mm^2) (Stubenrauch et al. 2007). Sie entstehen in einem speziellen Trockenätzprozess, der im Vergleich zum „Normalen“ eine Betonung der Passivierung aufweist. Diese führt zu einer Selbstmaskierung während der Ätzeit und konsekutiv zur Entstehung der Nadelstrukturen.

Zum Anschluss der Verbinder wird der Siliziumchip bis zur Temperatur der thermo-plastischen Verformung der Polymerkomponenten erhitzt ($> 160\text{ }^\circ\text{C}$ für Polypropylen PP). Wie in Abbildung 12 dargestellt, dringen die Schlauchadapter nach dem Schmelzen des PP in die nanostrukturierte Oberfläche ein und bilden so eine fluidisch dichte und mechanisch stabile Koppelstelle (Fröber et al. 2009c).

Die Systeme wurden bis 20 MPa auf Zugfestigkeit geprüft und sind bis 0,7 MPa Überdruck wasserdicht. Für die Dichtigkeit gegenüber Gasen kann bisher keine Aussage getroffen werden.

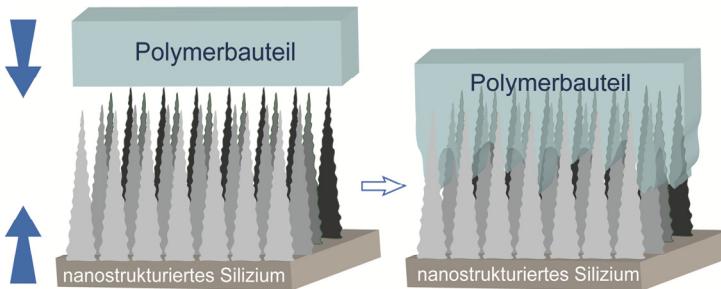


Abbildung 12: Verbindungsvorgang, schematische Darstellung

Mit Hilfe dieser Verbindungstechnologie können für die Versorgung mit Medien und die Erfassung von Parametern Anschlüsse geschaffen werden, die einen geringen Platzbedarf und kleine Totvolumina haben. Die direkte Anbindung von Schläuchen mit einem oder mehreren Lumina oder männlichen und weiblichen Luer-Adaptoren wird ermöglicht (Abbildung 13).

Elektronische Kontakte, die ein Polymergehäuse besitzen, können mit der gleichen Methode an die Mikrosysteme angeschlossen werden.

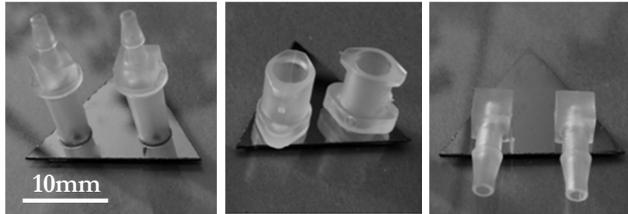


Abbildung 13: Verschiedene Polymeradapter auf Silizium-Chips

4.2.3 Strömungsverhältnisse

Die dem Konzept eines durchströmten Zellkultivierungssystems zugrunde liegende Idee besteht in der kontinuierlichen Versorgung der gesamten Zellkultur mit Nährstoffen und dem stetigen Abtransport von Stoffwechselprodukten. Ziel ist es jedoch auch, die Zellen nicht negativ durch Strömungen zu beeinflussen und die zur Entwicklung und Interaktion der Zelle benötigten Stoffwechselprodukte nicht auszuwaschen. Ein Perfusionsmikrosystem muss derart gestaltet sein, dass im Bereich der Zellkultur eine definierte Strömung vorhanden ist.

Als Realisierungsvariante ausgewählt werden die bereits erwähnten kreisförmigen Kammern, die von einer Siebstruktur umgeben sind. Die Variation der Dimensionen (Rand zwischen Kammerwand und Siebstruktur, Weite des Siebes, Breite des Zulaufkanals) führt zur Beeinflussung der Strömung. Vergleicht man die Ergebnisse eines Versuches zur Bestimmung der Strömungsbedingungen mit denen theoretischer Berechnungen mit einem Simulationsprogramm, kann man erkennen, dass die vorgesehenen Strukturen ihren Zweck erfüllen. Auf Basis der CAD-Zeichnungen des jeweiligen Mikrosystems wurden am Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik e. V. Heilbad Heiligenstadt durch Herrn Jürgen Rost Modelle mittels ANSYS® CFX (ANSYS® Inc.) berechnet.



Tabelle 9: Simulation des Strömungsverhaltens im Mikrosystem
 Skala: 0 m/s = blau bis 1,1 m/s = rot

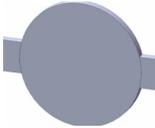
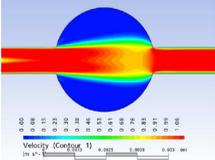
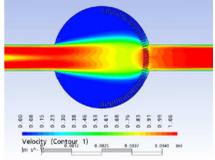
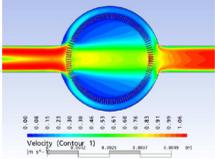
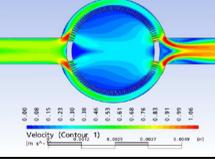
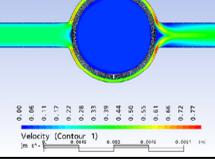
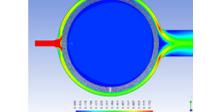
Daten	Kammerdesign	Simulation der Strömungsverhältnisse
<p>1) Kultivierungskammer ohne Einbauten, errechnete Geschwindigkeit: 12,8 ml/min, gemessene Geschwindigkeit: 12,5 ml/min</p>		
<p>2) Kultivierungskammer mit Halbsieb, errechnete Geschwindigkeit: 11,2 ml/min, gemessene Geschwindigkeit: 7 ml/min</p>		
<p>3) Kultivierungskammer mit Vollsieb, errechnete Geschwindigkeit: 10,4 ml/min, gemessene Geschwindigkeit: 10 ml/min</p>		
<p>4) Kultivierungskammer mit Barriere, errechnete Geschwindigkeit: 7 ml/min</p>		
<p>5) Kultivierungskammer mit „dynamisch“ verringertem Sieb, errechnete Geschwindigkeit: 2,9 ml/min</p>		
<p>6) Kultivierungskammer mit Vollsieb, enger Einlass, breiter Auslass, errechnete Geschwindigkeit: 2,8 ml/min</p>		

Tabelle 9 zeigt einige Realisierungsvarianten. Wobei die einfachste Variante (Variante 1), ohne Strömungsbeeinflussung durch ein Sieb in der Kammer ist, die mit zunehmender Komplexität schrittweise in die Kombinationslösung aus verringerter Zulaufkanalbreite und dynamisch veränderter Siebweite überführt wird (Variante 6). Letztere Lösung führt dazu, dass in der Kammer lediglich eine geringe Strömung vorhanden ist, welche die Zellen nicht mit Scherkräften belastet, aber die nötige Versorgung ermöglicht.

Für die Versuchsreihe wurde ein Systemaufbau gewählt, bei dem ein Mikrosystem vertikal durchströmt wird. Aus einem Wasser-Reservoir, welches sich 220 mm über dem Einlass in die Kultivierungskammer befindet, fließt aufgrund der Gravitation kontinuierlich Flüssigkeit durch das System. Geht man an der Ausströmungsöffnung von einem Ausgangsdruck von 0 Pa aus, ergibt sich aus der Formel für den hydrostatischen Schweredruck (Böswirth 2005)

$$\begin{aligned} p_h &= \rho \cdot g \cdot h \\ p_h &= 10^3 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \cdot 0,22\text{m} \\ p_h &= 2,2 \text{ kPa} \end{aligned} \quad (2)$$

ein Druck von 2,2 kPa. Die Durchflussraten reichen von 125 ml/min ohne Mikrosystem bis zu 2,8 ml/min für das komplexe Mikrosystem mit kombinierter Kanalverengung und dynamischer Siebweitenreduktion. Man kann für Mikrosysteme mit den vorliegenden Dimensionen aufgrund der niedrigen Reynoldszahlen (< 2000) von laminarer Strömung ausgehen. Literaturangaben nennen für die kritische Reynoldszahl einen Wert von 2320 (Siekman & Thamsen 2007).

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\eta} \quad (\text{Saliterman 2006}) \quad (3)$$

ρ	Dichte des Fluids/Wassers
v	mittlere Fließgeschwindigkeit, mit Simulation berechnet
η	dynamische Viskosität
d	Rohrdurchmesser

Mit den Tabellenwerten für das Medium Wasser und der mittels Simulation berechneten mittleren Fließgeschwindigkeit ergibt sich:

$$Re = \frac{10^3 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 1 \frac{\text{m}}{\text{s}} \cdot 1\text{mm}}{10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{m}\cdot\text{s}}} = 1000 \quad (4)$$

Der mit diesen für das Mikrosystem hoch angesetzten Kennzahlen errechnete Wert von 1000 liegt weit unter der zuvor genannten kritischen Reynoldszahl für den Umschlag laminarer in turbulente Strömungen. Es gelten somit für die vorliegenden Größen die Navier-Stokes Gleichungen in ihrer einfachen Form, und es ist vom stationären Fall auszugehen.

Für alle gemessenen Mikrosystemvarianten stimmen die Ergebnisse der Berechnungen mit den Messungen gut überein. Zum Beispiel ergaben sich für den Durchfluss durch ein Mikrosystem ohne Sieb rechnerisch 12,8 ml/min, während 12,5 ml/min gemessen wurden. Das entspricht einem Unterschied von weniger als 3 %.

Es ist daher davon auszugehen, dass auf Basis der Simulationen neue Designvorschläge auf Eignung überprüft werden können. Die Strömungsverhältnisse in einem Mikrosystem sind durch eine geeignete Komponentenauswahl beeinflussbar.

4.2.4 Scaffold-Integration und Besiedlungsstrategien

Wie bereits in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, werden Scaffoldmaterialien und -strukturen im Tissue Engineering genutzt, um die Entwicklung und das Verhalten von Zellen zu kontrollieren und zu beeinflussen. Sie haben eine definierte Geometrie und simulieren eine dreidimensionale ECM, in die Zellen analog zum Verhalten in ihrer natürlichen Umgebung immigrieren und adhären können. Die Herausforderungen bestehen dabei in der Integration dieser Scaffolds in das vorgestellte Silizium-Glas-Mikrosystem und in der quantifizierbaren Besiedelung dieser Strukturen mit Zellmaterial. Aufgrund des Variantenreichtums wurde eine Kombinationstabelle der Mikrosystemkomponenten und -funktionen erstellt, mit deren Hilfe es nach Festlegung der experimentellen Rahmenbedingungen möglich wird, eine geeignete Mikrosystemvariante für den speziellen Anwendungsfall auszuwählen (siehe Anhang unter A3). Die Tabelle erhebt aufgrund der fortwährenden Weiterentwicklung keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Einen konkreten Anwendungsfall für Mikrosystemvarianten stellt die Durchführung von Studien dar, bei denen die Einflüsse von Hydrogel-Scaffolds auf Säugerzellen untersucht werden. Es wird ein Biomikrosystem benötigt, in welches die (in Abschnitt 3.1.8. vorgestellten) mittels 2PP hergestellten Mikroträgerstrukturen integriert werden können. Damit erhält man ein Werkzeug zur Durchführung neuartiger Experimente mit im Vergleich zur Petri-Schale deutlich verringerter Zellzahl und kleinen Scaffolds. Der modulare Systemaufbau erlaubt neben der Kultivierung auch die Beobachtung und Handhabung der angesiedelten Zellen. Bei der Integration der Scaffolds müssen Methoden gefunden werden, bei denen sowohl Form

und Struktur als auch die chemischen Eigenschaften der Scaffoldmaterialien unversehrt bleiben. Im Vordergrund stehen dabei die durch die Zellen an das System gestellten Grundforderungen (siehe 3.1.).

Die zur Integration der dreidimensionalen Scaffoldstrukturen in die Mikroperfusionskammern des BioMEMS geeigneten Varianten (Abbildung 14) werden im folgenden Abschnitt näher erläutert und der Einsatz für spezielle Anwendungsfälle diskutiert.

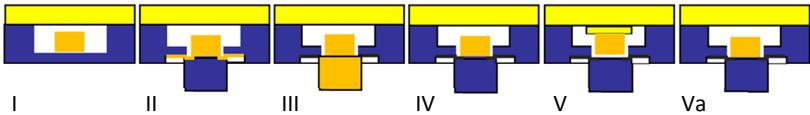


Abbildung 14: Varianten der Scaffold-Integration

Variante I:

Die Erzeugung der Hydrogelstrukturen mittels der 2PP erfolgt im Mikrosystem. Entweder wird durch die Öffnung im Mikrosystem polymerisiert und diese nachträglich verschlossen, oder der Laser arbeitet durch den verschlossenen Glasdeckel hindurch. Beide Methoden wurden bisher nicht getestet, da sich die Techniken der 2PP und die Auswahl geeigneter Materialien ebenfalls noch in der Entwicklungsphase befinden.

Variante II:

Werden Scaffoldstrukturen auf verschiedenen Basismaterialien erzeugt, können diese anschließend durch Einkleben in das System eingebracht werden. Diese Variante wurde im Rahmen von Tests als geeignet beurteilt. Die Auswahl der verwendeten Klebstoffe sowie der Klebprozess selbst müssen jedoch mit größter Sorgfalt erfolgen um eine Verunreinigung (Intoxikation) oder Beeinflussung der in der Kulturkammer befindlichen Zellen zu verhindern.

Variante III:

Erzeugt man die Scaffolds extern und befestigt Sie auf einem Polymerträger, können diese wie die Polymerverbinder mit Hilfe des thermischen Fügeprozesses in das Mikrosystem integriert werden (siehe Abbildung 15). Zu beachten ist hierbei, dass die Erhitzung der Materialien sowohl zu geometrischen Verformungen der Scaffolds, als auch zu chemischer Veränderung insbesondere der Oberflächen führen kann. Diese Einflüsse wurden jedoch nicht weiter untersucht.

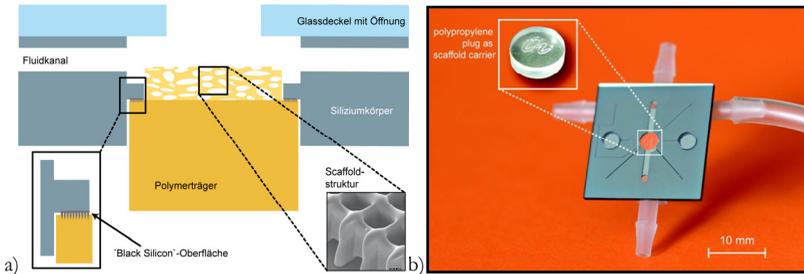


Abbildung 15: Scaffold-Integration

- a) Schema des Integrationsvorganges (Variante III)
 b) Realisierung (Fröber et al. 2009c)

Bei den Varianten I, II und III wird das Einbringen der Zellen nach dem Fügen über eine Öffnung im Deckel oder über die Versorgungskanäle durchgeführt. Eine Quantifizierung der eingebrachten Zellen sowie eine gezielte Ansiedelung der Zellen in bestimmten Regionen sind mit diesen Methoden nicht möglich.

Für das in dieser Arbeit beschriebene Mikrosystem wird eine Vorkultivierung extern auf den Scaffoldträgern in einer Petri-Schale/Titerplatte empfohlen. Anschließend werden diese besiedelten Strukturen in das System eingebracht und der Versorgungsströmung ausgesetzt. Die folgenden Varianten ermöglichen die Integration vorbesiedelter Strukturen.

Variante IV:

Für die Aquaristik existieren Klebstoffe, die für den Einsatz unter Wasser entwickelt wurden. Verwendet man einen solchen Kleber (eventuell geeignet: Gewebekleber oder bionische Klebstoffe nach dem Vorbild der *Byssus*-Fäden) der zusätzlich noch bioverträglich ist, wäre es möglich auch bereits besiedelte und vorkultivierte Polymerscaffolds in das Mikrosystem zu integrieren.

Variante V:

Erzeugt man den Scaffold auf einem Glassubstrat, kann dieses in das Mikrosystem eingelegt werden. Beide Glasflächen haften durch Adhäsion aufeinander, dadurch wird der Scaffold im System fixiert. Die Kulturkammer wird anschließend mit einem Siliziumdeckel verschlossen. Dafür wird die rasenartige Nanostruktur am Rand der Kulturkammer und am Rand des Siliziumdeckels genutzt. Es kommt die in Stubenrauch et al. (2009b) beschriebene Methode des Silizium-Klettverschlusses zum Einsatz, der auch in feuchter Umgebung und unter Wasser wirksam bleibt.

Eine Abwandlung dieser Methode ist durch die direkte Erzeugung des Scaffolds auf dem Siliziumbauteil (Variante Va) zu erreichen. Das verwendete Bauteil muss in der Mitte einen Bereich ohne Strukturierung aufweisen, da dort die Strukturierung mittels 2PP definiert stattfinden. Über einen „Klett-Rand“ erfolgt die Anklappung dieses Bauteils an das Mikrosystem.

In der Regel tritt bei den zur 2PP verwendeten Materialien eine Quellung auf. Das muss bei der Dimensionierung des Mikrosystems berücksichtigt werden („Quellmaß“ analog zu den „Schrumpfmaßen“ der Gießereitechnik).

Die in Abschnitt 4.2.2 beschriebene Anschluss- und Verbindungstechnik ermöglicht somit auch die „smarte“ Scaffold-Integration durch die totvolumen- und klebstofffreie Lebend-Zell-Integration ohne Einflüsse von Temperaturschwankungen.

4.2.5 Verschluss-/Deckelungsstrategien

Für die Verwendung der Systeme mit einer mechanischen Manipulation unter Nutzung von Werkzeugen ist eine Öffnung im Glasdeckel vorgesehen. Ist ein Einsatz der mechanischen Manipulation nicht geplant, empfiehlt es sich aus Sterilitätsgründen immer, auf eine mindestens einseitig geschlossene Variante (gebondeter Glasdeckel) zurückzugreifen. Für den Verschluss der Öffnungen im Glasdeckel wurden verschiedene Varianten entwickelt und getestet:

Variante – Glasdeckel:

Verschluss mit einem Deckgläschen, welches aufgeklebt wird.

Vorteil: Das Deckgläschen bietet eine ebene/plane Oberfläche, die gute optische Eigenschaften für eine mikroskopische Beobachtung mit sich bringt. Diese Variante ist bei sorgfältiger Ausführung schnell und mit geringem Materialaufwand applizierbar und dicht gegenüber Flüssigkeiten.

Nachteil: Der verwendete Klebstoff, ein Polymer, kann aufgrund der enthaltenen Lösungsmittel die Entwicklung der Zellkultur beeinflussen. Ebenfalls problematisch ist die Handhabung der extrem dünnen, transparenten Deckgläschen. Bei der Applikation kann das Deckgläschen verrutschen, was zum einen Undichtigkeiten zur Folge haben kann, zum anderen auch eine Verschmutzung der Deckelfläche mit sich bringt. Das wiederum beeinflusst die optische Beobachtbarkeit negativ und begünstigt das Verbleiben von Luftblasen in der Kultivierungskammer. Das Öffnen dieses Deckels kann nur unter Zerstörung des Deckgläschens erfolgen.

Variante – adhäsive Folie:

Verschluss mit einer Silikonfolie, selbsthaftend durch Adhäsionskräfte.



Vorteil: Die Applikation und das Entfernen dieses Deckels sind denkbar einfach und können händisch oder mit Werkzeugen durch Abziehen erfolgen. Das Material ist eben und transparent, was die optische Beobachtbarkeit aufrecht erhält.

Nachteil: Die Herstellung der Folien ist aufwändig, da es dafür momentan noch kein Werkzeug gibt. Es ist zudem davon auszugehen, dass diese Variante nur geringem Druck standhält und der Deckel nicht recyclebar ist.

Variante – flüssiges Polymer:

Verschluss durch Aufbringen eines flüssigen Polymers, welches bei Berührung der Flüssigkeitsoberfläche spreitet, aushärtet und eine Membran bildet.

Vorteil: Dieser Deckel ist dicht und hält den im System auftretenden Druck stand (getestet für einen Betriebsdruck von 0,1 MPa). Die Dosierung erfolgt mittels einer Pipette. Nach genauer Mengeneinstellung ist das Material (Fu33, modifiziertes Dextran, INNOVENT e.V, Jena, Germany) einfach durch Auftropfen applizierbar. Diese Methode hat hohes Automatisierungspotenzial.

Nachteil: Die in den Polymeren enthaltenen Lösungsmittel können für die Zellen in Kultur giftig wirken, wenn das Material nicht sofort abtransportiert wird. Die entstehende Oberfläche ist nicht plan, sondern eher halbkugelförmig, was die Beobachtung erschwert. Denkbar ist jedoch die Zuhilfenahme eines Urform-Modells, so dass der entstehende Deckel in eine optisch günstigere Form gebracht wird. Die Entfernung dieses Deckels ist nur möglich, wenn dieser dabei zerstört wird. Er ist nicht wiederverwendbar.

Variante – PDMS abgeformt:

Erstellung einer Gussform mit Hilfe einer hochpräzisen Fräsmaschine (Fachgebiet Technische Optik, TU Ilmenau), Abformung eines flexiblen PDMS-Deckels (Sylgard184) mit Randstruktur.

Vorteil: Dieser Deckel bietet optimale optische Kompatibilität. Innerhalb der Randstruktur kann ein Fluid aufgebracht werden, welches die Verwendung von Immersionsobjektiven ermöglicht. Der bereits erwähnte Rand erleichtert die Handhabung gegenüber der „Variante - adhäsive Folie“ erneut. Das Greifen wird unterstützt.

Nachteil: Diese Variante ist ebenfalls nicht druckstabil, so dass Wasser bei zu hohem Druck austreten kann.

Eine weitere Verschlussmethode ist angedacht, wurde jedoch noch nicht getestet. Es können wie auch für den „Siliziumklettverschluss“ nadelartig strukturierte Glasoberflächen genutzt werden, die eine Interfaceregion



darstellen und durch Fügen zweier Oberflächen eine dichte Verbindung herstellen.

Alle Varianten bergen Vor- und Nachteile. Die Auswahl einer Methode muss je nach Anwendungsfall erfolgen. Festzulegen ist nur, dass im Falle einer Manipulation auch eine Verschlussmöglichkeit existieren muss und dass man nur unbedingt erforderliche Zugänge integriert. Nur dann ist die kontrollierte Erhaltung der Sterilität möglich.

4.2.6 Befestigung auf dem Tisch des Mikroskops

Das Mikrosystem stellt mit seiner Peripherie einen komplexen Aufbau dar, der nicht ohne Aufwand transportabel ist. Idealerweise ist für den mobilen Einsatz in verschiedenen Laboren ein Kompaktsystem geplant. Jedoch ist der Aufbau durch die Versorgungsschläuche, die elektrischen Verdrahtungen und die Manipulatoren nur mit erheblichem konstruktivem Aufwand zu realisieren. Eine magnetische Basisplatte (Abbildung 16(1)) mit einem eingravierten Koordinatensystem und Markierungen für die Platzierung des Mikrosystems (2), der Versorgungsleitungen und der Mikromanipulatoren (3) wurde konstruiert und gefertigt. Es existieren Bohrungen zum Anbringen von Klemmen oder Bügeln zur Fixierung des Mikrosystems. Es dürfen keine Zugspannungen an den Schläuchen auftreten, da diese zur Zerstörung des Mikrosystems durch übertragene Kräfte führen könnten. Zug an den Polymerverbindern führt bei unachtsamer Handhabung zum Zerbrechen des Mikrosystems.

Da das Mikrosystem ein je nach geplanter Anwendung in Form und Größe variierendes Modul ist, kann keine in allen Details festgelegte Basis existieren. Die entwickelte Platte ermöglicht mit Hilfe der vorgesehenen Bohrungen vielfältige Befestigungsmöglichkeiten.



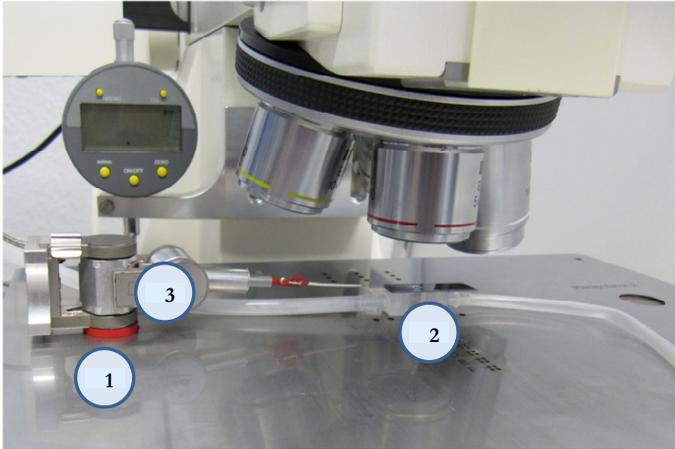


Abbildung 16: Teilkomponenten der Manipulationseinheit

- 1) magnetische Grundplatte zur Befestigung des
- 2) Mikrosystems und zur Positionierung der
- 3) Mikromanipulatoren auf dem Mikroskoptisch

4.3 Versorgungseinheit

Das beschriebene BioMEMS ist ein mikrofluidisches System, in dem die kultivierten Zellen perfundiert werden. Durch den Einsatz des Mikrosystems, welches eine miniaturisierte Flusskammer darstellt, ist es unter anderem möglich den Medienwechsel ohne Entnahme des Systems aus dem Brutschrank durchzuführen. Das reduziert zum einen das Risiko einer Kontamination und zum anderen werden die Bedingungen für die Kultivierung verbessert, da die Zellen nicht dem Stress eines Ortswechsels und damit der Umgebungsbedingungen ausgesetzt werden.

Der Aufbau und die Funktionen der Versorgungseinheit ergeben sich somit aus den erforderlichen Umgebungsbedingungen für eine Zellkultur. Dazu gehört nicht nur die Versorgung mit frischem Medium, sondern auch die Einhaltung von Umweltparametern wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffgehalt. Ausgehend von den in Abschnitt 3.1. beschriebenen Anforderungen einer adhärennten Zellkultur wurden Versorgungskonzepte erarbeitet. Die möglichen Strategien für die Versorgung werden vorgestellt. Dazugehörig wird die für die jeweilige Strategie erforderliche Gerätetechnik näher erläutert. Die Erfassung der Umgebungsparameter und die aufgebaute Temperaturregelung werden dargestellt.

Insbesondere in den Versorgungsstrecken ist das Auftreten von Blasen über ausgasende Medien oder Leckagen ein ernstzunehmendes Problem. Ein Teil dieses Abschnittes widmet sich den Überlegungen zur Realisierung der Blasenfreiheit in der Kultivierungskammer.

4.3.1 Versorgungsstrategien

Die Versorgungsstrategien lassen sich in Gruppen unterteilen, bei denen nach Auswahl einer Eigenschaft gruppenintern eine weitere Kombination mit den Auswahlen aus den anderen Gruppen zu einer geeigneten Realisierungsvariante führt.

Linear- oder Kreisbetrieb

Zuerst stellt sich die Frage, ob das Medium linear durch das Mikrosystem fließen soll oder im Kreis. Regelungstechnisch bedeutet dies, dass das System hinsichtlich des Massenstromes „offen“ oder „geschlossen“ ist. Für „offen“ wird hier der Begriff Linearität verwendet. Darunter versteht man das Einleiten des Mediums auf der einen Seite und das Ausleiten des verbrauchten Mediums auf der anderen Seite ohne Wiederaufführung des genutzten Mediums. Der große Vorteil dieser Variante ist, dass immer frisches Medium vorhanden ist. Dies ist zugleich ein Nachteil, da viele Zellen einen

Komplettwechsel des Mediums nicht gut verkraften (Lindl & Gstraunthaler 2008).

Bei der Anwendung eines Versorgungskreislaufs (geschlossenes System) wird das Medium im Kreis beziehungsweise hin und her gepumpt. Hierbei wird bereits genutztes Medium der Kultur erneut zugeführt. Diese Variante ist sparsam, jedoch problematisch bezüglich der Reduktion der Nährstoffe und der Anreicherung mit Abbauprodukten während eines jeden Durchgangs. Andererseits birgt auch genau das einen großen Vorteil. Bei der Kultivierung in der Petri-Schale wird das verbrauchte Medium aufgefangen und bestimmte Komponenten (Konditionierung des Mediums, siehe Abschnitt 3.1.6) werden dem neuen Medium wieder zugesetzt, da die Zellen sich so besser entwickeln. Auch im Kreisbetrieb kann frisches Medium zugeführt und abgeführt werden. Dabei muss die Sterilität allzeit gewahrt bleiben. Abbildung 17 zeigt beide Betriebsmodi im Vergleich.

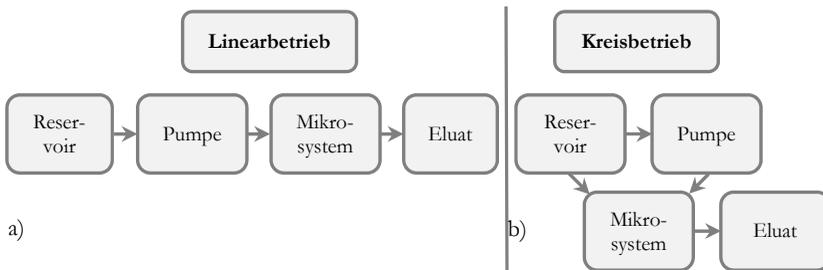


Abbildung 17: Betriebsmodi für die Versorgungseinheit
 a) Linearbetrieb
 b) Kreisbetrieb

Die in dieser Arbeit ausgewählten Varianten gehen alle vom Betriebskonzept des Linearbetriebes aus. Der Einsatz eines Kreisbetriebes setzt einen hohen Realisierungsgrad des Gesamtaufbaus voraus. Für die bisher durchgeführten Versuche war diese Lösung nicht erforderlich.



Gravitationsgetrieben oder maschinell

Ein weiterer Aspekt beschäftigt sich mit der Frage, ob die Versorgung auf der Basis des hydrostatischen Drucks geschehen soll, indem ein erhöht angebrachtes Reservoir genutzt wird.

Abbildung 18 zeigt den prinzipiellen Aufbau. Die gravitationsgetriebene Variante kann nur im Linearbetrieb zum Einsatz kommen. Der Kreisbetrieb wäre nur möglich, wenn das durch das Mikrosystem geflossene Medium manuell wieder in das Reservoir eingebracht wird, oder wenn man es mittels einer Pumpe in das Reservoir pumpt. Wählt man diese Variante, kann prinzipiell auch auf eine maschinelle Versorgung mit einer Pumpe zurückgegriffen werden. Diese Möglichkeit ist ebenfalls in Abbildung 18 dargestellt. Der Abschnitt 4.3.2 beschreibt die beiden Möglichkeiten detailliert im Rahmen der Anwendungsfälle.

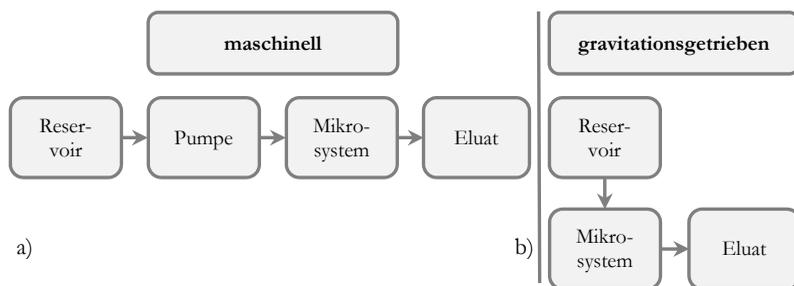


Abbildung 18: Betriebsmodi für die Versorgungseinheit

a) „maschinelle“

b) „gravitationsgetriebene“ Versorgung

Überdruck- oder Unterdruckbetrieb oder beides

Die Anwendung einer Pumpe eröffnet weitere Versorgungsvarianten. Die Pumpen können entweder das Medium durch das Mikrosystem pumpen oder das Medium durch das Mikrosystem saugen. Für die Gerätetechnik bedeutet dies, dass die jeweilige Pumpe im Überdruckbetrieb (Pumpen) oder im Unterdruckbetrieb (Saugen) genutzt wird.

Abbildung 19 zeigt die Anordnung der Versorgungskomponenten für beide Varianten.

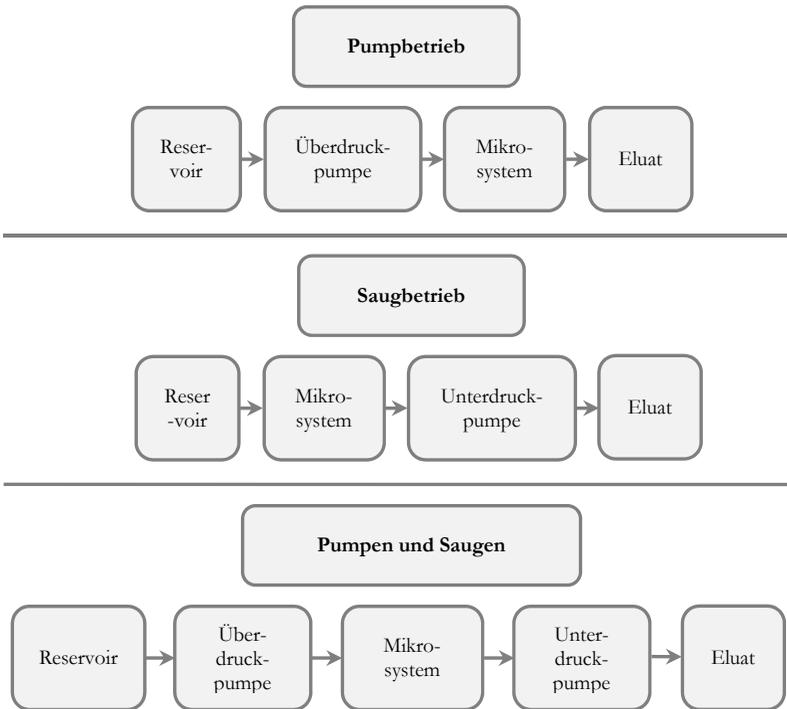


Abbildung 19: Betriebsmodi für maschinelle Versorgung des Mikrosystems mit Pumpe

Die Kombination beider Varianten, synchrones Pumpen und Saugen (siehe Abbildung 19) ist für Mikrosysteme vorgesehen, deren Kulturkammern nicht durch einen Deckel verschlossen sind. Nur durch diese Technik ist es möglich, ein solches System mit Pumpen stabil zu versorgen, das heißt ein „Trockenfallen“ oder Überlaufen zu verhindern. Unkompliziert können diese Mikrosysteme mit Hilfe der gravitationsgetriebenen Variante versorgt werden. Weitere Erläuterungen dazu folgen im Abschnitt „Gerätetechnik“.

4.3.2 Gerätetechnik

Alle vorgestellten Versorgungsstrategien erfordern je nach Kombination eine bestimmte Gerätetechnik zum Aufbau der Versorgungsstrecken.

Die Notwendigkeit eines Medienreservoirs ist bei allen Varianten gleich. Falls dieses nicht ebenfalls den Auffangbehälter für das Eluat darstellt, ist ein solcher zusätzlich unabdingbar. Als Reservoir eignen sich Glasflaschen, welche über ihr standardisiertes Gewinde verschiedene Schraubdeckel mit Verteilern erhalten können.

Alle Komponenten werden mittels Polymer-/Silikonschläuchen verbunden. Zu bevorzugen sind dabei sehr flexible und transparente Schläuche, die eine Beobachtung zulassen. Die Flexibilität ermöglicht insbesondere das einfache Anschließen von Verbindern und Ventilen und die Ankopplung an das Mikrosystem. Zur Kopplung an die Pumpen und zur Sensorintegration ist auf das vorgegebene Standardformat der Hersteller zurückzugreifen. Wichtig ist, dass alle Komponenten nach dem Zusammenbau der Versorgungsstrecken in einem sterilen Zustand sind, denn eine anschließende Reinigung ist nur noch mit Hilfe von Spülungen mit Ethanol möglich und bleibt trotzdem unsicher. Abbildung 20 zeigt in einer Zusammenfassung die gerätetechnischen Teilkomponenten.

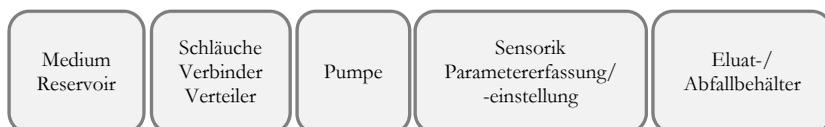


Abbildung 20: Gerätetechnische Komponenten der Versorgungseinheit

Für die fluidische Ver- und Entsorgung wurden diverse Varianten entwickelt, welche das Medium durch das System leiten. In diesem Abschnitt werden jene Realisierungsvarianten für das Herzstück der Versorgungseinheit beschrieben, welche bisher zum Betrieb des Systems im Zellkulturlabor zum Einsatz kamen.

Variante G - gravitationsgetrieben (Abbildung 21):

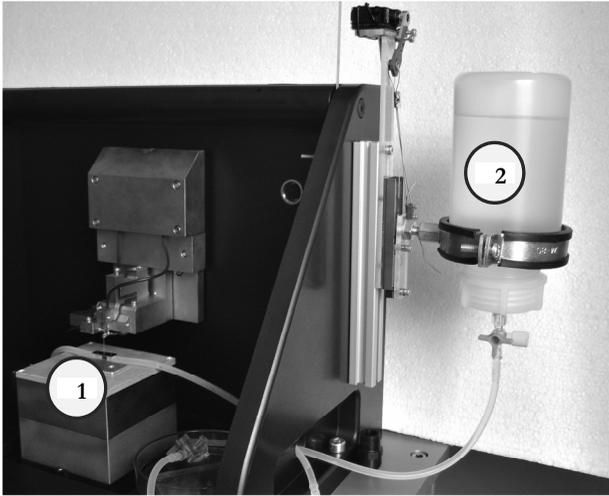


Abbildung 21: Mikrosystem zur Messung der Strömungskräfte in einem Tribometer (1), versorgt über ein Flüssigkeitsreservoir (2) (Fröber et al. 2008)

Diese Versorgungsmethode ist für erste Tests zum Nachweis einer prinzipiellen Funktion, für Demonstratoren und sonstige einfache Kultivierungsversuche geeignet. Mittels eines erhöht angebrachten, angekoppelten Medienreservoirs (1) wird eine Flüssigkeitssäule aufgebaut, deren Druck zur kontinuierlichen Versorgung des Mikrosystems genutzt wird. Über einen einstellbaren Verschluss der Versorgungsschläuche kann man die Fließgeschwindigkeit, welche von der Wassersäule abhängt, reduzieren. Jedoch ist eine exakte Quantifizierung nicht möglich. Die physikalische Basis für die Funktion liefert das Hydrostatische Grundgesetz, wie bereits im Abschnitt 4.2.3 beschrieben. Das Medium fließt aufgrund der Wirkung der Druckdifferenz durch das Mikrosystem (2). Für Versuche, bei denen die Durchflussmenge und Druck unkritisch sind, sollte diese Versorgungsvariante bevorzugt zum Einsatz kommen. Konkrete Zahlenwerte zu möglichen Durchflussraten (minimale und maximale Werte) sind den Versuchen zur Strömungsbeeinflussung im Mikrosystem zu entnehmen (Tabelle 9).

Mit dem Abfließen des Mediums aus dem Reservoir sinkt die Wassersäule und damit ihr Druck, was zur Abnahme der Fließgeschwindigkeit im System führt. Ein Ausgleich wäre nur durch eine stetige Zuführung von Flüssigkeit in den Vorratsbehälter möglich, dann wäre diese Methode jedoch mit deutlich



höherem technischem Aufwand verbunden, und es könnte auch eine andere Variante gewählt werden.

Variante K-V - Kolbenhubpumpe volumengeregelt, Überdruckbetrieb oder Unterdruckbetrieb (Abbildung 22):



Abbildung 22: Versorgungsaufbau für Medium und zwei Zusätze im Pumpbetrieb mit Kolbenhubpumpen

Realisiert wird diese Variante durch eine Kolbenhubpumpe VP9101 (STRATEC Biomedical Systems AG, Birkenfeld, Germany), die wie in Abbildung 22 vor oder nach dem Mikrosystem in den Versorgungskreislauf eingebracht wird. Damit wird ein konstanter Volumenstrom auch bei wechselnden Druckverhältnissen erzeugt. Die Flüssigkeit wird entweder durch das System gepumpt oder gesaugt, wobei letzteres zu bevorzugen ist, da man hier den Lufteintrag an der Pumpe besser unter Kontrolle halten kann und dieser für die vom Medium bereits passierte Zellkultur unschädlich ist.

Als Anwendungsbereich sind vor allem komplexe Langzeitexperimente zur Zellkultivierung zu nennen, bei denen verschiedene, hinsichtlich des Durchflusses variierende Zeitprofile abgearbeitet werden müssen (Spülvorgänge, Dauerversorgung, Impulsversorgung). Der durchfließende Volumenstrom ist sehr präzise auch im Bereich $\mu\text{l}/\text{min}$ einstellbar. Für die in

dieser Realisierungsvariante genutzten Pumpen wurde unter NI-LabView® eine Steuersoftware zur Parametereinstellung entwickelt.

Der Einsatz einer Pumpe löst viele der Nachteile, die eine pumpenlose Variante mit sich bringt, jedoch wird der Aufbau komplizierter und durch den Einsatz weiterer Hardware und Software auch teurer. Es steigt das Risiko von Fehlerquellen im Bereich des sterilen Arbeitens und des Eintrages von Luftblasen.

Variante 2K-V - zwei Kolbenhubpumpen volumengeregelt, Pumpbetrieb und Saugbetrieb (Abbildung 23):



Abbildung 23: Oben offenes Mikrosystem stabil ohne Überlaufen versorgt durch synchrones Zuführen und Absaugen des Mediums



Kommen für die Manipulation während der Kultivierung im Mikrosystem oben offene Mikrosysteme zum Einsatz, reicht ein einfacher Pump- oder Saugbetrieb nicht aus, um eine stabile Versorgung zu realisieren. Das Medium würde aus der Öffnung im Glasdeckel austreten. Betreibt man jedoch zwei Pumpen synchron zur Ver- und Entsorgung, kann dieses Problem umgangen werden. Voraussetzung ist, dass exakt jene Menge an Medium abtransportiert wird, die eingespeist wird. Abbildung 23 zeigt den Aufbau mit einem oben offenen Mikrosystem und zwei synchronisiert arbeitenden Pumpen (Volumenstrom Pumpen = Volumenstrom Saugen). Die Steuerung dieses Prozesses übernimmt ein Programmmodul unter NI-LabView®. Problematisch ist, dass die zum Einsatz kommenden Pumpen nicht identisch sind. Daher ist die einmal kalibrierte Anordnung im Versorgungsnetz einzuhalten, und Verzögerungszeiten müssen nach ihrer Ermittlung über die Software korrigiert werden. Ein Schwanken des Flüssigkeitsmeniskus in der nach oben offenen Kultivierungskammer ist dennoch nicht vollkommen zu verhindern. Diese Methode ist trotz ihrer Mängel gut geeignet, um während der Manipulation die Versorgung weiterhin gewährleisten zu können.

Variante S-p - Schlauchpumpe druckgeregelt (Abbildung 24):



Abbildung 24: Versorgungseinheit bestehend aus druckgeregelter Schlauchpumpe und Temperaturregelung mit Temperatur- und Druckanzeige

Möchte man sicherstellen, dass der im Mikrosystem vorhandene Druck sich während der Versorgung nicht ändert, kann eine druckgesteuerte, hydrodynamische Versorgung zum Einsatz kommen. Diese ist mittels einer Schlauchpumpe realisierbar. Diese realisiert durch Variation der durchfließenden Flüssigkeitsmenge immer die zuvor eingestellten Druckverhältnisse.

Das ist besonders für komplexe Versuche mit variierenden Strömungsbedingungen zur Beeinflussung der Zellen mittels Druckveränderung angebracht, da man hier die Druckverhältnisse exakt quantifizieren kann. Die Schlauchpumpe ist in einem Gehäuse untergebracht, welches mit einer Druckanzeige versehen ist.

Das Versorgungsmodul mit Schlauchpumpe (Variante S-p) enthält ebenfalls eine Temperaturmessung und einen Temperaturregler. Mit diesen Komponenten lässt sich die Temperatur im Mikrosystem gezielt steuern, um adäquate Umgebungsbedingungen zu erreichen. Weitere technische Komponenten zur Parametererfassung sind erforderlich. Die dafür vorgesehenen Realisierungsvarianten werden im folgenden Abschnitt näher erläutert. Im Anschluss daran wird der Umgang mit Blasenbildung dargelegt.

4.3.3 Parametererfassung

Unter Parametern für die erfolgreiche Kultivierung der Zellen versteht man die erforderlichen physikalischen und chemischen Parameter (Temperatur, pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentration), die im Medium, und damit in der direkten Umgebung der Zellen, realisiert werden müssen. Deren Erfassung, Kontrolle und teilweise Regelung wird im folgenden Abschnitt erläutert. An dieser Stelle wird auf die Systemparameter zur Sicherstellung der Funktion des Gesamtsystems (Mikroskopbeleuchtung, Manipulatorposition, Pumpenbetrieb) nicht eingegangen.

Temperaturmessung und -regelung

$37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ist die Temperatur, die eine Zellkultur mit Säugerzellen erfordert. Um diese Temperatur in der Kulturkammer des Mikrosystems einzustellen, wurde nach Abwägung der Literaturlage (Abschnitt 1.2.3.), Auswertung von Versuchen und der geplanten Anwendungsfälle (insbesondere inkubatorfreie Langzeitkultivierung humaner Osteoblasten) eine Integration von Wärmetauscherstrukturen in das Mikrosystem mit externer Beheizung eines zweiten Flüssigkeitskreislaufes neben dem eigentlichen Medienkreislauf vorgesehen.



Wie im Abschnitt 4.2.1. beschrieben und in Abbildung 11 erkennbar, wurden in den BioMEMS im Silizium Wärmetauscherstrukturen vorgesehen. Eine vortemperierte Flüssigkeit fließt durch mäanderartige Kanalstrukturen um die mediendurchströmte Kultivierungskammer. Die hohe Wärmeleitfähigkeit des Siliziums (ca. $\lambda = 148 \frac{W}{m \cdot K}$) ermöglicht die schnelle Übertragung der Wärme einer temperierten Flüssigkeit auf das Kulturmedium in der Kultivierungskammer. So wird das Medium vor Ort aufgeheizt. Das verringert die negative Beeinflussung des Mediums durch ständig hohe Temperaturen (siehe 3.1.5.). Nur für jene Zeitspanne, in welcher sich das Medium im Mikrosystem befindet, wird es geheizt. Nach Durchfließen des Systems gelangt es wieder in das nicht geheizte Reservoir, was den Lagerungsbedingungen für thermostabiles Medium entspricht (siehe 3.1.5.).

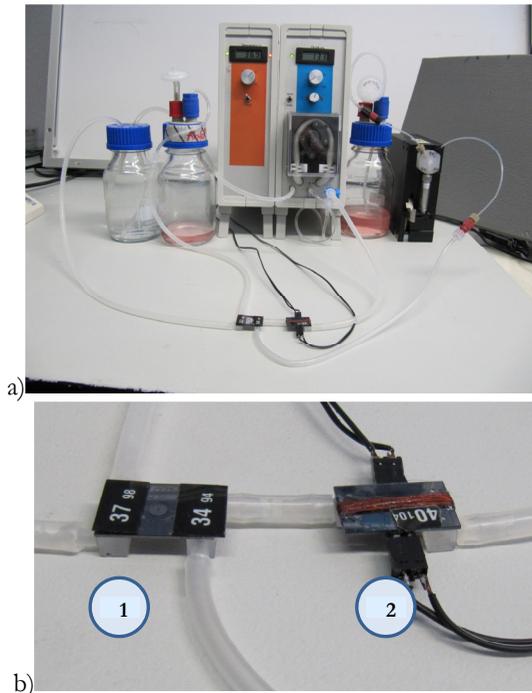


Abbildung 25: Temperaturregelung für das Mikrosystem

a) Gesamtaufbau

b) Detailsicht

1) Mikrosystem mit Temperaturmessung

2) Mikrosystem-Heizer mit Temperaturmessung

Ein einstufiger analoger Regler regelt die Temperatur der Wärmetauscherflüssigkeit mittels eines Heizers (ein mit Kupferdraht umwickeltes, mit Wasser durchströmtes Mikrosystem) auf einen am Regler voreingestellten Wert von deutlich über $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abbildung 26 zeigt den Aufbau der Temperaturregelung, wobei Teilbild a) den Gesamtaufbau (Mikrosystem, Heizer, Regler, Temperatursensoren, Medien- und Temperierungsflüssigkeitsreservoir) und Teilbild b) die Detailansicht des Heizers und des Mikrosystems mit integrierten Wärmetauscherstrukturen zeigt.

In der Regelstrecke, auf bzw. kurz nach dem Heizer, wird die Temperatur mittels eines Pt100-Sensors gemessen. Dieser Wert wird dem Regler als Ist-Wert zugeführt und mittels Regeldifferenzbildung zur Regelung (Änderung der Spannung) genutzt. Auf der Verbindungsstrecke zum Wärmetauscher (Verbindungsschläuche zwischen Heizer und Mikrosystem) fällt die Temperatur auf Grund von Konvektionsvorgängen, der Anordnung und Lagerung der Komponenten bis zum auf dem Mikrosystem integrierten Wärmetauscher auf die geforderten $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ab. Es bedarf einer Zeitspanne von ca. 4 s, in der sich das erhitzte Medium vom Heizer bis in die Wärmetauscherstrukturen des Mikrosystems mit der Zellkultur ausbreitet und die gewünschte Temperatur in der Kulturkammer erreicht ist. Das Signal wird kontinuierlich zugeführt und verarbeitet. Direkt am Mikrosystem erfolgt ebenfalls eine Messung, um die Temperatur in der Kultivierungskammer zu kontrollieren. Hierzu kommen Temperaturmessstreifen (reversibel, Novodirect GmbH, Deutschland) zum Einsatz, die auf eine Temperaturänderung durch einen Farbumschlag reagieren (siehe Abbildung 25).

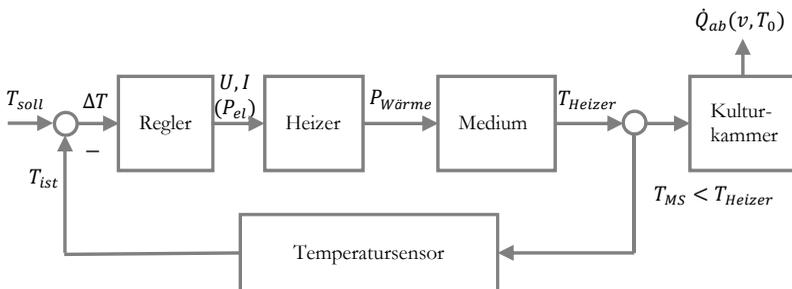


Abbildung 26: Regelstrecke für die konstante Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

T_{soll}	geforderte Temperatur, sollte T_{MS} entsprechen
T_{ist}	gemessene Systemtemperatur
ΔT	Differenz zwischen T_{soll} und T_{ist}
T_{Heizer}	Temperatur des Systems nach dem Heizer
T_{MS}	Temperatur des Mikrosystems
$U, I (P_{el})$	Spannung, Strom (elektrische Leistung)
$P_{Wärme}$	Wärmeleistung des Heizers
$\dot{Q}_{ab}(v, T_0)$	Wärmestrom, abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit des Mediums und der Umgebungstemperatur

Sollte es zum Beispiel durch Änderung der Temperatur oder der Geschwindigkeit des strömenden Fluids zu einer Änderung der Temperatur in der Kulturkammer kommen, ist der davor geschaltete Regler nicht in der Lage darauf zu reagieren. Die Messung der Führungsgröße erfolgt, wie bereits erwähnt, nicht in der Kammer, sondern auf dem Heizer. Eine Temperaturänderung in der Kammer wird nicht registriert, was im Langzeitexperiment dazu führt, dass die Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur, Fließgeschwindigkeiten) konstant gehalten werden müssen.

Eine zweistufige Regelung, bei der sowohl der Wert am Heizer, als auch der Wert am Wärmetauscher, also auf dem Mikrosystem zur Regelung genutzt wird, ist zu empfehlen, jedoch bisher nicht realisiert. Insbesondere die Integration eines Temperatursensors in die Kulturkammer stellt eine technologische Herausforderung dar, da alle geforderten Rahmenbedingungen (Sterilisierbarkeit, Sterilität, Dichtigkeit) erhalten bleiben müssen.

Die Firma Micropelt GmbH (Freyburg, Germany) vertreibt miniaturisierte Peltier-Elemente (MPC-D303, Datenblatt siehe Anhang A4), die den Verzicht auf einen Wärmetauscher möglich machen könnten. Die Heizung erfolgt integriert auf dem Mikrosystem. Das Peltier-Element kann aufgrund seiner Eigenschaften durch Stromdurchfluss eine Temperatur-differenz erzeugen und umgekehrt und somit gleichzeitig als Heizer und Sensor dienen.

Die in der Literatur beschriebenen in den Glasdeckel integrierten ITO-Heizer (Stangegaard et al. 2006) und (Hung et al. 2005) sind anwendbar, jedoch aufgrund des hohen Grades an Integration schwer realisierbar, teuer und nicht wiederverwendbar.



pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt

Im zuvor beschriebenen Abschnitt klang mit der realisierten Temperaturerfassung bereits das Thema Sensorik zur Überwachung der Zustände im Mikrosystem an. Die neben der Temperatur bedeutendsten Zustandsparameter sind der pH-Wert und der damit in Zusammenhang stehende Kohlendioxidgehalt und der Sauerstoffgehalt. Bei herkömmlichen Kulturen und vielen miniaturisierten Varianten kann man auf eine spezielle Messung dieser Werte weitestgehend verzichten, da die Umgebungsbedingungen durch Brutschränke fest vorgegeben werden (Abschnitt 2.1.3).

Der pH-Wert des Mediums ist ein wichtiger Indikator für die Situation in der Kultur. Durch geeignete Farbindikatoren im Medium wie zum Beispiel das Phenolrot kann über den Farbumschlag bei pH-Wert-Änderung eine visuelle Abschätzung stattfinden (Schmitz 2009). Im pH-Bereich von 6,4-8,2 ist eine Farbänderung erkennbar (bei dem idealen Ausgangswert im Bereich von 7,2-7,4 stellt sich das physiologische Optimum ein (Lindl & Gstraunthaler 2008, S. 75)). Schlägt das Medium von basisch zu sauer um, ändert sich die Farbe von rot zu gelb. Jedoch ist anzumerken, dass diese Art der Kontrolle ein Eingreifen zur Korrektur nicht mehr möglich macht, da dieser detektierte geänderte pH-Wert für die Zellen bereits schädlich ist.

Um die Zustände im Mikrosystem unter Kontrolle zu halten, werden bei der hier vorgestellten Variante die Messung des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration beschrieben. Von Eigenentwicklungen auf dem Gebiet der Sensorik wurde abgesehen, da dieses Feld eines enorm hohen Forschungsaufwandes bedarf. Es wurde auf kommerziell verfügbare Sensoren der PreSens GmbH (Regensburg, Germany) zurückgegriffen. Diese bietet zwei geeignete Möglichkeiten zur Sensorintegration in das Mikrosystem an. Zum einen kann mittels Durchflusssensoren und zum anderen mittels Sensorspots gemessen werden. Das Messprinzip (chemo-optisch) bleibt gleich, variiert jedoch hinsichtlich der zu messenden Parameter.

Messmethode für Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt (Abbildung 27a)

Das Licht einer blau-grünen LED (Light Emitting Diode) regt den Sensor zur Abgabe fluoreszenten Lichtes an (1). Trifft der Sensorspot auf ein Sauerstoffmolekül, wird die überschüssige Energie in nicht abgestrahlte Energie umgewandelt, welche das Fluoreszenzsignal verringert oder auslöscht (2). Die gemessene Lumineszenzzeit ist eine Überlagerung der Signale eines analytischen sensitiven Indikators und eines internen Referenzindikators, wobei beide Indikatoren sehr verschiedene Lumineszenzzeiten aufweisen und die Lumineszenz des analytischen sensitiven Indikators durch den Sauerstoff

oder das Kohlendioxid unterdrückt werden kann. Der Grad der Auslöschung korreliert mit dem Partialdruck des Sauerstoffs oder des Kohlendioxids in der Matrix, was im dynamischen Gleichgewicht zum Sauerstoff- oder Kohlendioxidgehalt in der Probe steht. Die Abklingzeitmessung ist intern referenziert.

(<http://www.presens.de/products/category/category/sensor-probes.html>, 01.06.2010)

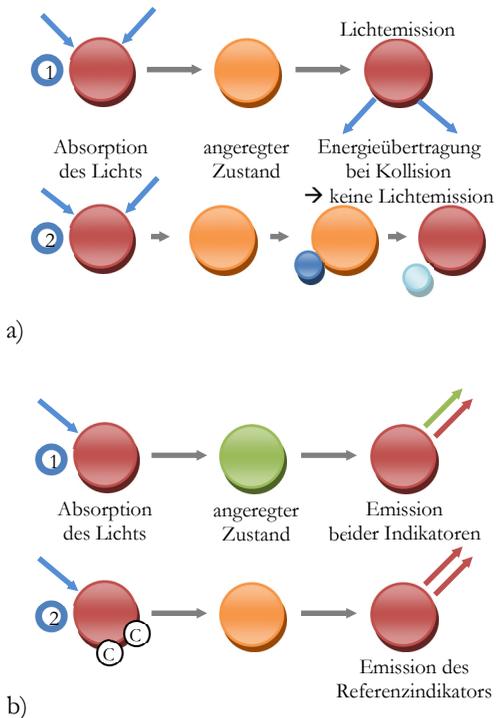


Abbildung 27: Messmethoden für die Umgebungsparameter
a) Messmethode für O₂ und CO₂-Konzentration
b) pH-Wert (nach PreSens GmbH)
Messvorgang ohne (1) und mit (2) zu messenden Größen



Messmethode für den pH-Wert (Abbildung 27b)

Zur Messung des pH-Wertes wird ebenfalls die intern referenzierte Doppelte-Lebenszeit-Referenzierung (DLR)-Methode genutzt. Die Abgabe fluoreszenten Lichtes wird durch die Bestrahlung des Sensors mit dem Licht einer blauen LED angeregt (1). Durch die Kombination verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, Intensitätsveränderungen im Zeitbereich zu detektieren (2). Die DLR-Methode ist essentiell für eine kalibrierungsfreie Messung und die einfache Parallelisierung der Messung durch die identische Kalibrierung einer großen Zahl an Sensoren.

(<http://www.presens.de/products/category/category/sensor-probes.html>, 01.06.2010)

Sensorvarianten

Es existieren zwei für das Mikrosystem geeignete Sensorvarianten für die zuvor genannten zu erfassenden Parameter. Diese werden im Folgenden anwendungsbezogen erläutert.

Variante DMZ – Durchflussmesszelle:

Die Sensoren können als Durchflussmesszelle (Abbildung 28) realisiert und in den Versorgungskreislauf der Zellkultur integriert werden. Das geschieht über einfache Luer-Adapter. Hierbei kann man sowohl systemnah, als auch systemfern und auch vor und hinter der Kultivierungskammer messen. Von Vorteil ist dabei die einfache Kopplungsvariante und somit eine Gewährleistung der Sterilität, falls die Sensorintegration vor der Inbetriebnahme in einer Reinraumwerkbank erfolgt. Es ist keine zusätzliche Messkammer im Mikrosystem erforderlich. Als nachteilig ist zu nennen, dass systemnahes Messen trotz allem im Verhältnis zur Kammergröße von wenigen Kubikmillimetern mit einer Entfernung von mehreren Zentimetern passiert.



Abbildung 28: Durchflussmesszelle mit Luer-Anschlüssen zur direkten Integration in den Medienkreislauf (Quelle PreSens GmbH, Regensburg, Germany)



Variante SeSpo - Sensorspot:

Neben den Durchflusssensoren stellt der Anbieter auch Sensorspots her, die im Normalfall auf der Innenseite der Kultivierungsgefäße (Kulturflaschen und Petri-Schalen) angebracht werden. Sieht man in der Entwurfphase des Mikrosystems zusätzliche Messkammern vor, ist es möglich, diese Sensorspots auch in die Mikrosysteme zu integrieren.

Abbildung 29 zeigt die schematische Darstellung der Integration eines pH-Sensors und eines Sauerstoffsensors. Die Sensorspots haben einen Durchmesser von 3 mm und eine Dicke von ca. 0,15 mm. Der Sensorspot wird mit einem biokompatiblen Kleber auf dem Glasdeckel im Inneren des Mikrosystems befestigt. Das Einbringen erfolgt nach Fertigstellung der Systeme, wie für die Scaffold-Integration in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, über das Einsetzen eines nanostrukturierten Siliziumbauteils als Verschluss an der Rückseite.

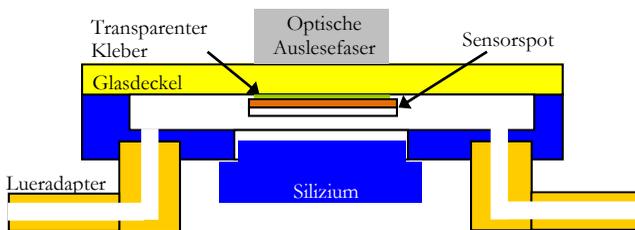


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Sensorintegration in eine Messkammer

Von großem Vorteil ist, dass eine Messung nah an der Kultivierungskammer möglich ist. Der Abstand der Kammern kann minimal bei 1 mm bis 2 mm liegen. Nach der Integration und erfolgreicher Sterilisation ist diese Variante kompakter als die zuvor beschriebene. Der Integrationsgrad wird so erhöht. Allerdings muss der gesamte Aufbau kompatibel zur messtechnischen Erfassung gehalten werden und auch bei dieser Variante ist eine orts aufgelöste Messung direkt in der Kultivierungskammer nicht möglich.

Eine Sterilisierbarkeit der Sensorspots ist laut Hersteller nicht gegeben, wobei unbekannt ist, ob die Spots wirklich für alle gängigen Methoden intolerant sind, oder ob dies nur für die Dampfsterilisation gilt und auf der Seite des Herstellers bei fehlender Konkurrenz Sicherheitsüberlegungen dominant sind (höherer Umsatz durch Einwegprodukte bei Minimierung der Gewährleistungsrisiken). Hier ist ein Test angezeigt, welcher das Verhalten des Sensors nach Sterilisation messtechnisch überprüft. Die Integration des Sensors ist mit großem Aufwand verbunden. Die Verwendung eines

Klebstoffes zur Befestigung des Sensorspots könnte aufgrund der geringen Mengen an Medium im Verhältnis zur Menge an Klebstoff in Bezug auf die Biokompatibilität kritisch sein. Durch zusätzliche Messkammern und die Kompatibilität zur Messwerterfassung wird die Gesamtgröße des Mikrosystems signifikant vergrößert. Abbildung 30 zeigt die exemplarische Integration eines pH-Sensors in eine durchströmte Messkammer.

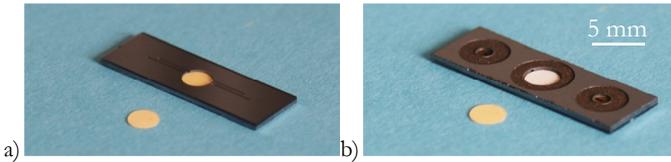


Abbildung 30: Integration von Sensorelementen in das Mikrosystem

- a) Ansicht durch den Glasdeckel auf den Sensorspot (orange), Messseite
 b) Ansicht der unverschlossenen Siliziumseite, Interfaceregion für den Siliziumdeckel

Falls es für bestimmte Experimente erforderlich sein sollte, ist es möglich eine Regelstrecke für den Sauerstoff- oder Kohlendioxidgehalt und damit auch für den pH-Wert aufzubauen. Realisiert wurde diese Lösung bisher jedoch nicht.

4.3.4 Blasenfreiheit

Der Umgang mit Lufteintrag durch die Versorgungsstrecken und Ausgasung des Mediums wird in der Literatur relativ selten angesprochen. Methoden, die zur Vermeidung der Blasenbildung vorgeschlagen werden, sind der Einsatz von Spritzenpumpen im Vergleich zu Schlauchpumpen (Ince & Beekman 1990) und der Einsatz verschiedener Blasenfänger (Villa-Diaz et al. 2009), (Toh et al. 2007), (Prokop et al. 2004) und (Sung & Shuler M. L. 2009). Um den gerätetechnischen Aufwand gering zu halten und ein hohes Integrationslevel zu erreichen, wurde das Vorheizen des Mediums (Ince & Beekman 1990) und (Stangegaard et al. 2006) als mögliche Realisierungsvariante in Betracht gezogen.

Besonderes Augenmerk muss auf die Dichtigkeit der Schlauchkomponenten und -verbinder gelegt werden. Zur Realisierung der Blasenfreiheit ist dies die Grundbedingung.

Bringt man ein Medium, welches in etwa Raumtemperatur hat, in ein Mikrosystem ein und erhitzt es dort auf 37 °C, führt diese Temperaturdifferenz von ca. 15 K dazu, dass sich im Inneren der Kammer Blasen bilden. So geschieht es bei Vorhandensein von kleinsten Blasenkeimen innerhalb von weniger als 15 min, dass die komplette Kulturkammer mit Luft gefüllt ist.

Als erste Maßnahme ist es wichtig darauf zu achten, das Mikrosystem vor der Integration der vorkultivierten Zellen auf dem Stopfen frei von Blasen zu halten und auch bei der Integration keine weitere Luft einzuschließen. Sollten doch kleine Blasenkeime in der Kammer enthalten sein, ist es möglich, mittels Durchströmung mit angewärmtem Medium die Blasen vollständig aufzulösen. Das ist machbar, da das Medium bei der Erwärmung Gas abgibt und dieses dann beim Durchströmen wieder aufnehmen kann. Bei vollständiger Entfernung der Blasen entstehen keine bzw. sehr langsam neue Blasen. Zieht man hier nun die Bilderfassung und -verarbeitung hinzu, ist es möglich, frühzeitig die Neubildung von Blasen zu detektieren und mittels erneuter Durchströmung mit verarmtem Medium zu entfernen. Labortests zeigten, dass diese Blasenentfernung für Wasser und mit Kohlensäure angereichertes Wasser sehr stabil über mehrere Tage funktioniert. Nach Entfernung der vorhandenen Blasen gab es keine Neubildung. Mit Medium ließ sich die Blase zwar komplett entfernen, jedoch ließ sich eine Neubildung nicht komplett verhindern. Allerdings kam hier eine Peristaltikpumpe zum Einsatz, welche durch ihre periodische Pumpwirkung wiederum die Blasenbildung fördert.

Welche Auswirkungen eine Durchströmung mit erwärmtem Medium ($> 37\text{ °C}$) über einen gewissen Zeitraum auf kultivierte Zellen hat und ob die Menge an gebundenem Sauerstoff einen Einfluss auf die Entwicklung der Zellkultur hat, ist ohne weiterführende ausführliche Versuchsreihen mit Zellen nicht zu beurteilen.



4.4 Optische Beobachtungseinheit

Einen wesentlichen Bestandteil des Gesamtsystems bildet die optische Beobachtungseinheit. Sie erhält ihre umfangreichen Funktionalitäten durch die geschickte Kombination aus Hardware- und Software. Die Basisfunktion ist die Erfassung von Bildern und Videosequenzen. Darauf aufbauend lassen sich weitere Möglichkeiten wie die Zelldetektion, die Erweiterung des Schärfentiefebereiches zur Tiefensteuerung und die Detektion von Werkzeugen für die Manipulatorsteuerung erläutern. Die Zusammenführung der Softwarekomponenten eröffnet perspektivisch eine Vielzahl an ergänzenden Entwicklungsrichtungen zur Erweiterung der Leistungsfähigkeit der Beobachtungseinheit.

Die folgenden Abschnitte beschreiben, ergänzt durch die Erkenntnisse aus einer umfangreichen Analyse des Standes der Technik, den Realisierungsstand der optischen Systemüberwachung.

4.4.1 Aufgaben/Funktionen

Mit Hilfe der Mikroskopie ist es möglich, wesentliche Informationen über Vitalität, Zellanzahl, Zelldichte und Stoffwechselfvorgänge zu gewinnen. Die optische Beobachtung in Form mikroskopisch erfasster digitaler Bilder, deren Entstehung auf sichtbarem Licht und Fluoreszenz basiert, kann auch als Überwachung aufgefasst werden.

Der Begriff „Überwachung“ beinhaltet für diese Arbeit folgende Aufgaben:

- Optische Kontrolle/Beurteilung des technischen Systems und der biologischen Organismen mit Mikroskop und Kamera.
- Erfassung räumlicher Parameter/Positionen zur Handhabung der Mikrosystem-komponenten, der Scaffolds und der Zellen.
- Für das Gesamtsystem umfasst der Begriff „Überwachung“ auch die sensorische Kontrolle chemischer und physikalischer Parameter in der Kultivierungskammer (pH-Wert, Temperatur, Sauerstoff). Die Erfassung dieser Parameter wurde in Abschnitt 4.3.3 erläutert.

Aus dieser Definition leiten sich die drei in Abschnitt 3.2.2 bereits erwähnten Hauptfunktionen der optischen Beobachtungseinheit ab:

Das System-Monitoring

ist die Beobachtung der Zustände der technischen Komponenten im Gesamtsystem (Funktionstüchtigkeit des Mikrofluidsystems, der Kultivierungskammer, der Zu- bzw. Ablaufstrecken und der Manipulationsinstrumente).



Das Zell-Monitoring

ist die Detektion, Beobachtung und Beurteilung der Zellen und Zellzustände während der Kultivierung anhand optischer/morphologischer Merkmale (Farben im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie, Größe, Form, Anzahl, Verteilung, Position der Zellen).

Die Parameterermittlung

ist die Ermittlung der Ortskoordinaten als Steuerungs- und Regelungsparameter für den Einsatz von Manipulationswerkzeugen im Mikrosystem (Referenzpunkte werden festgelegt).

4.4.2 Aufbau

Zur Entwicklung eines komplexen Aufbaus kam ein am Fachgebiet Biomechatronik vorhandenes Mikroskop der Firma Zeiss (Jena, Germany) zum Einsatz. Das Axiotech 100 HD Mikroskop hat mehrere Objektive (Vergrößerungsfaktoren: 5, 10, 20, 100). Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Auflichtmikroskop, das auch die Beobachtung nicht transparenter Bauteile und darauf befindlicher Objekte ermöglicht. Diese Funktion ist zwingend erforderlich, da die verwendeten Mikrosysteme, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, zum Teil aus lichtundurchlässigem Silizium bestehen. Ebenfalls verfügbar ist eine Fluoreszenzeinheit bestehend aus Quecksilberdampfampe mit Lampenspiegel zum unkomplizierten Wechsel und zwei Filtersätzen.

Eine weitere Komponente ist eine Farbbild-CCD-Kamera „scA1000-30fc“ der Firma Basler (Ahrensburg, Germany) mit einer Auflösung von 1032 x 778 Pixeln bei einer Diagonale des CCD-Chip von 1/3" und einer maximalen Bildwiederholfrequenz von 30 Bildern pro Sekunde. Die Kamera verfügt über eine Firewire 800 (IEEE 1394b) Schnittstelle, über welche die Bilder an einen Computer übertragen werden. Die Kamera wird über einen Adapter (Zeiss, Jena, Germany), welcher über eine 0,4-fache Vergrößerung verfügt, an das Mikroskop gekoppelt. Das bedeutet, dass bei einem Objektiv mit 5-facher Vergrößerung das Bild nur 2-fach vergrößert ist. Diese Funktion des Adapters ermöglicht es, mit der kleinstmöglichen Vergrößerung einen relativ großen Ausschnitt des gesamten Mikrosystems im Bild darzustellen, beispielsweise die gesamte Kammer mit Siebstrukturen und den Ansätzen der Kanalstrukturen.

Formel 5 gibt die Berechnungsvorschrift für die Abmessungen eines Pixels an, welche aufgrund der Systemparameter und des telezentrischen Strahlenverlaufs gilt:

$$\frac{n_p}{n} = a \quad (5)$$



Die Größe n_p steht hierbei für die Seitenlänge eines CCD-Pixels ($4,65 \mu\text{m}$), der Faktor n für die Vergrößerung (5-fach mal 0,4-fach). Daraus ergibt sich, dass das Abbild eines Bildpunktes auf einem Pixel $2,325 \mu\text{m}$ beträgt. Ein Pixel hat somit eine Abbildungsfläche von $2,325 \times 2,325 \mu\text{m}^2$. Die Auflösung von 1032×778 Pixeln ermöglicht daher eine sichtbare Fläche von $2399,4 \times 1808,85 \mu\text{m}^2$ (Würfel 2008).

Der Tisch des Mikroskops ist von Hand in x- und y-Richtung verstellbar („Kreuztisch“). Für die Einstellung der z-Achse kann neben der manuellen Einstellung auch ein Schrittmotor zum Einsatz kommen. Dieser Motor ermöglicht es, Aufnahmen in verschiedenen Tiefen-bereichen des Systems mit definierten Abständen anzufertigen (siehe Abschnitt 4.5.2.) und auf Basis der Fokuseinstellung die Steuerung der Mikromanipulatoren in der dritten Raumrichtung vorzunehmen (siehe Abschnitt 4.5.2.).

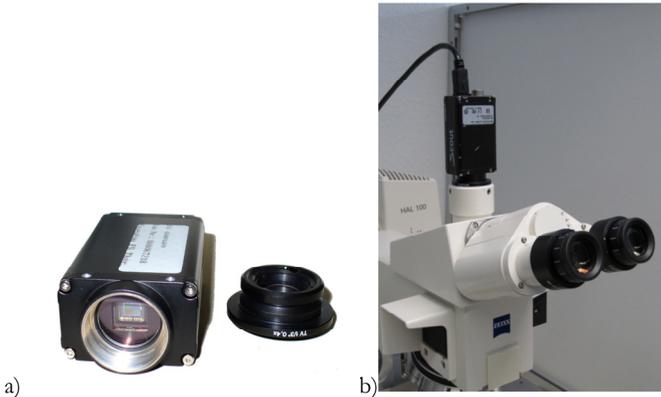


Abbildung 31: Komponenten der Überwachungseinheit

a) Kamera und Adapter

b) Mikroskop mit Kamera und Adapter

4.4.3 Teilfunktionen/Softwarekomponenten

Aus den beschriebenen Aufgaben und dem Aufbau der optischen Beobachtungseinheit lassen sich die Funktionen der wesentlichen Softwarekomponenten ableiten. Die Entwicklung von Algorithmen zur Bilderfassung und -verarbeitung wurde gemeinsam mit Kollegen des Fachgebietes vorgenommen. Ein Großteil der Realisierungen wurde in enger Diskussion mit Frau Dipl.-Inf. Silvia Lehmann entworfen, durch sie erstellt und gemeinsam publiziert.

Bilderfassung, Speichern von Bildern mit Maßstab und Videosequenzen

Die Basiskomponente der Bildverarbeitung stellt eine Bilderfassungssoftware zur Dokumentation der Versuchsreihen und Experimente dar. Diese ermöglicht die Erfassung der mikroskopischen Aufnahmen in Form von digitalen Bildern oder Videosequenzen. Sie besitzt einen geringen Automatisierungsgrad, bietet auf diese Weise jedoch Möglichkeiten für den Nutzer, alle Einstellungen zur Bilderfassung selbst vorzunehmen.

Für die weiterführende Bildverarbeitung werden meist verlustfrei komprimierte Bilder im Tagged Image File Format (TIFF) benötigt. Jedoch ist es für die Ergebnisdokumentation sinnvoll, bereits bei der Erfassung des Bildes die Möglichkeit zu haben, einen Maßstab für die Größenverhältnisse auf dem Bild anzuzeigen. In Abbildung 32 sind die dafür erforderlichen Angaben (verwendetes Objektiv, verwendeter Kameraadapter) und einstellbaren Eigenschaften (Position, Farbe, Größe) dargestellt.

Die erfassten Rohbilder dienen dazu, Bildverarbeitungsprozesse auf sie anzuwenden, um die benötigten Informationen über das System und die Zustände zu erhalten.

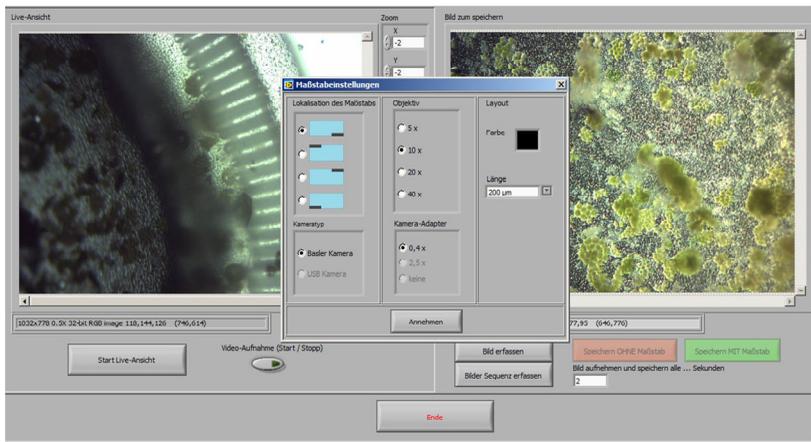


Abbildung 32: Bilderfassungssoftware
(Quelle S. Lehmann 2009, Fachgebiet Biomechatronik, nicht publiziert)

Detektion von Zellen und Zelleigenschaften

Im Rahmen der Entwicklung des Mikrosystems wurde frühzeitig die Option der automatisierten Beobachtung und Beurteilung in Betracht gezogen. Dabei geht es primär um die Zählung der Zellen in Kultur und um die Analyse des Vitalzustands. Anhand der Morphologie kann man unter Kenntnis des genauen Zelltyps Aussagen über den Zustand der Zelle treffen (aktiver Stoffwechsel, tot, in Teilung, adhärent, sich ausprägende ECM). Es wird ein Softwarepaket zur automatischen Erkennung von Zellzuständen geben. Für den ersten Betrieb und in der Entwicklungsphase des Systemaufbaus war es jedoch nicht sinnvoll, den Abschluss dieses Arbeitspaketes abzuwarten.

Zur automatischen Erkennung von Merkmalen in Bildern mit Hilfe der Bildverarbeitung sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Bildanalyse (Untersuchung des Bildes hinsichtlich technischer Parameter z. B.: Bildformat, Auflösung),
- Bildvorverarbeitung (dient der Bildverbesserung und der Informationsreduktion; besteht in der Regel aus: geometrischer Entzerrung, Bildverbesserung und Bildrestauration),
- Segmentierung (eigentlicher Bildverarbeitungsalgorithmus zur Informationsgewinnung aus dem Bild) und
- Merkmalsextraktion und Klassifizierung der Segmente (Abbildung der relevanten Informationen auf einen engen Merkmalsraum und Beurteilung der gewonnenen Informationen).

Der aktuelle Stand der Technik im Bereich der bildverarbeitungs-basierten Zelldetektion wurde anhand der Literaturlage untersucht (siehe Tabelle 20 im Anhang unter A5).

Hodneland et al. (2009) und Cheng & Rajapakse (2009) liefern zwei aktuelle Übersichts-publikationen zur Thematik der Zelldetektion, in denen die gängigen Methoden erläutert werden.

Die ausführliche Analyse von Publikationen zur Thematik der „Zellsegmentation“ zeigt zwei eindeutige Trends:

1. Die „markerbasierte Wasserscheidentransformation“ wird in neun Schriften als gängige Methode zur Segmentierung eingesetzt. Allerdings sind deutliche Unterschiede in der Bildvorverarbeitung und der Markergenerierung erkennbar. Hier kommen sowohl einfache Schwellwertberechnungen, als auch „aktive Konturen“ zum Einsatz. Für



konstante Zellformen verwenden Kachouie et al. (2008) das „Template Matching“. Bei Wang et al. (2000) kommt die „Partikelakkumulation in lokalen Maxima eines Gradientenvektorfeldes“ zum Einsatz, und Tai et al. (2007) nutzen adaptive Schwellwertbildung und morphologische Nachbearbeitung.

2. Die in neun Publikationen verwendete „Level-Set-Methode“ (Niveaumengen-methode) basiert auf der Generierung aktiver Konturen ohne Kanteninformation. Diese Methode ist robust gegenüber schlechter Bildqualität. Weiche Konturen werden erkannt. Bei der Verwendung dieser Methode ist man unabhängig von Kanteninformationen, und Objektgrenzen werden sauber detektiert (Chan & Vese 2001).

In elf Publikationen wird von „Schwellwertmethoden“ gesprochen. Diese liegen beiden Segmentierungs-Methoden zugrunde. „Wasserscheiden-transformation“, „Level-Sets“ und „Segmentierung“ kommen sowohl in Kombination mit den anderen Methoden, als auch allein zum Einsatz. Angewendet werden die beschriebenen Methoden auf Zellen in Suspension wie auf adhärenente Zellen. Probleme werden bei Nasr-Isfahani et al. (2008), Kuijper & Heise (2008), Padfield et al. (2008), Sanpanich et al. (2008), Tscherepanow et al. (2008) und Cloppet & Boucher (2008) mit sich berührenden oder überlappenden Zellen geschildert. Zur Klassifizierung der erhaltenen Ergebnisse/Zellen wird unter anderem die Fuzzy-Logik eingesetzt (Xie et al. 2008).

Zur Entwicklung eines stabil funktionierenden Detektionsverfahrens sind die Rahmenbedingungen für die Bildeigenschaften und -inhalte festzulegen. Voraussetzungen für die Entwicklung eines geeigneten Algorithmus sind eine Festlegung der Zellart/Zelltyp zur Beschreibung der Morphologie (z. B.: humane Chondrozyten, Osteoblasten oder Fibroblasten). Die genaue Definition der Bilderfassungsparameter (Beleuchtung, Vergrößerung, Digitalisierung) durch die Festlegung der Aufnahmetechnik ermöglicht die Implementierung eines stabilen Algorithmus. Die Gruppierung mehrerer Zellen erschwert die Detektion einzelner Zellen und damit die Segmentierung sich überlappender oder berührender Säugetierzellen, was zu falschen Ergebnissen bei Zählung oder Beurteilung führen kann. Daher muss bei der Algorithmenentwicklung auf diesen Aspekt besonderes Augenmerk gelegt werden.

Das Erstellen einer auf NI-LabView® basierten Bildverarbeitungssoftware unter Nutzung des Vision Development Moduls ist nach der Analyse der ersten Realisierungsansätze möglich und kann weiter verfolgt werden.

Detektion von Werkzeugen zur Automatisierung der Steuerung

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Algorithmen, die zur Detektion von Werkzeugen in Form von Spitzen oder des Endes einer Nadel/Kanüle notwendig sind. Das Werkzeug, welches sich in der Kulturkammer des Mikrosystems befindet, kommt für Manipulationsaufgaben zum Einsatz. Diese Manipulationsaufgaben beinhalten sowohl die Entfernung toter Zellen und Partikel als auch die Applikation von Fluiden im Mikrosystem an vorgegebenen Positionen. Ziel der Entwicklungen ist es, diese Aufgaben in Zukunft autonom durchführen zu können. Momentan besteht das Ziel darin, die Nadel in der Zellkulturkammer zu detektieren und die Positionskordinaten ihrer Spitze zu ermitteln. Die Koordinaten der Nadelspitze sind die Basisparameter zur Steuerung der Mikromanipulationseinheit (siehe Abschnitt 4.5.2). Abschnitt 4.5 befasst sich ausführlich mit den Anforderungen und Aufgaben der Mikromanipulationseinheit für das Handhaben der Zellen und Mikrosystemkomponenten.

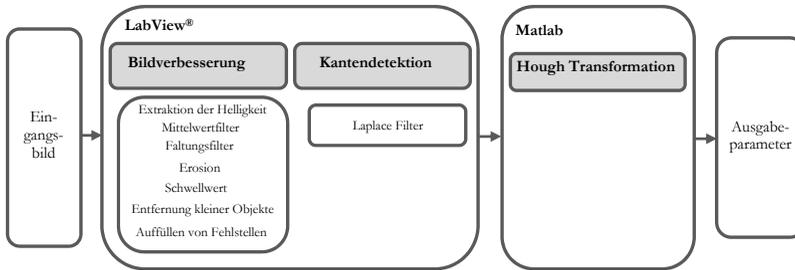


Abbildung 33: Bildverarbeitungsalgorithmus zur Detektion von Werkzeugen

Abbildung 33 zeigt die Teilkomponenten des Bildverarbeitungsalgorithmus. Das Eingabebild ist ein RGB-Farbbild mit 24 bit, welches mit der beschriebenen Kamera erzeugt wird.

Zur Bildverbesserung wurde ein Algorithmus entwickelt, der für Bilder mit verschiedenen Beleuchtungsparametern anwendbar ist. Das Eingabebild wird in den HSL - Farbraum konvertiert. Dann wird die Helligkeitskomponente extrahiert und das Bild mit Hilfe eines Mittelwertfilters der Größe drei geglättet. Im folgenden Schritt wird ein Faltungsfiler mit einer Kernel-Größe von 7×7 zur Schärfung der Kanten der Nadel eingesetzt. Die morphologische Operation „Erosion“ (Größe 5×5 und zwei Iterationen) wird danach verwendet, um die Lichtreflexionen der Nadel zu verringern.

Anschließend kommt ein globaler Schwellwertalgorithmus mit Werten zwischen 0 und 45 zum Einsatz, um die Nadel optisch vom Hintergrund zu

lösen. Ein morphologischer Algorithmus wird dann genutzt, um nichtsignifikant kleine Objekte aus dem binären Bild zu entfernen, welches durch die Schwellwertbildung entstand (Konnektivität: 8 Pixel, 7 Iterationen). Schlussendlich wird ein morphologischer Algorithmus zum Füllen der Löcher im Bild angewendet (Konnektivität: 8 Pixel). Der Algorithmus basiert auf „set dilatation, complementation, and intersection“ (Gonzalez et al. 2009).

Die Begrenzung der Nadel wird durch einen linearen Laplace-Filter mit einem Kernel der Größe 5×5 ermittelt. Dieser Schritt ist erforderlich, um durch die Hough-Transformation akkurate Ergebnisse zu erhalten. Die Hough-Transformation wird genutzt, um Konturen der Nadel auf dem Bild zu detektieren. Die Hough-Transformation gibt Linien aus, welche die lateralen Grenzen der Nadel repräsentieren, in dem sie jeden lateralen Start- und Endpunkt (x, y) miteinander verbindet. Die Endpunkte werden dann genutzt, um den Mittelpunkt der Nadelspitze zu berechnen. Der gewonnene Punkt wird von Pixeln in reale Koordinaten des Mikrosystems transformiert durch Anwendung der folgenden Gleichung:

$$pos_{x,y} = \left(\frac{x, y \times P}{O} \right) [\mu\text{m}] \quad (6)$$

wobei P die Seitenlänge eines Pixels darstellt, in diesem Fall $4,65 \mu\text{m}$, und O die Objektivvergrößerung multipliziert mit der Vergrößerung des Kameraadapters ist. Abbildung 34 zeigt eine Nadel in einem Mikrosystem und die berechneten Koordinaten der Nadelspitze.

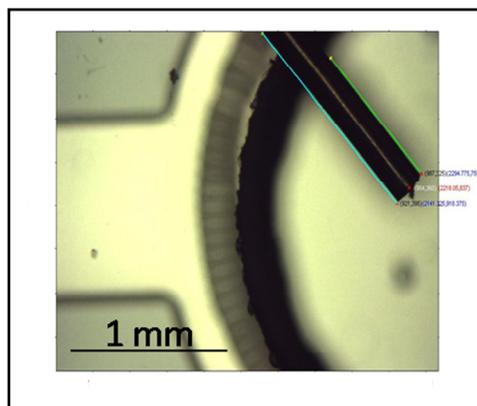


Abbildung 34: Detektierte Nadelspitze mit Koordinaten (Fröber et al. 2009a)



Die Algorithmen zur Bildverbesserung und Kantendetektion wurden in NI-LabView® implementiert und die Hough-Transformation mit Matlab® durchgeführt. Beide Skripte werden über das Hauptprogramm des NI-LabView®-Programmes bedient und ausgeführt.

Erweiterung des Schärfentiefebereiches der Bilder

Betrachtet man ein dreidimensional strukturiertes Biomikrosystem mit einem herkömmlichen Auflichtmikroskop, so ist es nicht möglich, die gesamte Struktur räumlich scharf aufgelöst darzustellen. Dies hängt mit der Limitation des Schärfentiefebereiches zusammen. Für die Beobachtung und Manipulation der Zellen in einem Mikrosystem ist es jedoch erforderlich, einen möglichst großen Bereich scharf darstellen zu können. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Bestimmung der mikroskopischen Schärfentiefe und der Erweiterung dieser mittels Methoden der Bildverarbeitung. Ebenfalls wird die Integration dieser Funktionen in die Observations- und Manipulationseinheit beschrieben.

Berechnung der mikroskopischen Schärfentiefe

Nach DIN 58929-1 definiert man die Schärfentiefe als:

„Axiale Tiefe des Raumes beidseitig der Objektebene, in dem das Objekt ohne nachweisbaren Schärfeverlust bewegt werden kann, während die Positionen von Bildebene und Objekt unverändert bleiben.“

Bereits 1927 leitete Berek aus einer Vielzahl ausgewerteter Versuchsreihen eine Formel für die visuell empfundene Schärfentiefe für ein Mikroskop ab (Berek 1927).

$$T_{VIS} = n \left[\frac{\lambda}{2 \cdot NA^2} + \frac{340 \mu m}{NA \cdot M_{TOTVIS}} \right] \quad (7)$$

Für das zum Einsatz kommende Mikroskop und Objektiv des in dieser Arbeit beschriebenen Gesamtsystems gilt folgendes:

T_{VIS}	visuell empfundene Schärfentiefe
$n = 1,33$	Brechungsindex des Mediums in dem sich das Objekt befindet (Wasser)
$\lambda = 0,589 \mu m$	Wellenlänge des benutzten Lichtes, sichtbares Licht = 589 nm
NA	objektivseitige numerische Apertur (5 x 0,13; 10 x 0,2; 20 x 0,4; 50 x 0,7; 100 x 0,75 im Anwendungsfall)
$M_{TOTVIS} = 5 \cdot 10 = 50$	visuelle Gesamtvergrößerung des Mikroskops

$$T_{VIS} = 1,33 \cdot \left[\frac{0,589 \mu m}{2 \cdot 0,13^2} + \frac{340 \mu m}{0,13 \cdot 50} \right] \quad (8)$$

$$T_{VIS} = 92,75 \text{ mm}$$

Der Schärfentiefebereich für das Objektiv mit 5-facher Vergrößerung mit einer numerischen Apertur von 0,13 beträgt 92,75 μm . Es ist möglich, durch Abblenden (numerische Apertur sinkt) bei kleineren Vergrößerungen die Schärfentiefe zu erhöhen (SPECTARIS 2008).

Eine scharfe Darstellung im Okular (analog) zeigt in der Darstellung auf dem Monitor (digital) unscharfe Ergebnisse. Für die zum Einsatz kommende digitale Bilderfassung des mikroskopischen Bildes gilt laut (SPECTARIS 2008) folgendes:

$$T_{DIG} = n \left[\frac{\lambda}{2 \cdot NA^2} + \frac{p_D}{NA \cdot M_{DIG}} \right] \quad (9)$$

$$p_D = \sqrt{2} \cdot 4,65 \mu m = 6,696 \mu m \quad \text{effektiv wirksame Pixeldiagonale}$$

$$\text{Pixelgröße} = 4,65 \mu m$$

$$M_{DIG} = 2:1 \quad \text{laterale Vergrößerung des Bildes in der Sensorebene}$$

$$T_{DIG} = 1,33 \cdot \left[\frac{0,589 \mu m}{2 \cdot 0,13^2} + \frac{6,696 \mu m}{0,13 \cdot 2} \right] \quad (10)$$

$$T_{DIG} = 57,43 \mu m$$

Zur Beurteilung der Schärfentiefe zieht man das digitale Bild heran, das in Originalgröße (100 %) dargestellt wird. Der Wert für die Höhe des Schärfentiefebereiches sinkt für den digitalen Anwendungsfall mit der CCD-Kamera auf 57,43 μm .

Mit Hilfe von Methoden der digitalen Bildverarbeitung ist es möglich, diesen eingeschränkten Bereich zu erweitern. In den folgenden Abschnitten werden bekannte Verfahren kurz erläutert und die Realisierung für das Gesamtsystem dargestellt.

Stand der Technik zur Erweiterung der Schärfentiefe

Wie bereits dargestellt ergeben sich aufgrund des schmalen Schärfentiefebereiches beim Umgang mit dreidimensional strukturierten Mikrosystemen Probleme bei der Identifikation von Komponenten und der Überwachung der Zustände im Mikrosystem. Nach Häusler (1972) verhalten sich die Auflösung und die Schärfentiefe reziprok zueinander, was mit der Heisenbergschen Unschärferelation zusammenhängt. Das reziproke Verhalten ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass eine höhere räumliche Auflösung

durch Einsatz einer höheren numerischen Apertur unter Verlust der Schärfentiefe hervorgerufen wird.

Eine Lösung für dieses Problem stellen konfokale Mikroskope dar (Widjanarko & Hardie 2002). Sie erfüllen gleichermaßen beide Ansprüche, hohe Auflösung und große Tiefenschärfe, indem unerwünschte optische Effekte durch Brechung des Lichtes in der Nachbarschaft des zu beobachtenden Objektes ausgeschlossen werden. Nachteilig bei konfokalen Mikroskopen ist, dass die Bilderfassung über einen Scan geschehen muss, da jeweils nur ein Punkt scharf dargestellt werden kann. Ebenfalls nachteilig sind Probleme mit der Beleuchtung, die vor allem bei Durchleuchtung und im Anwendungsfall ohne Fluoreszenz auftreten.

Behält man den Aspekt der Verwendung eines herkömmlichen Auflichtmikroskopes bei, kann man nach Widjanarko & Hardie (2002) die Verfahren zur Schärfentieferweiterung in zwei Gruppen einteilen:

1. Verbesserung der Optik durch gerätetechnischen Aufwand, durch Verbesserung der optischen Transferfunktion mit Hilfe einer schattierten/schraffierten oder ringförmigen Apertur

Optische Methoden wie die Verwendung von kranzförmigen Blenden (Welford 1960) oder „Fresnelzonen-Pupillen-Masken“ (Indebetouw & Bai 1980) sind für Mikroskope nicht geeignet, da hier die Vergrößerung der Tiefenschärfen maximal verzehnfacht werden kann (Kaneda et al. 1992)

2. Nachbearbeitung der Bilder.

Die Basis bildet immer ein Bilderstapel mit Bildern verschiedener Fokusebenen. Der jeweils scharfe Bereich jeder Schicht wird ausgewählt und für ein neues Bild (Übersichtsbild) mit erweiterter Schärfentiefe gewählt.

Weitere Details zu den dargelegten Algorithmen sind Tabelle 21 im Anhang unter A6 zu entnehmen.

Kaneda et al. (1992) beschreiben eine Methode der Bildverarbeitung zur Vergrößerung der Tiefenschärfe. Die Erfassung der verschiedenen Fokusebenen in den Bildern erfolgt durch die Bewegung des Mikroskoptisches. Die „In-Fokus-Bereiche“ eines jeden Bildes werden herausgezogen und dienen der Rekonstruktion der dreidimensionalen Objekte mit Hilfe einer Voxel-Struktur. Es entstehen, vom Autor als „pan-focussed“ bezeichnete, stereoskopische Bilder dieser Objekte.

Pieper & Korpel (1983) stellen drei Algorithmen zur Schärfentieferweiterung vor. Der beste basiert darauf, dass der In-Fokus-Bereich durch

hohe räumliche Frequenzen in der räumlichen Ebene gekennzeichnet ist. Problematisch ist die Tatsache, dass der Differential-Operator zur Messung der hohen Frequenzen das Rauschen vergrößert und so kein klares resultierendes Bild entsteht.

Darell & Wohn (1988) beschreiben Laplace- und Gauß-Pyramiden zur Berechnung der Tiefe dreidimensionaler Objekte aus mehreren Aufnahmen.

Zusammenfassend lässt sich aus der Sichtung der Literaturlage sagen, dass verschiedene Algorithmen existieren, die aus einem Bilderstapel, der Bilder mit unterschiedlichen Schärfentiefebereichen enthält, die scharfen Bereiche extrahiert und diese in einem neuen Gesamtbild zusammensetzt. Im Englischen ist das unter dem Begriff „Image Stacking“ bzw. „Extended depth of focus“ bekannt. Dies steht für Bildüberlagerung, „Bilderstapeln“ und Kombination von Schärfeebenen.

Laut Literatur gibt es mehrere Möglichkeiten, dies zu realisieren. Die meisten Algorithmen basieren jedoch auf Filterung, der Fouriertransformation oder sind Wavelet-basiert (siehe Tabelle 21 laut Anhang A5).

Um die hohen Frequenzanteile im Bild hervorzuheben und somit ein Auswahlkriterium für die Fokusebenen im Bild zu erhalten, werden bei allen Algorithmen die Kanten im Bild verstärkt.

Auf Basis dieser Algorithmen kann man ein Bild erzeugen, das alle Fokusebenen enthält. Man sieht auf diese Weise, was im beobachteten Bereich geschieht, verliert jedoch bei einem einfachen Stacking-Algorithmus die 3D-Information.

Komplexere Algorithmen beziehen die bekannten Höheninformationen und Bildaufnahme-parameter mit in die Berechnung ein und errechnen ein quasi räumliches Bild (Darell & Wohn 1988). Für eine weitere Entwicklung der Observationseinheit kann man über eine solche Funktion durchaus nachdenken, denn für die Beobachtung besiedelter drei-dimensionaler Scaffoldstrukturen wäre eine solche Darstellung sinnvoll.

Es existieren sowohl kommerziell als auch frei verfügbare Programme, die das Problem der Fokustiefenerweiterung zufriedenstellend lösen. Jedoch sind diese bisher für die Integration in die Manipulatorsteuer- und Bilderfassungssoftware nicht geeignet. Da diese Funktion in das Gesamtprogramm zur Mikromanipulatorsteuerung und Systemüberwachung integriert werden soll, wurde unter MatLab® ein für die Mikrosystemaufnahmen geeigneter Algorithmus entwickelt.



Die Ausgangssituation für die hier beschriebene technische Realisierung stellt sich wie folgt dar:

- Bilderfassungstrecke, in Abschnitt 4.4.2 beschrieben
- Mikrosysteme enthalten verschiedene Arbeitsebenen:
 - Boden
 - enthaltene Zellen, oder Untersuchungsobjekte
 - Mikrosystemstrukturen
 - Deckel
- Da diese Bereiche in unterschiedlichen Tiefen liegen, kann man sie mit dem herkömmlichen Mikroskop nicht gleichzeitig in einem Bild scharf darstellen.
- Mehrere Einzelbilder mit unterschiedlichen scharfen Bereichen sind erforderlich.

Für die Berechnung eines Bildes mit erweitertem Schärfentiefebereich aus einem Bilderstapel gilt, dass die Fokusedifferenz zweier Bilder maximal der Schärfentiefe des digitalen Bildes entsprechen sollte, sonst kommt es möglicherweise zum Verlust von Bildinformation. Das bedeutet, dass bei einer Kammertiefe von $250\ \mu\text{m}$ mindestens fünf Aufnahmen im Abstand eines Schärfentiefebereiches von $57,4\ \mu\text{m}$ zur Berechnung eines Bildes mit erweitertem Schärfentiefebereich herangezogen werden müssen, um ein möglichst „überall-scharfes“ Bild zu erhalten. Es ist aber abzuwägen, ob dies in der Praxis wirklich erforderlich ist.

Entwickelt wurde der Basis-Algorithmus von Widjanarko & Hardie (2002). Er basiert auf einer Schätzung der lokalen räumlichen Frequenzenergie durch Anwendung eines Hochpassfilters auf das fouriertransformierte Bild. Orientiert an der Vorgehensweise in Widjanarko & Hardie (2002) wurde unter MatLab® ein für die Mikrosystemaufnahmen geeigneter Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt. Geändert wurden die Art der Filterung und die Wichtung der Pixelwerte. Insbesondere die Anpassung der Wichtungsfunktion führte zu erheblich verbesserten Ergebnissen.

Vereinfachter angewendeter Bildverarbeitungsalgorithmus zur Schärfentieferweiterung

- Einlesen der Bilder, welche die relevanten Fokusbereiche enthalten
- Umrechnung der Farbbilder in Grauwertbilder
- Fouriertransformation
- Hochpassfilterung zur Erhöhung des Kontrastes und der Kanten
- Rücktransformation der Fouriertransformation
- Bestimmung der Differenz zu den Nachbarpixeln ausgehend von jedem Pixel
- Differenzen quadrieren zum Ausschluss negativer Werte



- Aufsummieren der Differenzen
- Gewichteten Pixelwert an die Stelle des „Mittelpixels“ schreiben
- Gewichtete Pixelwerte in jedem Bild auf Maximalwert untersuchen
- Das Originalpixel des maximalen Pixelwertes an die Stelle des Originalpixels in das zusammengesetzte Bild schreiben
- Als zweite Variante kann man auch einen ganzen Bereich beliebiger Größe summieren und hier das Maximum bestimmen und anschließend einen ganzen Bereich ersetzen. Diese Variante eignet sich besonders für seichte Übergänge.

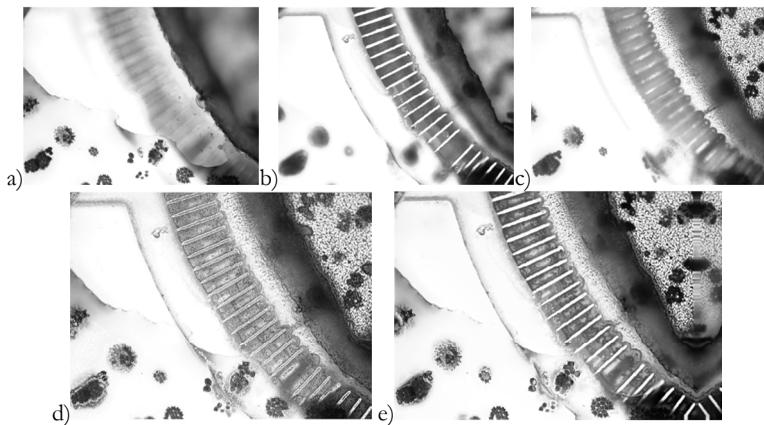


Abbildung 35: Ergebnisse des „Image Stacking“-Algorithmus
 a-c) Bilder in verschiedenen Ebenen des Mikrosystems
 d) neu zusammengesetztes Bild (eigener Algorithmus)
 e) kommerzielle Software Combine ZP

Beispielhaft sei hier ein Mikrosystem gezeigt, in welchem sich Algen befinden. Diese liegen zum einen auf dem Deckel des Mikrosystems (Abbildung 35a) und am Boden des Systems (Abbildung 35c). In der mittleren Ebene (Abbildung 35b) sind die Strukturen des Siliziummikrosystems zu erkennen. Die jeweils scharfen Bereiche der Bilder werden ermittelt und in Abbildung 35d neu zusammengestellt. Dieses Bild vermittelt nun den Eindruck, alle Ebenen des Bildes scharf sehen zu können. Das Ergebnis ist dem der kommerziell verfügbaren Combine ZP - Software (Abbildung 35e) durchaus vergleichbar.

Integration der Schärfentieferweiterung in die Manipulations- und Werkzeugdetektionssoftware als Realisierungsvision

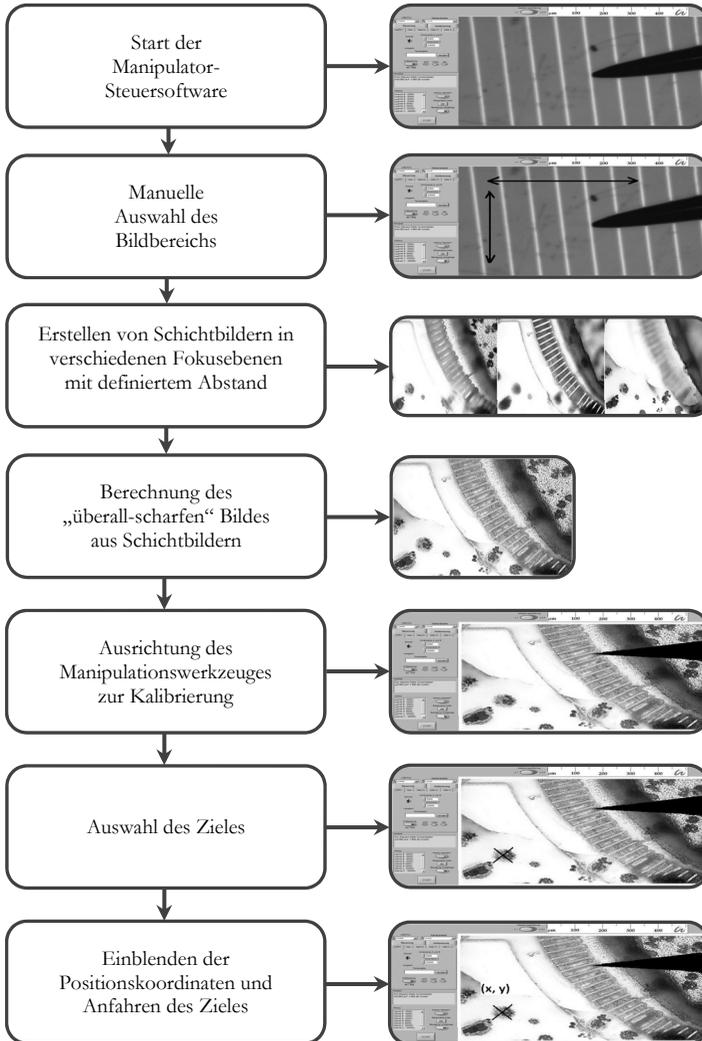


Abbildung 36: Programmablauf der Realisierungsvision

Abbildung 36 zeigt den optimierten Programmablauf ohne den Ablauf der Werkzeugdetektion.

Das Hauptprogramm zur Observation und Manipulation wird gestartet. Der interessierende Bereich des Mikrosystems (Kultivierungskammer mit Zellen, Kanalstrukturen) wird durch den Nutzer ausgewählt. Der Nutzer erstellt drei bis maximal vier Schichtbilder in verschiedenen Tiefenbereichen des Mikrosystems (unten, mittig, oben). Die Einschränkung der Bilderanzahl ist erforderlich, da der realisierte Algorithmus für einen Stapel aus drei Bildern mit 1032 x 778 Pixeln für den derzeitigen Stand der Rechentechnik, zeitintensiv ist. Das Bild, welches die ausgewählten Fokusebenen ineinander vereinigt, wird berechnet („überall-scharfes“ Bild) und dem Nutzer dargestellt. Der Nutzer richtet nun das Werkzeug (Nadel) in der Kammer aus. Die Auswahl des anzusteuernenden Zieles wird anhand des „überall-scharfen“ Bildes auch in der Tiefe vorgenommen. Die gewählten Koordinaten werden an die Software zur Werkzeugdetektion und zur Steuerung des Manipulators übergeben. Die Nadel wird detektiert (siehe Abschnitt 4.4.3) und das Ziel angefahren. Nach Erreichen der Endposition werden die Werkzeugspitzenkoordinaten auf dem „überall-scharfen“ Bild dargestellt.

Dieser Algorithmus liefert Übersichtsbilder des Mikrosystems, die es ermöglichen, die Gesamtsituation einzuschätzen. Man kann diese Gesamtübersichten auch nutzen, um die Höheninformationen zu kodieren. Verschiedene Fokusebenen repräsentieren unterschiedliche Höhenbereiche. Die Werkzeuge des Mikromanipulators können ebenfalls eine Farbe für ihren Aufenthaltsort (Höhe) erhalten. Sugimoto & Ichioka (1985) wenden ein ähnliches, auf Falschfarben basierendes Verfahren für die Höhenkodierung an.

Die Höhe relativ zum Mikrosystem kann über die Bewegung des Mikroskoptisches bestimmt werden. Dieses Verfahren kommt auch bei der Manipulatorsteuerung in z-Richtung zum Einsatz (siehe Abschnitt 4.5.5).

Über eine Farbskala kann dem Nutzer vermittelt werden, in welchem Tiefenbereich er sich befindet und ob größere Hindernisse den Bewegungsspielraum des Manipulators einschränken. Natürlich ist dies eine Methode, die nur eine grobe Abschätzung der realen Verhältnisse zuließe. Für verlässlichere Aussagen müssten folgende Dinge verändert werden:

- Aufnahme der Stapelbilder unter definierten Bedingungen (Abstand der Fokusebenen)
- Größere Anzahl an Bildern/Fokusebenen ermöglicht eine feinere Höhenauflösung
- Berechnung der exakten Höhe, das Erstellen eines 3D-Profiles wird möglich.



Es ließe sich ein großer Aufwand betreiben, um Rauminformationen aus dem Bilderstapel zu ermitteln. Es ist jedoch fraglich, in wie weit dieser Aufwand in dem Nutzer zuträglichen Ergebnissen resultiert und ob eine einfache Farbkodierung ausreichen würde.



4.5 Manipulationseinheit

Die Anforderungen, die seitens der Zellen und der Nutzer an die Manipulation von Zellen gestellt werden, sind vielfältig. Es geht einerseits um Positionieraufgaben und andererseits um Krafteinprägung. Die Positioniergenauigkeiten reichen von wenigen 100 nm bis hin zu Wegen in der Größe der Kultivierungskammer (ca. 3 mm). Des Weiteren muss eine Vielzahl an Manipulationsaufgaben, welche geeigneter Werkzeuge bedürfen, erfüllt werden. Eine Austauschbarkeit der Werkzeuge muss gewährleistet sein. Die Manipulationseinheit muss dementsprechend hohe Anforderungen erfüllen.

Notwendig ist eine aus zwei Manipulatoren bestehende Einheit, welche unter Nutzung der Bildverarbeitung für bestimmte Aufgaben vom Nutzer zu steuern und für andere Aufgaben teilzuautomatisieren ist. Hierfür werden Manipulator und Objekte, wie Zellen, im mikroskopischen Bild identifiziert, lokalisiert und die Positionsparameter werden an die Steuerung übergeben. Aus diesen Informationen werden Trajektorien berechnet und der Manipulator wird auf diesen bewegt. Damit ist es möglich sowohl in 2D, als auch eingeschränkt in 3D Zellen, Scaffolds und auch Teile des technischen Systems zu manipulieren. Herausforderung ist eine Auslegung der Komponenten des Gesamtsystems derart, dass die mechanische Manipulation von Zellen im System möglich ist.

Die im Folgenden dargestellten Entwicklungen und Ergebnisse entstanden in enger Zusammenarbeit mit Studierenden und sind unter anderem in einer Diplomarbeit (Würfel 2008) dokumentiert. Der Aufbau und die Steuerung der Manipulationseinheit werden losgelöst von der Observationseinheit betrachtet und erst im Anschluss an diese Beschreibungen erfolgt die Zusammenführung dieser beiden Komponenten.

4.5.1 Charakteristika der technischen Komponenten

Gerätetechnik

Die Anforderungen an die Manipulationsaufgabe erfüllen zwei piezogetriebene Mikro-manipulatoren (Typ MM3A_LS) der Kleindiek® Nanotechnik GmbH (Reutlingen, Germany). Die Abkürzung „MM3A LS“ steht für „Mikromanipulator mit drei Achsen für Anwendungen im Bereich den Lebenswissenschaften (Life Sciences)“. Über eine Halterung können verschiedene angepasste Endeffektoren und Werkzeuge an dem Manipulator angebracht werden.

Tabelle 10 zeigt die Herstellerangaben der technischen Daten. Es wird deutlich, dass die Auflösung der Mikromanipulatoren für Positionieraufgaben

im Nanometerbereich ausreichend ist. Es können damit sehr kleine Stellwege erzielt werden.

Tabelle 10: Technische Daten des MM3A_LS (Kleindiek Nanotechnik® GmbH 2006)

Parameter	Größenordnung
Auflösung A (horizontal)	10^{-7} rad (5 nm)
Auflösung B (vertikal)	10^{-7} rad (3,5 nm)
Auflösung C (linear)	0,25 nm
Fine – Bereich A	20 μm
Fine - Bereich B	15 μm
Fine - Bereich C	1 μm
Geschwindigkeit A, B	10 mm/s
Geschwindigkeit C	2 mm/s

Zur Befestigung der Manipulatoren und des Mikrosystems auf dem Tisch des Mikroskops ist eine magnetische Verbindung vorgesehen, so dass der Manipulator auf ferromagnetischen Flächen befestigt werden kann. Als Basisplatte dient der Mikroskoptisch. Der Tisch ist über einen per Computer steuerbaren Schrittmotor höhenverstellbar. Der Mikromanipulator ist mit einer Achsensteuerung versehen, welche es erlaubt, die einzelnen Achsen unabhängig voneinander zu bewegen. Zur manuellen Steuerung existiert eine Steuersoftware, die Steuerbefehle über die RS232-Schnittstelle überträgt.

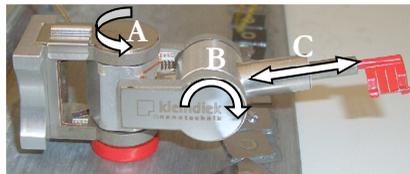


Abbildung 37: Seitenansicht des Kleindiek® Manipulators mit Darstellung der Bewegungsachsen, A - rotatorisch, B - rotatorisch, C – translatorisch (Fröber et al. 2009a)

Mechanik

Jeder Manipulator hat einen Freiheitsgrad von 3. Es existieren zwei rotatorische Achsen (A, B) und eine translatorische Achse (C) zur dreidimensionalen Manipulation (Abbildung 37). Tabelle 11 zeigt die Freiheiten und Bewegungsbereiche der Manipulatoren.

Tabelle 11: Freiheiten und Bewegungsbereiche des Manipulators (Kleindiek Nanotechnik GmbH 2006) mit dem Freiheitsgrad DOF = 3

	A-Achse	B-Achse	C-Achse
Freiheit	rotatorisch	rotatorisch	translatorisch
Bewegungsbereich	$\varphi = -120^\circ \dots +120^\circ$	$\vartheta = -120^\circ \dots +120^\circ$	R = 0...12 mm

Zwei Prinzipien, die auf dem inversen piezoelektrischen Effekt basieren, werden genutzt, um die Mikromanipulatoren zu aktuieren. So ergeben sich zwei Modi, welche jeweils unterschiedliche Schrittweiten des Manipulators realisieren („fine“ und „coarse“).

1. Auflösung der Schritte im Nanometerbereich („fine“)

Kleine Bewegungen (0,25 nm Schrittweite für die lineare Achse, 5 nm Schrittweite für die rotatorischen Achse) werden durch den inversen piezoelektrischen Effekt realisiert. Aufgrund der kleinen Winkel kann die Rotation als Translation angenähert werden. Im Abschnitt „Regelung der Planarbewegungen in der XY-Ebene“ wird darauf näher eingegangen.

2. Auflösung der Schritte im Mikrometerbereich („coarse“)

Für „große“ Bewegungen nutzt man den Stick - Slip - Effekt. Bei diesem auch als Haftgleiten bezeichnetem Effekt haften und gleiten die gegeneinander bewegten piezoelektrischen Elemente abwechselnd, was zu einer Schrittbewegung führt. Maßgebend für die Größe der inkrementellen Schritte ist die Last, die vom Manipulator zu befördern ist. Bei den vorliegenden Manipulatoren liegt die Schrittweite in der Größenordnung von 0,85 μm . Stößt der Endeffektor (oder ein anderes Element der Kinematik) gegen ein Hindernis, kommt es durch die Funktionsweise analog einer Rutschkupplung zu einem Schutz vor Überlastung. Dieses Bewegungsverfahren hat jedoch den Nachteil, dass es aufgrund der ständigen Reibung zwischen den Bauteilen zu Verschleißerscheinungen kommt.

Aufgrund der geplanten Anwendung als Zellmanipulator werden die kleinsten Schrittweiten nicht benötigt, so dass der dafür auf der Steuerbox vorgesehene Speicherplatz für den feinsten Modus für einen modifizierten Modus genutzt

werden kann. Damit kann die dem Piezoantrieb eigene Asymmetrie korrigiert werden, indem die Spannungsamplitude für die Piezoelemente angepasst wird.

Die Befehlseingabe und somit die Steuerung durch den Nutzer kann über Drehknöpfe am Steuermodul, über eine angeschlossene Tastatur oder über ein Gamepad erfolgen. Die Übertragung der Daten geschieht dabei über eine RS232-Schnittstelle an der Rückseite der Steuerbox. Das ist auch die limitierende Stelle für die Geschwindigkeit der Steuerung. Die Programmierumgebung für die Steuerungsalgorithmen ist NI-LabView®.

Die serielle kinematische Kette des Manipulators ermöglicht eine einfache Berechnung der Kinematik des Roboterarms. Mit Hilfe der inversen Kinematik werden die Achskoordinaten aus den raumfesten Koordinaten berechnet. Achskoordinaten sind: Radius (r), Gierwinkel (φ), Nickwinkel (ϑ) und ein Längen-Korrekturfaktor für die verschiedenen zum Einsatz kommenden Endeffektoren. Die Geometrie des Arbeitsraumes gleicht einem unvollständigen abgeflachten Ellipsoid. Sie ist in Abbildung 38 dargestellt.

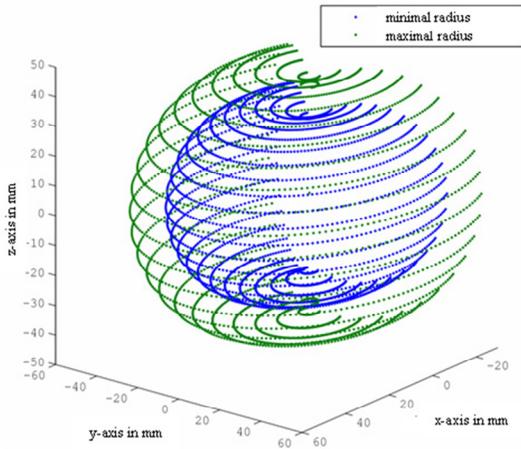


Abbildung 38: Darstellung des minimalen und maximalen Arbeitsraumes des Mikromanipulators Kleindiek® (ohne Endeffektor) (Fröber et al. 2009a)

Dynamik

Die maximal durch den Manipulator bewegbare Masse als Last wird durch die Kleindiek® Nanotechnik GmbH mit 5 g angegeben, dies entspräche einer Gewichtskraft von $F_G = 50 \text{ mN}$. Unter Beachtung der Tatsache, dass die Lasten über den variablen Hebelarm der C-Achse (Abbildung 39) auf die rotatorische B-Achse eingekoppelt werden, ist das keine allgemein gültige Aussage.

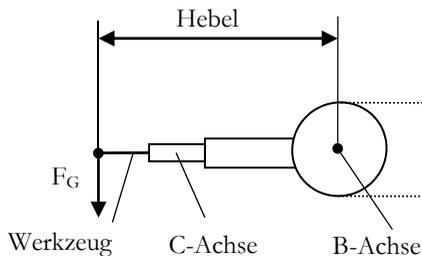


Abbildung 39: Veränderliches Moment, hervorgerufen aufgrund der veränderlichen Länge der translatorischen Achse C (Würfel 2008)

Im Experiment wurde die Dynamik untersucht, um die Größenordnung der realen Leistungsgrenzen der Manipulatoren abzuschätzen. Diese beinhalteten die Vorwärts- und Rückwärtsbewegungen aller Achsen des Manipulators. Konkrete Angaben zur Versuchsdurchführung sind in Würfel (2008) hinterlegt. Die in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse der Versuche legen Leistungsunterschiede zwischen den beiden Manipulatoren offen. Ein Unterschied tritt vor allem in der B-Achse auf. Dieser deutet auf bereits manifesten Verschleiß hin bzw. könnte an Fertigungstoleranzen liegen. Eine genaue Ursache der Abweichungen konnte nicht festgestellt werden.



Tabelle 12: Maximale Antriebskräfte und -momente der Manipulatoren (Würfel 2008)

Achse	Richtung	Manipulator 1	Manipulator 2
A	links	3,67 mNm	3,51 mNm
	rechts	2,68 mNm	2,19 mNm
B	aufwärts	3,82 mNm	1,45 mNm
	abwärts	4,99 mNm	4,10 mNm
C	vorwärts	0,62 N	0,82 N
	rückwärts	0,81 N	0,81 N

Die Umrechnung der angegebenen Drehmomente unter Annahme einer effektiven Hebellänge von 60 mm für die A-Achse ergeben Kräfte in der Größenordnung von

$$F_A = \frac{M}{r} \approx \frac{3 \text{ mNm}}{60 \text{ mm}} \approx 50 \text{ mN} \quad (11)$$

Für die Nickbewegung der B-Achse gilt analog:

$$F_B = \frac{M}{r} \approx \frac{5 \text{ mNm}}{42 \text{ mm}} \approx 119 \text{ mN} \quad (12)$$

Der Manipulator ist so montiert, dass die Gewichtskraft der Last nicht auf den Antrieb der Achse A wirkt. Der limitierende Parameter für den experimentellen Aufbau ist somit die maximale Antriebskraft F_B .

Die aus dieser maximal kompensierbaren Gewichtskraft ermittelte Belastung von ca. 12 g liegt deutlich über den Angaben des Herstellers für den entsprechenden Hebelarm. Die Schub- und Zugkräfte von 0,82 N, welche die C-Achse in der maximalen Betriebsstufe aufbringt, entsprechen umgerechnet einer zu haltenden Masse im Schwerfeld von mehr als 80 g. Ein mit vier Schlauchadaptern ausgestattetes Standard-Mikrosystem wiegt befüllt ca. 1 g. Diese Ergebnisse der Experimente ergeben, dass die Kräfte für Manipulationsaufgaben ausreichen werden. Es ist aber auch offensichtlich, dass mit Hilfe der Manipulatoren z. B. ein Verschieben des gesamten Mikrosystems möglich wäre. Daher muss dafür gesorgt werden, dass das Mikrosystem gegen ein solches Verschieben gesichert wird.

Positionierverhalten

Die Experimente zeigen weiterhin, dass neben den Antriebsmomenten und -kräften auch die Positionierunsicherheiten innerhalb eines Manipulators schwanken. Die Eigenschaften des Mikromanipulators werden im Wesentlichen durch die Zuverlässigkeit bei der Positionierung, ferner die Wiederholgenauigkeiten bei der Abarbeitung vorgegebener Wege und die daraus abzuleitende Unsicherheiten bestimmt. Der Begriff „Messunsicherheit“ ist nach DIN 1319-3 für die Messtechnik definiert. Auf diesen wird jedoch nicht Bezug genommen, sondern es erfolgt eine zweckgebundene Neudefinition derart, dass die Ermittlung der Standardabweichung der Messreihen Informationen über die Zuverlässigkeit der Mikromanipulatoren liefert. Tabelle 13 zeigt die Zusammenfassung der Messergebnisse.

Tabelle 13: Experimentell ermittelte Positioniereigenschaften der Manipulatoren (Würfel 2008)

Achse	Richtung (Schritte)	relative Standardabweichung in %		arithmetischer Mittelwert	
		Manip. 1	Manip. 2	Manip. 1	Manip. 2
A	links (100)	1,78	1,59	-1045,0 μm	-1314,0 μm
	rechts (-100)	2,37	1,86	1050,0 μm	940,0 μm
B	aufwärts (-100)	1,40	3,08	909,5 μm	785,5 μm
	abwärts (100)	1,58	1,64	-1166,5 μm	-1079,0 μm
C	vorwärts (-1000)	0,46	0,43	850,5 μm	831,4 μm
	rückwärts (1000)	0,83	0,00	-861,0 μm	-830,0 μm

Die C-Achse sollte unter Bewegung beurteilt werden. Die festgestellte Standardabweichung mit Werten zwischen 0 % und 3 % bedeutet bei einer Positionsvorgabe von 1 mm eine maximale Abweichung von 30 μm .

Die Spalten des arithmetischen Mittelwertes der Tabelle 13 enthalten die gemittelten Streckenlängen für das Zurücklegen einer definierten Schrittzahl. Mit Hilfe dieser Werte kann man die durchschnittliche Länge eines inkrementalen Schrittes berechnen. Für einen Schritt der C-Achse berechnet sich ein Wert von 0,83 μm . Für die Achsen A und B variieren diese Schrittlängen in Abhängigkeit von der Länge des Werkzeuges und der aktuellen Position der C-Achse, können jedoch aufgrund der geringen

Gesamtlänge mit ca. 10 μm angegeben werden. Wählt man einen kleineren Betriebsmodus können diese Schrittweiten auf 1,6 μm bis 3,2 μm verkürzt werden.

Zusammenfassung der relevanten technischen Eigenschaften

Die Eigenschaften der Positionierung des Manipulators wurden ermittelt und gegenüber-gestellt. Das betrifft die Auflösung der Schritte sowie deren relative Standardabweichung. Es wurde ein zeitliches Driftverhalten der Schrittweiten und eine asymmetrische Verteilung der Schrittweiten festgestellt. Die transversale Achse C arbeitet besonders gut reproduzierbar. Ein Driftverhalten oder eine Asymmetrie wurden nicht beziehungsweise nur in äußerst geringem Maße festgestellt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Schrittauflösung im „coarse“-Modus für alle drei Achsen ausreichend ist, um eine Manipulation im Mikrometerbereich durchzuführen. Jedoch sollten vor einer geplanten Verwendung der Manipulatoren die bekannten Schwierigkeiten in Betracht gezogen werden und ein Einfluss auf die auszuführende Aufgabe ausgeschlossen werden.

Diskussion in Bezug auf die Positionierung

Die Betrachtung der Mittelwerte und der Standardabweichungen der Schrittlänge führt zu der Schlussfolgerung, dass das Schrittverhalten für die Vorwärts- und Rückwärtsbewegung genau wie die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Größenordnungen der Drehmomente ein asymmetrisches Verhalten aufweisen. Um Fehlpositionierungen insbesondere für den Manipulator zwei zu vermeiden, muss berücksichtigt werden, dass die Schritte im Uhrzeigersinn kleiner sind als jene, die gegen den Uhrzeigersinn verlaufen. Dieser Effekt muss bei gegenläufigen Bewegungen Berücksichtigung finden. Eine Regelung der Position kann eine solche variable Schrittweite kompensieren, setzt aber eine Messung der Position voraus.

Die durchgeführten Messungen weisen auf ein zeitliches Driftverhalten für die Achsen A und B hin, welches die Messwerte signifikant beeinflusst. Für die C-Achse ist ein solches Verhalten nicht feststellbar.



4.5.2 Steuerung

Eine Erfassung der Relativposition zwischen dem Werkzeug des Mikromanipulators und dem BioMEMS ist notwendig. Als Sensorsystem steht das Mikroskop mit einer Kamera zur Verfügung. Die Gewinnung der für die Steuerung notwendigen Parameter erfolgt optisch über eine Auswertung der Mikroskopbilder.



Abbildung 40: „Ortsfeste“ Konfiguration der CCD-Kamera und des Manipulators am Mikroskop

Daraus ergibt sich eine ortsfeste Konfiguration: die Kameraperspektive ändert sich nicht mit der Änderung des Endeffektors. Bei dieser Anordnung ist es wichtig, dass sowohl der Endeffektor als auch das zu greifende Objekt im Kamerabild bleiben (Kwon 2001). Abbildung 40 zeigt die Umsetzung dieses Prinzips für einen Mikromanipulator auf dem Tisch des Mikroskops und die dazugehörige CCD-Kamera.

Regelung der Planarbewegungen in der XY-Ebene

Die Umsetzung eines Standardregelkreises bedingt den Aufbau wie in Abbildung 41 dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass die Regelgröße p mit der Kamera als sensorisches Element erfasst werden muss.



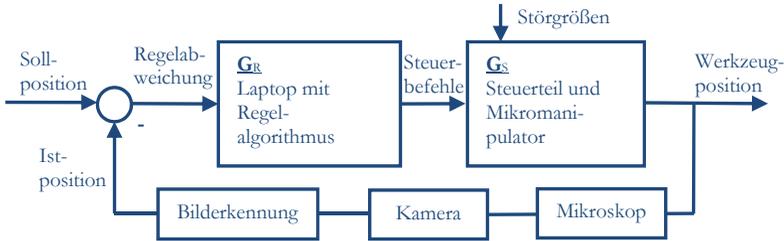


Abbildung 41: Spezifizierter Regelkreis nach (Würfel 2008)

Unter den Störgrößen werden alle nicht-deterministischen Einflüsse auf das Positionierungsverhalten zusammengefasst. Dazu zählt zum Beispiel das in Untersuchungen entdeckte Kriechverhalten der Manipulatoren. Aus der Regelabweichung wird mit Hilfe des Reglers G_R die Stellgröße bestimmt und in Steuersignale für den Manipulator umgewandelt. Diese Signale enthalten die notwendigen Schrittwerte für die einzelnen Achsen.

Das Besondere der Regelung ist, dass die einzelnen Achsen nicht synchron angesteuert werden können. Die Positionierung der einzelnen Achsen erfolgt sequenziell. Aufgrund dieser Befehlsverarbeitung der Steuerungseinheit des Mikromanipulators ist eine kontinuierliche Regelung nicht realisierbar. Befehle werden seriell nacheinander abgearbeitet. Daher ist eine zeitdiskrete Regelung erforderlich. Eine Regelung der Geschwindigkeit, insbesondere für Abbremsvorgänge kurz vor dem Erreichen eines Zieles, ist nicht möglich.

Es wurde eine Punkt-zu-Punkt-Regelung implementiert. Ausgangsschritt jedes Regelvorganges ist die Detektion der Spitze des Endeffektors. Dies ist mittels Bilderkennungssoftware oder per Mausclick durch den Nutzer in der grafischen Oberfläche möglich. Die Zielkoordinaten können per Mausclick im Bild festgelegt werden. Danach erfolgt die Berechnung der erforderlichen Bewegung zum Erreichen des Objektes mit der Spitze des Endeffektors. Abbildung 42 zeigt einige regelungstechnisch relevante Größen.

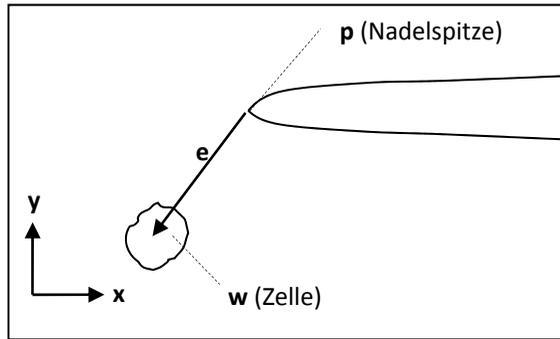


Abbildung 42: Veranschaulichung der regelungstechnisch relevanten Größen p , w und e (Wüffel 2008)

Zu sehen ist hier die schemenhafte Darstellung eines Kamerabildes mit Nadel und Zelle. Die Nadelspitze (Ortsvektor p) soll zum Ziel, z.B. eine Zelle (Ortsvektor w), bewegt werden. Regeldifferenz der beiden Größen ist folglich der Vektor e .

Mit Hilfe der Gleichungen der direkten Kinematik des Mikromanipulators ist es möglich, die Positionskordinaten der Spitzen des Endeffektors zu bestimmen. Dies setzt die exakte Kenntnis der Achskoordinaten voraus. Ein Problem bei der praktischen Umsetzung ist allerdings, dass der Vorschub der Achsen nicht deterministisch ist und die Achskoordinaten nicht messbar sind. Weiterhin müsste eine solche Berechnungsvorschrift für jedes spezielle Werkzeug neu angepasst werden, da diese in der Regel andere Eigenschaften hinsichtlich Form und Steifigkeit besitzen. Hinzu kommt, dass Verformungen am Werkzeug auftreten könnten.

Die Messung der Position der Nadel erfolgt an der Spitze. Eine einzelne Kamera erzeugt ein zweidimensionales Bild, aus dem die Position in der XY-Ebene errechnet wird. Diese zweidimensionale Betrachtung (XY-Ebene) lässt eine Vereinfachung auf Polarkoordinaten zu. Die in Richtung der Z-Achse auftretenden Bewegungen werden nicht berücksichtigt. Es ist darauf zu achten, dass für derartige Annahmen die B-Achse horizontal steht und in die Bewegung nicht mit einbezogen wird. Andernfalls würde eine Vorschubbewegung der C-Achse Auswirkungen auf die Position der Nadelspitze in Z-Richtung haben (kinematisches Übersprechen).

Die kartesischen Koordinaten des Kamerabildes werden in das Polarkoordinatensystem des Manipulators transformiert. Da die im Sichtfeld ausgeführten rotatorischen Bewegungen des Manipulators sehr klein sind, wird eine Linearisierung der Bewegung vorgenommen. Die Fehlerabschätzung für

die Linearisierung ergibt einen Wert von $\leq 1.5\%$. Dies ist in Anbetracht der Messungenauigkeit des optischen Messverfahrens zur Bestimmung der Position zu vernachlässigen.

Kalibrierung der Positionierung in der XY-Ebene

Bei einer Kalibrierung erfolgt kein technischer Eingriff am Messgerät, sondern eine Korrektur der Skala (siehe DIN 1319). Die Kalibrierung ist das Ermitteln des Zusammenhangs zwischen Messwert oder Erwartungswert der Ausgangsgröße und dem zugehörigen wahren oder richtigen Wert der als Eingangsgröße vorliegenden Messgröße für eine betrachtete Messeinrichtung bei vorgegebenen Bedingungen. Für die Kalibrierung des Messsystems des Manipulators stellt dies die Ermittlung des mathematischen Zusammenhangs zwischen der Position des Mikromanipulators und den Pixeln des Kamerabildes dar.

Es erfolgt eine Abbildung der Achsen A und C auf die Koordinaten x und y. Die Befehle für die Achsenbewegung werden immer von der aktuellen Achsenposition aus durchgeführt. Es handelt sich somit bei den Schrittgrößen um Relativkoordinaten. Gleiches gilt auch für Δx und Δy , da diese stets als Differenz zwischen Zielvorgabe und der Position der Nadel berechnet werden. Wie bekannt, kann eine Transformation kartesischer Koordinaten unter Nutzung einer Rotationsmatrix durchgeführt werden (Bronstein et al. 2008, S. 354). Mit Hilfe der ermittelten Bewegungskoeffizienten für die jeweils aktiven Achsen A oder C wird es möglich, eine schrittweise Kalibrierung der Nadelposition durchzuführen. Die Funktion der Kalibrierung wurde in die Software integriert. Für die Kalibrierung der Manipulatoren in der XY-Ebene kann dies folgendermaßen angewendet werden:

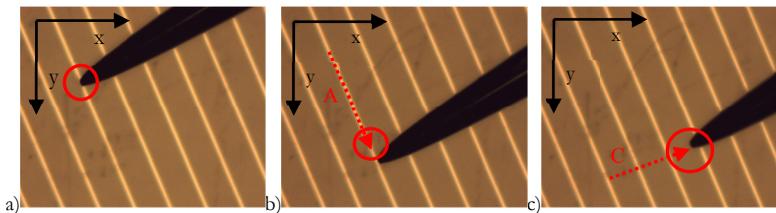


Abbildung 43: Kalibriervorgang in der XY-Ebene (Würfel 2008)

- a) Klick auf die Nadelposition
- b) definierte rotatorische Bewegung der Achse A, erneuter Klick auf Nadelspitze
- c) definierte translatorische Bewegung der Achse C, erneuter Klick auf Nadelspitze

Durch Markieren der Position der Nadelspitze, die anschließende Ausführung einer festgelegten Schrittzahl n und der erneuten Bestimmung der Position der Nadelspitze werden die Bewegungskoeffizienten zuerst für die A-Achse und danach für die C-Achse bestimmt und somit die Manipulatoren kalibriert.

Tiefenkontrolle (Z-Achse)

Wie in Abschnitt 2.2.5. dargelegt, kann die Steuerung in der Richtung der Z-Achse (vertikal zur Bildebene) mittels verschiedener Verfahren realisiert werden. Für Systeme, wie das hier beschriebene, ist das entscheidende Kriterium, den gerätetechnischen Aufwand in Form von Zusatzkomponenten zu minimieren. Lösungen wie ein weiteres optisches Messverfahren, wie die Triangulation mittels eines Lasers oder der Einsatz einer zweiten Kamera, werden dadurch ausgeschlossen.

Die im Folgenden beschriebene Variante nutzt die Möglichkeit des motorisierten Tisches, das Mikrosystem und den Manipulator relativ zur Fokusebene des Mikroskops zu verschieben. Wird die Fokusebene über oder unter die Nadel verlagert, wird das Bild des Werkzeuges unscharf. Es existiert ein Zusammenhang zwischen dem Fokus und der Höhe des Mikroskoptisches. Dieser Tisch kann sowohl manuell als auch über einen Zwei-Phasen-Hybrid-Schrittmotor vom Typ ZSS 19 (Phytron-Elektronik GmbH, Gröbenzell, Germany) bewegt werden, so dass die Spitze des Endeffektors immer in der Fokusebene bleibt. Ein Schritt des Motors entspricht einer vertikalen Bewegung des Mikroskoptisches von $0,98 \mu\text{m}$.

Kalibrierung des Positionierverhaltens der Z-Achse

Zu Beginn muss die Nadel manuell in den Fokus gebracht werden (Abbildung 44(a)). Bewegt sich der Endeffektor nach oben aus der Fokusebene heraus (b), führt die Abwärtsbewegung des Mikroskoptisches dazu, dass sich die Nadel wieder im Fokus befindet (c). Unter Nutzung einer festgelegten Anzahl an Schritten des Manipulators und der abgezählten Schritte des Motors ist es möglich, einen Quotienten zu bestimmen, mit dessen Hilfe die Dimensionen ineinander umgerechnet werden können.



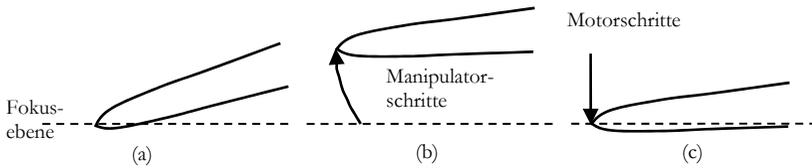


Abbildung 44: Kalibrierung der Z-Achse (Würfel 2008)

a) Nadel in der Fokusebene

b) Bewegung des Manipulators aus der Fokusebene heraus

c) Bewegung des Mikroskopisches mittels Schrittmotor zurück in die Fokusebene

4.5.3 Nutzerschnittstelle

In der Software NI-LabView® ist eine Nutzerschnittstelle implementiert, welche die Einstellung aller erforderlichen Steuerungsparameter und Betriebsmodi ermöglicht.

Folgende Grundfunktionen sind in der Software realisiert:

- Koordinatentransformation (Zylinderkoordinaten - kartesische Koordinaten)
- Maus- und Tastatursteuerung mit und ohne visuelle Kontrolle
- Kalibrierung (Erstellen einer Maßverkörperung)
- Anfahren von Positionen innerhalb des Mikrosystems in allen drei Raumrichtungen
- Einfache Bahnsteuerung
- Einlernen von Bewegungsabläufen
- Abfahren von Wegstrecken im „Zick-zack“-Modus

Bemerkung: Auf eine detaillierte Beschreibung der Funktionen und des Aufbaus der Steuerungssoftware wird verzichtet, da diese für das Verständnis der Thematik nicht erforderlich ist.

4.5.4 Werkzeuge

Das eigentliche Werkzeug wird in der Robotik auch als Endeffektor bezeichnet. Er entspricht dem letzten Element in der kinematischen Kette. Übertragen auf die menschliche Physiologie käme dies der Hand am Ende des Arms gleich (Würfel 2008).

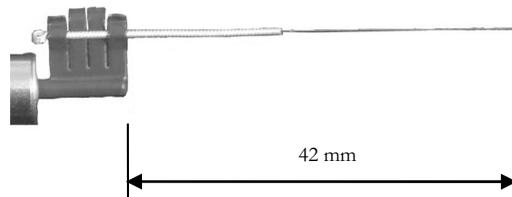


Abbildung 45: Werkzeughalter des MM3A-LS (Kleindiek®) mit Nadel (Würfel 2008)

Die einsetzbaren Werkzeuge sind, wie zuvor bereits erwähnt, sehr vielfältig. Bei ersten Tests der Manipulatoren wurden Kanülen und Nadeln verwendet. Abwandlungen dieser Instrumente wurden genutzt, um weitere Werkzeuge zu erhalten, so wurden zum Beispiel Nadeln und Kanülen begradigt oder zu Schlingen geformt.

Der in Volland et al. (2007) vorgestellte siliziumbasierte Mikrogreifer wurde am Mikromanipulator befestigt und in das Mikrosystem eingeführt (Abbildung 46).

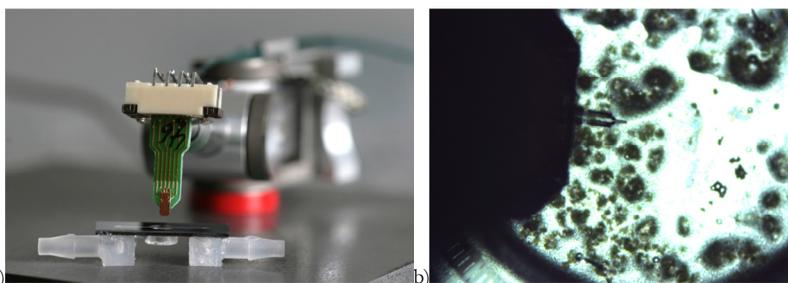


Abbildung 46: Mikrogreifer der Arbeitsgruppe Rangelow (TU Ilmenau) als Endeffektor des Mikromanipulators

- a) über geöffneter Zellokulturkammer des Mikrosystems (Bild Danja Voges)
- b) Mikrogreifer in mit Algen besiedeltem Mikrosystem

4.5.5 Steuerung der Manipulationseinheit auf Basis der Bildverarbeitung

Nach erfolgter Implementierung der Algorithmen zur Detektion des Endeffektors und zur Steuerung des Manipulators werden diese für eine automatisierte Steuerung zum Austausch von Koordinaten und Parametern miteinander gekoppelt. Zwischen der Steuerung der Manipulatoren, der Bilderfassung und der Erkennung von Steuerungsparametern wird eine Schnittstelle implementiert. Im Abschnitt 4.4.1 des Kapitels „Optische Beobachtungsseinheit“ wurde auf diese Verbindung bereits Bezug genommen. Der folgende Abschnitt soll erläutern, wie der Informationsaustausch zwischen den beiden Softwaremodulen erfolgt.

Abbildung 47 gibt eine Übersicht über die Struktur der Observations- und Manipulationseinheit. Sie besteht im Wesentlichen aus den bereits vorgestellten Komponenten.

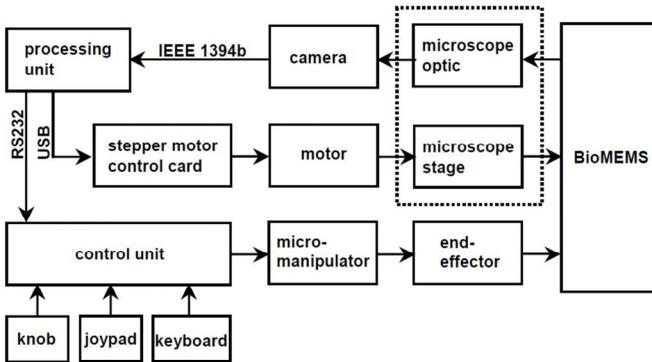


Abbildung 47: Komponenten der Observations- und Manipulationseinheit (Fröber et al. 2009a)

Basis für die Verknüpfung der Teilfunktionen ist die erfolgreiche Bestimmung der Position des Endeffektors in der Kulturkammer. Die errechneten Positionskoordinaten der Spitze des Endeffektors (kartesisch x , y , siehe Formel 6) werden an die Steuersoftware übergeben.

Anhand der Ist-Position und der Soll-Position berechnet der Steueralgorithmus die Befehle für die Steuerung des Manipulators. Der Endeffektor wird mittels Manipulator über die errechnete Bahn in Richtung des markierten Zieles bewegt. Durch die implementierte Regelung wird ein iteratives Annähern an die Soll-Position erreicht.

Als Abbruchkriterium wird ein Toleranzbereich von 15 Pixeln (an die jeweilige Applikation anpassbar) um die Sollposition festgelegt. Befindet sich die Nadelspitze innerhalb dieses Toleranzbereiches, stoppt der Prozess. Wurde der Positionierbereich nicht erreicht, wird der Prozess wiederholt und eine neue Route errechnet.

Diese Lösung erlaubt, verschiedene Ziele auf dem mit der Mikroskopkamera erfassten Bild anzusteuern. Die Steuerung in der dritten Dimension ist noch nicht automatisiert. Mit den in Abschnitt 4.4.3 gemachten Vorschlägen, den Fokusscan dafür zu nutzen, ließe sich dies jedoch realisieren.

Ist die in Abschnitt 4.4.3 vorgestellte Detektion der im System befindlichen Zellen erfolgreich und können so auch Auswahlprozesse für bestimmte Zellen automatisiert werden, kann selbst die Zielauswahl automatisiert erfolgen. Damit ist es möglich Objekte, vollautomatisiert auszuwählen, anzufahren und sie zum Beispiel zu Analysezwecken zu manipulieren.

Hinsichtlich eines erhöhten Automatisierungsgrades ist darüber nachzudenken, die Kalibrierung der Positionierung in den Koordinatenachsen (x , y , z) ebenfalls über die Bildverarbeitung durchzuführen, um so komplett nutzerunabhängig zu arbeiten.

4.5.6 Experimente zur Mikromanipulation

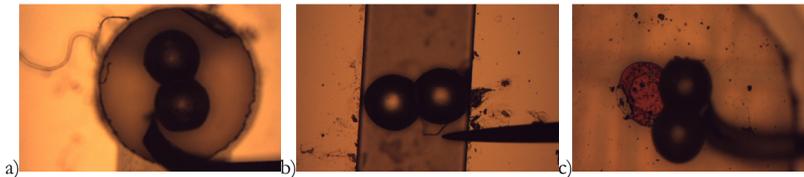


Abbildung 48: Manipulation von Glasobjekten im Mikrosystem

- a) Drehen
- b) Transportieren
- c) Platzen

Um die Funktionalität der Manipulatorsteuerung zu überprüfen wurden Experimente durchgeführt. Einfache Transport- und Manipulationsaufgaben in trockenen Systemen konnten durchgeführt werden, wie in Abbildung 48 dargestellt. Testobjekte aus Glas in der Größe von Zellsphäroiden ($200\ \mu\text{m}$) wurden in der Kanalstruktur eines offenen Mikrosystems bewegt. Es war möglich, das Glasobjekt mit unterschiedlichen Werkzeugen zu drehen (Abbildung 48a), es über eine längere Strecke zu transportieren (Abbildung 48b) und auf einem ausgewählten Punkt zu platzieren (Abbildung 48c).

Genauigkeits- und Reproduzierbarkeitsuntersuchungen zeigten, dass bei der Objekterkennung noch großes Verbesserungspotential zum hier beschriebenen Arbeitsstand existiert. Die automatisierte Steuerung funktioniert innerhalb weniger Sekunden und ist stabil. Es zeigt sich, dass es notwendig ist, die Beleuchtung und den Hintergrund in der interessierenden Region optimal für die Bildverarbeitung einzustellen (hoher Kontrast, gleichmäßige Flächen). Gleiche Versuche mit gefüllten Systemen führten nur bedingt zu den gewünschten Ergebnissen, da durch den leicht variierenden Flüssigkeitsspiegel auch die Ausleuchtungsbedingungen stark variieren. So kam es häufiger zu Fehldetektionen der Nadelspitzen.

4.6 Biokompatibilität

Alle verwendeten Komponenten wurden im Rahmen von umfangreichen Versuchsreihen auf ihre Biokompatibilität getestet (Fischer et. al. 2010). Im Wesentlichen wurden untersucht:

- Silizium,
- Pyrex-Glas,
- Polypropylen-Adapter und
- Tygon-Schläuche.

Die für die Tests verwendeten Zelllinien MC3T3-E1 und primäre humane Osteoblasten zeigten im Kontakt mit Proben dieser Materialien keine sichtbaren Beeinflussungen im Wachstum. Es wurden sowohl Einzelkomponenten als auch komplette Mikrosysteme mit Schläuchen getestet. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte keine Abweichung festgestellt werden.

Als problematisch im Hinblick auf die Biokompatibilität erwiesen sich hingegen die Prozesse, so musste eine geeignete Besiedelungs- und Integrationsmethode für die Zellkultur erst entwickelt werden. Diese wurde in Abschnitt 4.2.4. erläutert.

Auf weiterführende Erläuterungen zur Thematik der Biokompatibilität sei auf die Veröffentlichung von (Schilling et al. 2010) verwiesen.



4.7 Reinigung und Sterilisation

Für die in der Arbeit verwendeten Mikrosysteme und peripheren Komponenten können auf Grund der zum Einsatz kommenden Materialien folgende Verfahren zur Reinigung, Präparation und Sterilisation eingesetzt werden:

- Spülen mit destilliertem Wasser zur Grobreinigung und Entfernung von Restpartikeln,
- Einlegen in/Spülen mit 90 %-igem Ethanol,
- Autoklavieren und
- Plasmasterilisation.

Andere bekannte Methoden, wie das Abflammen, sind nicht geeignet, da die Polymerstrukturen (Luer-Adapter, Schlauchkomponenten, Pumpenventile) hitze-empfindlich sind. Zur Plasmasterilisation ist anzumerken, dass man so zwar Sterilität erreicht, jedoch ist nicht bekannt, wie sich diese Sterilisationsmethode auf die Materialien und Oberflächen der Mikrosysteme und Komponenten auswirkt. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass es durch das Plasma zu Veränderungen der chemischen Eigenschaften der Oberflächen kommt (Messerer et al. 2005). Ob sich diese, wie häufig in der Literatur beschrieben, überwiegend positiv auf die Biokompatibilität der Materialien auswirkt, wurde ist nicht geklärt. Im Rahmen von Versuchen zur Biokompatibilität der verwendeten Werkstoffe konnte festgestellt werden, dass sich bei verschiedenen Kunststoffen durch die Anwendung des Autoklavierens und der Plasmasterilisation unterschiedliche Ergebnisse die Vitalität der kultivierten Zellen betreffend zeigen. Abweichungen vom erwarteten positiven Resultat traten insbesondere bei der Plasmasterilisation auf. Für die Anwendung des Mikrosystems im klinischen Laboralltag bedeutet das, dass eine Identifikation des Einflusses der jeweils angewendeten Sterilisationsmethode mit eingeplant werden muss.

Die Sterilität betrifft nicht nur die Versuchsvorbereitung, sondern auch die danach ablaufenden Prozesse während der Kultivierung. Die Sterilität muss kontinuierlich sichergestellt werden. Insbesondere beim inkubatorfreien Aufbau bedeutet dies, dass die Koppelstellen steril ausgelegt werden müssen. Zur An- und Abkopplung des Systems an den Versorgungskreislauf können Sterilkupplungen aus Metall in den Kreislauf integriert werden, die ein Abflammen ermöglichen. Eine Trennung der Strecken sollte dennoch vermieden werden, um Kontaminationen auszuschließen.



Als problematisch erweist sich dies bei Arbeiten mit geöffneten Systemen. Die Manipulationsschritte sollten in einer Reinraumwerkbank stattfinden, was aber eine Sterilität der Manipulatoren voraussetzt. Ein in eine sterile Werkbank integrierter Mikroskoparbeitsplatz wäre sinnvoll. Zwingend erforderlich ist der Verschluss des Systems nach der Manipulation durch das Aufbringen eines Deckels.

Nach der Kultur sind bei den ersten Reinigungsprozessen mit hohen Spüldrücken die gleichen Verfahren zur Sterilisation einsetzbar, die vor der Kultivierung und Benutzung der Mikrosysteme zum Einsatz kommen. Es ist jedoch fraglich, ob eine Komplettreinigung der Systeme aufgrund der engen Siebstrukturen (ca. 7 - 9 μm) überhaupt möglich ist. Ist die Sauberkeit sichergestellt (lichtmikroskopische Kontrollen auf Rückstände in der Siebstruktur) spricht nach den bisherigen Erfahrungen nichts gegen eine erneute Verwendung der Mikrosysteme. Bei der beschriebenen Variante der Kultivierung der Zellen auf externen Zellträgern, die integriert werden, ist es empfehlenswert, diese kleine, preiswerte Komponente als Einwegteil auszulegen und nur das eigentliche Mikrosystem mit den fluidischen Kanälen, Anschlüssen und Heizstrukturen wieder zu verwenden.



5 Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen

5.1 Motivation oder warum man Zellen stimuliert

Da laut Hegelmaier (1993) hinsichtlich der Einflüsse von Wärme, elektrischen Feldern, Ultraschallwellen und mechanischen Stoßwellen auf die Heilung von Knochen, oder allgemeiner ausgedrückt auf die (Neu-)bildung von Knochen (Osteogenese, Osteoneogenese) Unklarheit herrscht, werden hier exemplarisch Realisierungsvorschläge für die Applikation mechanischer Faktoren gemacht. Deren exakte Auswirkungen sind zwar umstritten, jedoch ist wissenschaftlich belegt, dass mechanische Kräfte einen Einfluss auf die Knochenneubildung haben. Weniger zurückhaltend formuliert: der hohe Erklärungswert funktionell-morphologischer Betrachtungen zu Bewegungsapparaten und die unbestrittenen Erfolge der auf mechanischen Überlegungen basierenden Osteosyntheseverfahren deuten auf mechanische Einflüsse als Hauptkomponenten der knöchernen Gestaltwerdung hin. Rau (2009) beschreibt in seiner Arbeit die laut einschlägiger Literatur „optimalen mechanische Bedingungen für die Knochenheilung“.

Da die „[...] Arbeiten noch keine allgemeingültigen Aussagen darüber zu[lassen], welche mechanischen Reize in welcher Höhe und mit welcher Frequenz zu welchem Zeitpunkt der Frakturheilung die Osteogenese fördern“ (Hegelmaier 1993) existiert hier Forschungsbedarf.

Um diese Frage zukünftig beantworten und konkrete Größen benennen zu können, müssen weiterführende Untersuchungen an Knochenzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt werden.

Rau (2009) gibt in seiner Zusammenfassung der Literatur Hinweise darauf, welche Eigenschaften ein System haben muss, um bei der Beantwortung diverser die Zellen betreffender Fragestellungen hilfreich zu sein. Auch stellt er fest, dass es zu vielen Detailfragen bisher keine klaren Antworten gibt.

Sicher ist, dass (bei stabilisierter Fraktur) Frakturspaltbewegungen Einfluss auf die Knochenheilung haben. Unklar ist dabei, welche Bewegungsarten und -ausmaße sich positiv und welche sich negativ auswirken.

Relative Einigkeit besteht darin, dass (bei stabilisierter Fraktur) je kleiner der Frakturspalt, desto besser und schneller die Knochenheilung. Spaltbreiten von 1 mm und weniger werden von Anhängern der AO-Schule (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen, Davos) mit dem Ziel der Frakturheilung „per primam intentionem“ als ideal genannt (Rüedi et al. 2000), was den Einsatz von Mikrosystemen für Untersuchungen zum Thema rechtfertigt. Zwischen der Breite des Frakturspalt und der Bewegung herrscht ein unmittelbarer Zusammenhang. Art und Richtung der

Relativbewegungen zwischen den Frakturfragmenten können der mechanischen Betrachtung am Einheitsselement entsprechend Zug-, Druck- sowie Schubspannungen provozieren. Umstritten ist hierbei, welche dieser Bewegungen und daraus resultierenden Spannungen bzw. Dehnungen positiv und welche negativ wirken. Es wird vermutet, dass eine Bewegungsüberlagerung das Optimum darstellt (Rau 2009, S. 38). Den derzeit wohl höchsten Erklärungswert hat das Modell von Carter & Beaupré (2001), nachdem die reine Größenänderung (aus dem hydrostatischen Anteil am Spannungstensor) und der Verzerrungszustand der beteiligten Bindegewebszellen (insbesondere der pluripotenten Mesenchymzellen) die Gewebe-differenzierung determinieren.

Der Anfangsphase des Knochenheilungsprozesses wird eine große Bedeutung zugesprochen. Hier existieren Untersuchungen, die deutlich zeigen, dass der zu Beginn noch weiche Kallus Dehnungen nicht nur besser toleriert als der später entstehende feste Knochen, sondern dass eine aufgebrachte Dehnung zu Beginn der Heilung die Prozesse beschleunigen kann. All das ist jedoch immer unter dem Aspekt der ausreichenden Durchblutung zu sehen. Denn ist die Versorgung der Zellen gestört, ist auch die Knochenneubildung und damit die optimale Heilung nicht möglich.

Aus diesen Untersuchungen und Feststellungen, welche den Frakturspalt betreffen, lassen sich aufgrund der Ähnlichkeit der Prozesse bei der Knochenheilung und der Knochen-neubildung Bedingungen ableiten, welche die Prozesse beeinflussen.

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit den Forschungsergebnissen auf den Gebieten der Ermittlung biomechanischer Parameter, den bekannten und im Mikrosystem genutzten Methoden zur Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen allgemein und auf Osteoblasten im Speziellen. Aus den gefundenen Quellen wurden jene Informationen extrahiert, welche es ermöglichen, für das in diesem MZKS realisierbare Stimulationsmethoden für darin kultivierte Knochenzellen (oder deren Vorläufer) abzuleiten.



5.2 Stand der Technik

5.2.1 Biomechanische Parameter *in vivo* und *in vitro*

Zellen haben ähnliche Eigenschaften wie herkömmliche elastische Materialien und antworten mit Deformation des Systems auf externe Kräfte (Addae-Mensah & Wikswo 2008). Die zu messenden Kräfte müssen im physiologisch relevanten Bereich liegen. Laut Addae-Mensah & Wikswo (2008) sind die größten Scherkräfte in menschlichen Geweben im arteriellen Teil des kardiovaskulären Systems zu erwarten. Die dort auftretenden Drücke liegen zwischen 1 Pa und 7 Pa (bei einer Länge des betrachteten Gefäßabschnittes von 10 mm und einem Durchmesser von 10 mm). Das ließe Werte im Bereich von $0,5 \mu\text{N}$ – $5 \mu\text{N}$ erwarten (Ali & Schumacker 2002, Lehoux & Tegudi 2003). Der rechnerische Zusammenhang wird nicht angegeben. Knorpel muss gemäß den Angaben von Grodozinsky et al. (2000) beim Treppensteigen einem Normaldruck von 10 MPa bis 20 MPa stand halten. Nimmt man über eine Schätzung eine Knorpelquerschnittsfläche von etwa $14,5 \text{ cm}^2$ an, liegen nach Herberhold et al. (1999) die wirkenden Kräfte bei über 30 kN.

Um Zellen sinnvoll zu stimulieren, muss somit die Größenordnung der real, *in vivo* auftretenden Beanspruchungen eingegrenzt werden. Addae-Mensah & Wikswo (2008) stellen verschiedene Messmethoden für die Biomechanik von Zellen vor. In dieser Arbeit geben die Autoren auch eine Übersicht über verschiedene mechanische Parameter und deren Größenordnung im Organismus (Tabelle 14). Die beschriebenen Werte gelten meist für Zellen, Zellmembranen oder Bereiche der Zelladhäsion. Es ist allerdings festzuhalten, dass die Messung der Parameter zumeist *in vitro* stattfand.



Tabelle 14: Mechanische Parameter in biologischen Systemen nach (Addae-Mensah & Wikswo 2008)

Mechanischer Parameter	Biologisches System	Größenordnung
Federkonstante	Äußere Haarzellen, Nierenzellen	$2 \pm 6 \frac{mN}{m}, 40 \frac{pN}{m}$
Scherbenanspruchung	Endothel, Blutgefäße, Knorpel	$1 Pa - 20 MPa$
Zugkräfte	Adhäsionskräfte Zellen zu Substraten	$4 nN - 140 nN$
Dynamische Viskosität	Erythrozytenmembran	$0,6 \times 10^{-4} - 4 \times 10^{-4} Pa s$
E-Modul	Endotheliale Gewebe, Herzmuskeln, Skelettmuskeln, Leukozyten, Chondrozyten	$1130 Pa - 100 kPa$
In-Plane Schermodul für dünne inkompressible Membranen	Verformung roter Blutkörperchen	$1,7 \frac{\mu N}{m} - 13,3 \frac{\mu N}{m}$

Auch Lacroix & Prendergast (2002) beschäftigen sich für die Formulierung eines Modells zur Mechanoregulation für die Gewebedifferenzierung während der Frakturheilung mit den Materialeigenschaften verschiedener Gewebe.

Tabelle 15 zeigt die durch die Autoren aus der Literatur zusammengetragenen, ebenfalls meist experimentell bestimmten Werte. Für die Primärquellen sei an dieser Stelle auf die Originalschrift verwiesen.

Diese mechanischen Größen und Materialeigenschaften sollten für die Nachbildung definierter Zustände in einem künstlichen Beanspruchungssystem bekannt sein und berücksichtigt werden.



Tabelle 15: Materialeigenschaften einiger Gewebearten nach (Lacroix & Prendergast 2002)

Material-eigen-schaften	Granu-lations-ge-webe	Fibrö-ses Gewe-be	Knor-pel	Kno-chen-mark	Unrei-fer Kno-chen	Reifer Kno-chen	Korti-kaler Kno-chen
Elastizitäts-modul (MPa)	0,2	2	10	2	1000	6000	20000
Permeabili-tät (m ⁴ /Ns)	1x10 ⁻¹⁴	1x10 ⁻¹⁴	5x10 ⁻¹⁵	1x10 ⁻¹⁴	1x10 ⁻¹³	3,7x10 ⁻¹³	1x10 ⁻¹⁷
Querkon-traktions-zahl	0,167	0,167	0,167	0,167	0,3	0,3	0,3
Kompres-sionsmodul (für Festkörper) (MPa)	2300	2300	3400	2300	13920	13920	13920
Kompres-sionsmodul (für Fluide) (MPa)	2300	2300	2300	2300	2300	2300	2300
Porosität	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,04

5.2.2 Messmethoden für biomechanische Parameter von Zellen

Für die Messung und Abschätzung der zuvor beschriebenen mechanischen Größen existiert eine Vielzahl an Methoden. In (Addae-Mensah & Wikswo 2008) werden diese in „aktive Methoden“, die Kräfte applizieren, und „passive Methoden“, die Kräfte „messen“ oder erfassbar machen, unterteilt und einige mikromechanische Systeme dafür vorgestellt. Die Kombination beider Methoden (applizierend und messend) wird als Optimum dargestellt.

Die meisten Kombinationsmethoden erfordern jedoch technisch sehr komplexe, schwierig zu handhabende Systeme, die meist nur einen exemplarischen Nachweis zulassen und nicht für den reproduzierten Einsatz für große Testreihen im Labor geeignet sind, mit fragilen Komponenten wie zum Beispiel die Atomkraftmikroskopie (AFM), die Optische oder die Magnetische Pinzette.

Addae-Mensah & Wikswo (2008) geben in einem Review eine Zusammenfassung der derzeit praktisch einsetzbaren Methoden. Tabelle 16

zeigt die „aktiven Methoden“ und gibt die Größenordnungen der applizierten Kräfte wieder, was im Fokus der hier verfolgten Fragestellung liegt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der aktiven Methoden und Techniken für die zelluläre Biomechanik nach (Addae-Mensah & Wikswo 2008)

Methode	Prinzip	Größenordnung der applizierten Kräfte
Atomkraftmikroskop	Die Relativverformung der Cantileverspitze und des Substrates (der Zelle) wird zur Schätzung der Kräfte genutzt	$10 \text{ pN} \leq F_x \leq ?$
Magnetic Twisting Cytometry (Magnetische Pinzette)	Magnetisierte ferromagnetische oder superferromagnetische Partikel werden mit Hilfe eines schwächeren gerichteten Magnetfeldes oder Gradienten bewegt	$2 \text{ pN} \leq F_x \leq 50 \text{ nN}$
Optical Tweezers (Optische Pinzette)	Dielektrische Teilchen mit hohem Brechungsindex werden mittels Laserstrahlen bewegt	$2 \text{ pN} \leq F_x \leq 600 \text{ pN}$
Mikropipetten-ansaugung	Sanftes Saugen wird an der Mikropipette appliziert, die an der Zelle anliegt	$10\text{-}20 \text{ pN} \leq F_x \leq ?$
Dehnungsgeräte	Eine flexible Membran wird an Komponenten angebracht, die zu deren Verformung dienen	Qualitativ mindestens bis zu 25 % des ungedehnten Zustandes
MEMS aus Silizium	Bewegliche Teile aus Silizium mit verschiedenen Aktuierungsmethoden, z. B. Piezoantrieben	$0,5 \text{ nN} \leq F_x \leq 1,5 \text{ }\mu\text{N}$
Flusskammer	Geschlossene Strömungskammern, Zellen werden Scherstress ausgesetzt	$30 \text{ Pa} \leq P_x \leq ?$

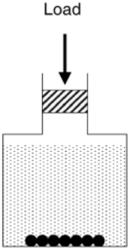
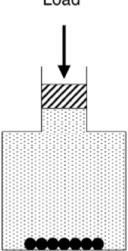
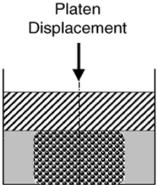
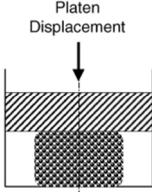
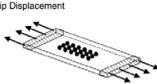
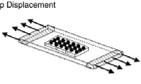
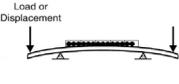


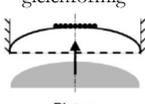
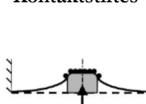
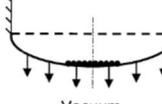
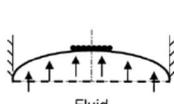
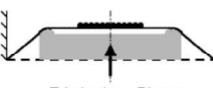
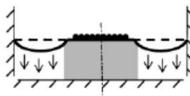
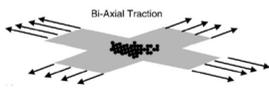
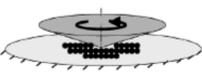
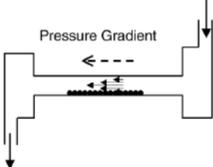
5.2.3 Systematisierung der Beanspruchungsmethoden nach Brown

Aus der Vielzahl der gefundenen technischen Realisierungen in Makro- und Mikrosystemen ist es erforderlich, die dahinter stehenden technischen Prinzipie für die Kraft- bzw. Verformungseinleitung abzuleiten (im Sinne der Life Sciences: Reize = Systemprovokation). Die Basis für die Strukturierung bieten die ausführlichen Arbeiten von Brown (2000), der die wichtigsten Methoden beschreibt. Tabelle 17 zeigt die Einordnung der Methoden mit Untergruppen und das Prinzip veranschaulichende Abbildungen für alle aufgezählten Methoden.



Tabelle 17: Techniken zur mechanischen Stimulation von Zellen nach (Brown 2000)

Techniken zur mechanischen Stimulation von Zellen <i>in vitro</i>			
Kompressionsbeanspruchungssysteme/Systeme zur Druckbeaufschlagung			
Hydrostatische Druckbeaufschlagung negative und positive Beaufschlagung		Druck mittels Kolben/Direktkontakt Gewebestück oder Zellen in einem 3D-Scaffold	
mit Inkubationsgasphase	ohne Inkubationsgasphase	mit peripherer Unterstützung der Probe entspricht der Situation <i>in vivo</i> , minimale Querdehnung an Gelenkoberfläche eventuell Einschränkung der Versorgung	ohne periphere Unterstützung der Probe freier Fluss der Nährstoffe und Metabolite
 <p>Load</p>	 <p>Load</p>	 <p>Platen Displacement</p>	 <p>Platen Displacement</p>
Longitudinale Substratdehnung Druckbeanspruchung der Kulturoberfläche rechtwinklig versetzt zu den auftretenden Dehnungen (Poissoneneffekt)			
Uniaxiale Dehnung		Substratbiegung	
komplett im Medium Grip Displacement	mit integrierten Kammern Grip Displacement	komplett im Medium Load or Displacement	mit integrierten Kammern Load or Displacement
			
Kreisförmige Substratverformung aus der Ebene heraus Bei kinematisch angetriebenen Ausführungen hängt die Verteilung der Kulturoberflächenverformung von der Reibcharakteristik des Interfaces zwischen Kolben/Kontaktstift und der Unterseite des Substrates zusammen. Bei kinetisch angetriebenen Ausführungen bildet die Verteilung der Kulturoberflächenverformung, eine Flüssigkeits-/Strukturwechselwirkung zwischen dem Substrat und dem Nährmedium, unter Beteiligung eines Querdruckdifferentials durch das Substrat.			
Gekrümmte Verformung mit gebogenem Kol-	Substratausbeulung unter Nutzung eines	Appliziertes Vakuum (Flexercell®)	Flüssigkeitsverformung

<p>ben kinematisch gleichförmig</p>  <p>Platen Displacement</p>	<p>zentralen Kontaktstiftes</p>  <p>Prong Displacement</p>	 <p>Vacuum</p>	 <p>Fluid Displacement</p>
<p align="center">Dehnung in der Substratebene</p> <p align="center">In der zentralen Region der Kulturoberfläche wirkt die gleiche biaxiale Dehnung, unter der Annahme dass sich die Kulturoberfläche verhält wie eine reibungslose Membran und dass Randbedingungeinflüsse in der zentralen Kulturregion vernachlässigbar sind.</p>			
<p>Radiale/ringförmige Dehnung Bewegung eines reibfreien Kolbens</p>  <p>Frictionless Platen Displacement</p>	<p>Fixierter Mittelbereich auf Kolben, umgebend Verformung mittels Vakuum</p>  <p>Vacuum + Frictionless Platen</p>	<p>Bidirektionale Substratdehnung</p>  <p>Bi-Axial Traction</p>	
<p align="center">Spezielle Dehnungssysteme unregelmäßig geformte Kolben</p>			
<p align="center">Fluidische Scherbeanspruchung relativ dünne Flüssigkeitsschichten, viskose Flüssigkeitsbedingungen auf Kulturoberfläche → homogene Scherbeanspruchung</p>			
<p>Kegel- und Kolbenflusskammer kinematische Kontrolle der Flüssigkeitsscherraten durch Winkelgeschwindigkeit der Kegelrotation</p> <p align="center">Boundary Rotation</p> 	<p>Parallele Kolbenflusskammer kinetische Kontrolle der Flüssigkeitsscherraten durch die Druckdifferenz am Ein- und Ausgang</p>  <p>Pressure Gradient</p>		
<p align="center">Kombinierte Substratverformung und Flüssigkeitsscherung</p>			

Brown (2000) spricht von insgesamt sieben „primary loading modalities“ (Hauptverformungsarten). Die einzelnen Methoden werden anhand von Realisierungs-beispielen und vom Autor durchgeführten Versuchsreihen erläutert. Für weiterführende Erklärungen sei auf die Literatur verwiesen. Allen beschriebenen Methoden ist gemeinsam, dass die Anwendung im Mikrosystem zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Publikation noch keine Rolle spielte.

Eine Literaturrecherche lieferte die Erkenntnis, dass moderne Methoden das Mikrosystem als Applikationsumgebung durchaus nutzen und dass auch die beschriebenen zugrundeliegenden Methoden die gleichen wie in „makroskopischen“ Setups sind. An dieser Stelle sei auf die bereits vorgestellte Tabelle 14 mit Messmethoden biomechanischer Parameter verwiesen. Die dort vorgestellten Methoden lassen sich zum großen Teil in das Schema nach Brown (2000) einordnen und sind bereits im Hinblick auf die Anwendung in miniaturisierten Systemen und Mikrosystemen untersucht. Neben den neueren, in Brown (2000) nicht beschriebenen Methoden (AFM, Optische und Magnetische Pinzette), lassen sich nach dem heutigen Stand der Technik nicht alle der beschriebenen Methoden in Mikrosystemen anwenden. Auch die Qualität der applizierten Reize spielt in Abhängigkeit von den zu stimulierenden Zellen eine entscheidende Rolle für die Realisierbarkeit einer Stimulationsmethode. Besonders in Gestalt der Dehnungsgeräte und Flusskammern gibt es bereits gut geeignete technische Umsetzungen.

5.2.4 Realisierungsbeispiele: Kräfte auf Zellen in Mikrosystemen

Der Stand der mikrosystemtechnischen Varianten sei im folgenden Abschnitt exemplarisch anhand einiger interessanter Realisierungsvarianten dargelegt. Bei der Auswahl der Methoden wurde explizit auf die Übertragbarkeit der Methode in das zuvor beschriebene MZKS und dessen Peripherie Wert gelegt.

Neuronale Migration tritt in besonderem Maße bei der Entwicklung des Gehirns auf. Lin et al. (2004) untersuchen mit Hilfe eines MEMS die Effekte mechanischer Spannungen bei der Neurogenese. Dabei wirkt Zug auf die Zellen, und die resultierende neuronale Migration soll quantifiziert werden. Technisch umgesetzt wird das Prinzip in Form der uniaxialen Dehnung einer dünnen PDMS-Membran, die auf der einen Seite mechanisch fixiert ist und auf der anderen Seite in einer gleitend gelagerten Siliziumklemme gehalten wird. Auf der Membran befinden sich „Neurosphären“, welche stimuliert werden sollen. Die Dehnung der Membran erfolgt über einen Ratschenmechanismus in vordefinierten inkrementalen Schritten von je 60 μm . Bisher wurde das System entworfen und simuliert. Die Anwendbarkeit und Handhabung erscheint für den Einsatz im Labor fraglich. Die mechanische Schwachstelle bilden die hoch empfindlichen Zähne der Ratsche, welche aus Silizium bestehen und laut Berechnung durch Lin et al. (2004) Kräfte im

Bereich von maximal 0,1 mN pro Element tolerieren. Der Gesamtaufbau ist hybrid und fertigungs-technisch mit hohem Aufwand verbunden.

Ein Beispiel für biaxiale zyklische Dehnung liefern Tan et al. (2008). Das System nutzt das kommerziell verfügbare Flexercell® System, bei welchem Zellen auf Membranen kultiviert und mit Hilfe von Vakuum verformt werden. Die Idee besteht darin, über spezielle Strukturierungen der Membranen zum einen ein gerichtetes Wachstum der Zellen zu erreichen und zum anderen durch die verschiedenen geometrischen Parameter der Membran mehr Variationsmöglichkeiten bei der Reizapplikation zu gewinnen. Die flexible Membran ist mit Mikrogräben (10 µm breit und hoch) unterschiedlicher Orientierung (kreisförmig oder radial sternförmig) strukturiert. Die Dehnungsvorrichtung (Flexercell® Inc., Hillsborough, NC) appliziert zyklische Dehnungsgradienten auf die Membran durch ein zyklisch kontrolliertes Vakuum (-20 kPa) mit genau definierter sinusförmiger Wellenform (Frequenz 1 Hz).

Die Befestigung der relativ kleinen Membranen auf dem Dehnungsgerät ist nicht näher beschrieben. Betrachtet man jedoch die Angaben des Herstellers für den StageFlexer®, den StagePresser® mit je 35 mm Kammer und den StageFlexer® JR mit 18,5 mm-Kammer, so ist zu vermuten, dass die Membran eingelegt und mit Hilfe von Schrauben mittels des Gehäuses fixiert wird. Der Deckel ist transparent und das Innenleben der Kammer mit einem Mikroskop beobachtbar. Mit den relativ großen Abmaßen der Kulturkammer entspricht die Realisierung jedoch nicht einem typischen Mikrosystem. Jedoch ist vorstellbar, dass eine in ein Mikrosystem integrierte Membran (Sang et al. 2009) mit Hilfe eines Vakuums verformt werden kann.

Die beschriebene Variante entspricht der bei Brown (2000) beschriebenen Methode der kreisförmigen Substratverformung durch ein appliziertes Vakuum aus der Ebene heraus (siehe Tabelle 17). Ähnliche Methoden werden von Addae-Mensah & Wikswa (2008) beschrieben.

Auf den ersten Blick einen Schritt zurück bewegt man sich bei jener Methode, die Serrell et al. (2008) beschreiben. Auf einer runden in der Mitte geteilten, transparenten Zellplattform aus Silizium (Durchmesser 200 µm) wird eine einzige Zelle kultiviert. Ein Teil der Kulturfläche kann schrittweise verschoben werden, so wirkt eine uniaxiale Kraft auf die Zelle. Im Unterschied zu den anderen Methoden bestand hierbei das Ziel darin, sowohl die Zellantwort in Form mechanischer Daten zu ermitteln als auch diese mit der zytoskelettalen Morphologie, die über spezielle Färbemethoden mikroskopisch sichtbar gemacht werden kann, zu korrelieren.

Kalibriert wird das MEMS mit einem cantilever-freien AFM. In dem beschriebenen Experiment wurde ein Fibroblast, welcher 2 h adhären

konnte, mit einem 11 μm großen Schritt (Auflösung 50 nm) beaufschlagt und die Kraftantwort der Zelle für 3 min beobachtet. Mit Hilfe eines „Linearmodells“ werden die viskoelastischen Parameter der Zelle (Federkonstanten, Relaxationszeit) bestimmt.

Mit der Bildgebung könnten auch zytoplasmatische/subzelluläre Bestandteile in Echtzeit dargestellt werden. Das kann eine Korrelation zwischen der Kraftantwort der Zelle und den Eigenschaften der zytoplasmatischen Bestandteile ermöglichen.

Ein interessanter, etwas älterer Ansatz zur Korrelation der wirkenden Kräfte mit morphologischen Parametern ist bei Cao et al. (1997) zu finden. Beschrieben wird hier die Entwicklung einer Kammer, welche die Beobachtung fluidisch beanspruchter Zellen von der Seite ermöglicht.

Hier werden Zellen in einer Plattenflusskammer mit Scherkräften beaufschlagt, welche durch das über sie hinweg strömende Fluid verursacht werden. Über eine Spiegeloptik, die an der Seite der transparenten rechteckigen Glaskammer (50 mm lang, 0,15 mm hoch und 0,6 mm breit) angebracht ist, wird es möglich, sowohl seitliche Beobachtungen der adhärennten Zellen als auch Beobachtungen von oben durchzuführen. Jedoch kann diese Beobachtung mit nur einem Objektiv nicht gleichzeitig erfolgen. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass sich ein adhärenter Leukozyt unter dem Einfluss von Scherkräften tränenartig verformt und dass sich die Kontaktfläche zum Substrat vergrößert. Das bietet die Möglichkeit, auf die Situation von Endothelzellen in Gefäßsystemen zurückzuschließen.

5.2.5 Realisierungsbeispiele: Kräfte auf Knochenzellen in Mikrosystemen

1987 gelang es Hickory & Nanda (1987) mit Hilfe eines kieferorthopädischen Drahtes in Form einer helikalen Feder, Calvariastrukturen der Ratte *in vitro* statisch zu dehnen (siehe Abbildung 49a). Der Einfluss der Zugkraftamplitude und die Dauer der Belastung wurden untersucht. Explantate wurden an den Federn befestigt (Die Methode wird nicht genauer erläutert.) und 48 Stunden inkubiert. Die Belastung betrug 0 N, 2 N und 6 N. Nach der Beanspruchung erfolgten eine Markierung der Zellen mit tritiiertem Thymidin und die Zählung dieser Zellen, um die Veränderungen der Proliferation zu registrieren. Es konnte festgestellt werden, dass bei 2 N Beanspruchung nach 9 Stunden eine Längenänderung der sagittalen Schädelnaht von 0,7 mm auf 0,9 mm und nach 22 Stunden auf 1,4 mm erfolgt war. Bei einer Beanspruchung mit 6 N geschah die gleiche Dehnung bereits nach 3 bzw. 9 Stunden. Die Gruppe mit der mittleren Belastung (2 N) zeigte anteilig eine höhere Thymidinaufnahme (Indikator für Proteinsyntheseaktivität), als die Gruppen ohne und mit 6 N Belastung.

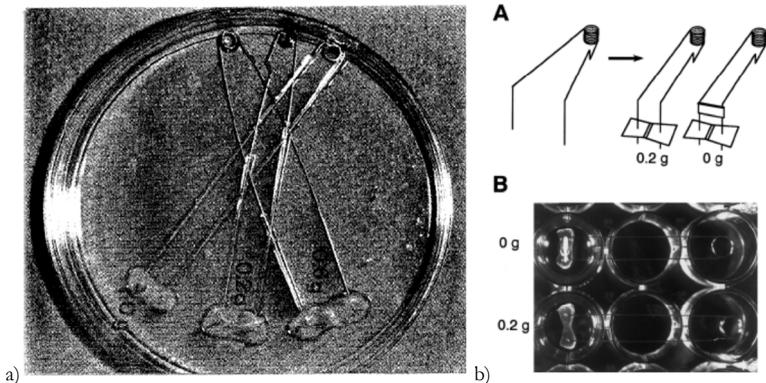


Abbildung 49: Federkonstrukte zur Reizapplikation

a) Mit Federstruktur kontaktierte Explantate aus der Schädeldecke der Ratte, Belastungsstufen: 6 N, 2 N und 0 N (Hickory & Nanda 1987)

b) (A) kieferorthopädische Feder, (B) Proben in Multiwellplatte (Ikegame et al. 2001)

Ikegame et al. (2001) führten einige Jahre später vergleichbare Experimente durch (Abbildung 49b(A)), jedoch befanden sich die Proben nicht mehr gemeinsam in einer Petri-Schale, sondern wurden in Multiwellplatten kultiviert (siehe Abbildung 49b(B)). Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Zugbeanspruchung die Bildung von Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP 4) in präosteoblastischen Zellen und Fibroblasten induziert, die später zu Osteoblasten werden und damit zur Osteogenese führen. In den Fibroblasten konnten erhöhte Proliferationsraten nachgewiesen werden.

Dass diese Art der Reizapplikation miniaturisierbar ist, zeigen die Arbeiten von Yasuda et al. (2001) und Iribe et al. (2007), welche Karbonfasern anstelle der metallischen Federn nutzen, um die Verformung von Herzmuskelzellen zu registrieren. Der Aufbau ist dem zuvor beschriebenen ähnlich, jedoch ist die Aktionsfläche um ein Vielfaches verkleinert, so dass einzelne Zellen beansprucht werden (siehe Abbildung). Deutlich zu erkennen ist, dass die hoch empfindliche Beanspruchung einer einzelnen Zelle einen hohen gerätetechnischen Aufwand in Form von Manipulatoren und einer Steuereinheit (Abbildung 50) verlangt. Die Methode ist auch auf andere Zellarten übertragbar und kann unter Einhaltung der geometrischen Rahmenbedingungen in dem in dieser Arbeit beschriebenen Mikrosystem Anwendung finden.

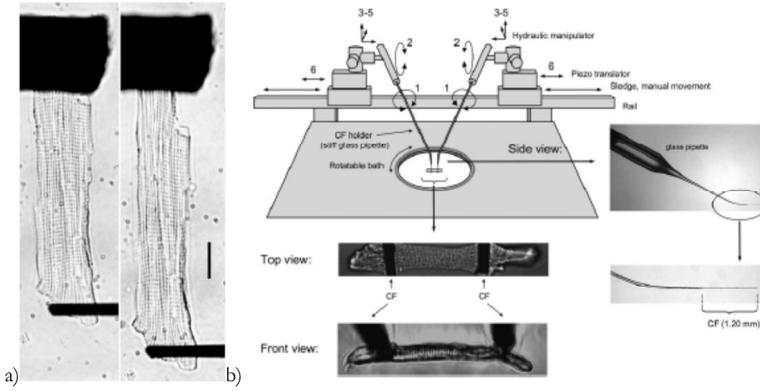


Abbildung 50: Miniaturisierung der Zugvariante

a) Längenänderung einer Kardiomyozyte unter Beanspruchung (Yasuda et al. 2001)

b) Versuchsaufbau zur Detektion einer Längenänderung (Iribe et al. 2007)

5.3 Realisierungskonzepte: Kräfte auf Zellen im eigenen MZKS

Aus Analyse der zuvor beschriebenen Stimulationsmethoden und unter Berücksichtigung der geometrischen und materialtechnischen Grenzen lassen sich für die mechanische Applikation von Kräften auf Zellen im beschriebenen MZKS folgende Realisierungsvarianten vorschlagen:

5.3.1 Fluidische Beanspruchung

Die beschriebene Struktur des Mikrosystems mit einer Kultivierungskammer, die über Versorgungskanäle durch- bzw. umströmt werden kann, bietet bereits ohne oder mit geringen Modifikationen die Möglichkeit, sie als Kolbenflusskammer zu nutzen (siehe Tabelle 17). Anhand von Simulationen (Abschnitt 4.2.3) konnte gezeigt werden, dass mittels geometrischer Anpassung Variationen der Strömungen möglich sind. Folgende geometrische Veränderungen können die Strömungsbedingungen beeinflussen und damit den fluidischen Scherstress, der auf die Zellen durch die seitliche Beströmung wirkt, variieren:

- veränderte Kanalstrukturen (mehrere parallele Kanäle, breiterer Hauptkanal),
- veränderte Sieb-/Hindernisstrukturen (siehe Simulation Abschnitt 4.2.3.) und
- veränderte Kultivierungskammergeometrie (oval).

Die optimale Geometrie für bestimmte Strömungsprofile sollte vor der Systemfertigung simulativ bestimmt werden.

Eine „vertikale“ Beanspruchung der Zellen durch fluidische Stömung ist auch realisierbar. Dafür müssten externe Fluidikkomponenten oberhalb oder unterhalb der Zellen an das Mikrosystem angeschlossen werden. Solche Komponenten wären zum Beispiel Schläuche mit einem oder mehreren Lumina oder Glaskapillarbündel (siehe Abbildung 51).

Für das Anbringen von Multilumenschläuchen an Siliziummikrosystemen existieren Realisierungskonzepte (Stubenrauch et al. 2009c), die denen für die Polymerkomponenten ähneln (Abschnitt 4.2.2) So konnte gezeigt werden, dass dichte fluidische Verbindungen aufgebaut werden können und drei Kanäle in einem Schlauch zum Einbringen von Flüssigkeiten genutzt werden können. So ist es möglich, verschiedene Strömungsparameter zu variieren (Durchflussmenge, Druck) und auch gleichzeitig unterschiedliche Fluide zu nutzen. Nachteilig ist jedoch, dass die Schläuche in einem gewissen Bereich dehnbar sind, weswegen bei Notwendigkeit der Beaufschlagung mit exakt definierten

Drucken berücksichtigt werden muss, dass der Schlauch nachgeben könnte und die Werte im Mikrosystem dann von der Vorhersage abweichen.

Einen Ausweg, diese Verformung betreffend, bieten deutlich starrere Glaskomponenten. Das Fachgebiet „Anorganisch nichtmetallische Werkstoffe“ der Technischen Universität Ilmenau ist in der Lage, gebündelte Glaskapillaren über die Glasverziehtechnologie zu verbundenen miniaturisierten Glasstrukturen zu verformen, bei denen das ursprüngliche Verhältnis zwischen Wandstärke und Hohlraumdurchmesser erhalten bleibt (Hesse et. al. 2008). Im Rahmen der Arbeiten der Nachwuchsforschergruppe „NanoKap“, gefördert durch das Hochschul- und Wissenschaftsprogramm des Thüringer Kultusministeriums, 01.01.2006 - 31.12.2006, gelang es, sogenannte Ziehwiebeln (Abbildung 51a) im vorderen Bereich um 90° abzuwinkeln und die Durchlässigkeit der Strukturen zu erhalten. Dies bietet die Möglichkeit, die Kapillaren geometrisch günstig an ein Mikrosystem anzukoppeln (siehe Abbildung 51b). Bisher offen ist die Problematik des direkten Anschlusses dieser Strukturen. Alle bisher durchgeführten Versuche wurden über Klebstoffe realisiert. Denkbar sind jedoch auch direkte Fügeprozesse von Glas auf Glas oder von Glas auf Silizium.

Die Handhabung der hochempfindlichen Kombinationsbauteile gestaltet sich schwierig. Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurde das Mikrosystem mit dem Glasbauteil nach dem Fügen in ein Epoxidharz vergossen, damit die Strukturen nicht so bruchempfindlich sind.

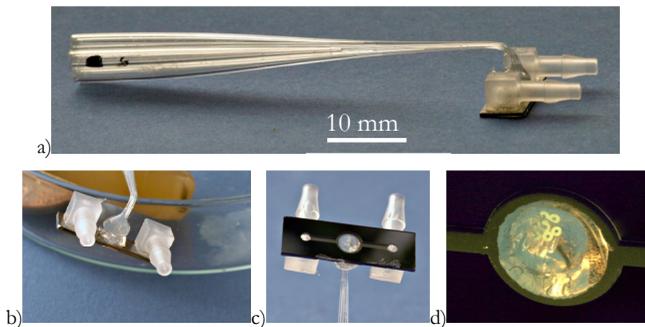


Abbildung 51: Glasverzugteile des Fachgebietes Anorganisch nichtmetallische Werkstoffe der TU Ilmenau in Kombination mit dem MZKS (Bilder: Danja Voges)

- a) um 90° abgewinkelte Ziehwiebel am MZKS
- b) Detailsicht der Ankopplung
- c) Blick auf ein Mikrosystem mit Ziehwiebel
- d) Blick in die Kulturkammer des MZKS, Kapillarenden erkennbar

5.3.2 Kompressionsbeanspruchung

Systeme zur definierten Kompressionsbeanspruchung lassen sich mit einem Silizium-Glas Mikrosystem realisieren. So wird es möglich, die Zellen mittels hydrostatischer Druck-beaufschlagung ohne Inkubationsgasphase (siehe Tabelle 17) zu belasten. Dafür ist es notwendig, die Versorgungskanäle abzudichten, um eine geschlossene Kammer zu erhalten (Druckverhältnisse) oder mit Hilfe der Direktkontaktmethode durch Druck mittels Kolben auf in einem Scaffold befindliche Zellen oder auf ein in das Mikrosystem eingebrachtes Gewebestück zu applizieren (siehe Abbildung 52).

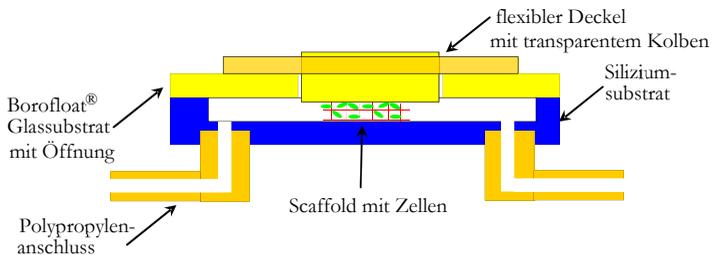


Abbildung 52: Systemaufbau Direktkontaktmethode

Das Kernstück dieser Methode bildet eine Deckelkonstruktion, welche aus einem elastischen Polymer besteht, in das über der Kammer ein starrer transparenter in das System hineinragender Kolben integriert ist. Dieser stellt einen „Kraft“-Applikator dar. Die Krafteinleitung von außen kann definiert mit Hilfe der Mikromanipulatoren erfolgen, jedoch sind auch andere Antriebskonzepte vorstellbar (Beströmung mit Luft).

Makroskopisch lassen sich am Frakturspalt mit Hilfe von „Hexapodfixateuren“ kontrollierbare Korrekturen vornehmen und so die Stellung der Knochen korrigieren. Diese Vorrichtungen können als Messfixateur sensorisiert (Hegelmaier 1993) und auch aktorisiert (Seide et al. 2005) werden. Dann ist es möglich, definierte Bewegungen zu applizieren, von denen man vermutet, dass sie einen Effekt auf die Heilungsprozesse ausüben. Die Nachbildung dieser makroskopischen Bewegungen ist mit dem zuvor beschriebenen Funktionsprinzip skaliert mikroskopisch realisierbar. Abbildung 53 stellt die Bewegungsmöglichkeiten am Fixateur-Knochen-Gebilde und am Mikrosystem-Zellen-Gebilde gegenüber.

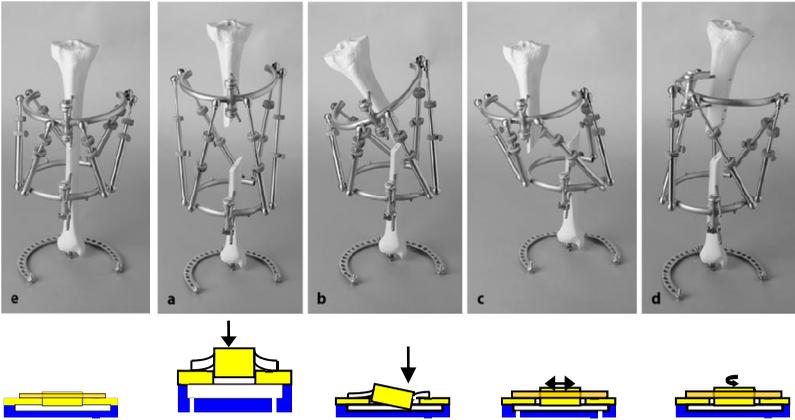


Abbildung 53: Hexapodmechanismus im Ilizarow-Fixateur
Einstellbare Belastungsarten (Seide et al. 2005) und deren Übertragung auf das Mikrosystem

Vorstellbar ist, dass Zellen auf dem Boden der Kulturkammer wachsen und weitere Zellen direkt auf dem Kolben angesiedelt werden. Der Abstand zwischen diesen Zellschichten ist ein Spalt, der in einer Größenordnung unter einem halben Millimeter liegt, was auch in der Literatur beschriebenen Frakturspaltbreiten entspricht (Rau 2009, S. 35). Dieser Spalt kann durch Bewegung des Kolbens verändert werden.

Das System muss an die Versorgungseinheit mit Temperaturregelung gekoppelt sein, um die Kultivierungsbedingungen aufrecht zu erhalten und die Durchblutungs- bzw. Versorgungssituation zu simulieren. Aufgrund der Transparenz wird es möglich über die Beobachtungseinheit den Einfluss der mechanischen Applikation von Kräften in Echtzeit zu beobachten.

Es sollte eine optische Methode für die Quantifizierung der Kräfte genutzt werden. Eventuell ist über definiert verformbare in das Mikrosystem integrierte Markersysteme nachzudenken, die eine Referenz für die wirkenden Kräfte darstellen könnten. Die Beurteilung der Zustände der Zellen und die morphologischen Änderungen an der Zelle sollten mittels Methoden der Bildgebung beurteilt werden. Es stehen für verschiedene Differenzierungsmerkmale geeignete Farbstoffe zur Verfügung, die eine solche Beurteilung erlauben. Die Auswertung der aus den Kräften resultierenden Zellveränderungen ist ebenso wie die Definition der wirkenden Kräfte (Dauer und Stärke) in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Zellen zu wählen.

5.3.3 Kombination: Fluidische Beanspruchung und Kompressionsbeanspruchung

Die beiden zuvor beschriebenen Beanspruchungsvarianten lassen sich auch kombiniert anwenden, so dass eine Überlagerung der Belastung und deren Auswirkungen auf Zellen untersucht werden können.

So ist es vorstellbar, mit Hilfe des transparenten Kolbens im flexiblen Deckel Kräfte von oben auf Proben auszuüben und diese gleichzeitig einer fluidischen Beanspruchung von der Seite auszusetzen. So lassen sich bei Parallelisierung der Versuchsaufbauten Aussagen über die Dominanz verschiedener mechanischer Einflüsse auf die Zellen ableiten. Solche kombinierten Untersuchungen führten bereits Owan et al. (1997) durch. Bei diesen Versuchen mit einer Vierpunktbiegung konnte festgestellt werden, dass Scherkräfte, verursacht durch das die Zellen umgebende Fluid, bei der Beanspruchung mit mechanischen Kräften eine größere Rolle für die Differenzierung von Osteoblasten spielen als der mechanische Reiz durch die Dehnung der Zelle. Eine exakte Trennung der Größen ist mit der gewählten Methode jedoch nicht möglich. Die hier vorgeschlagene Kombinationsmethode kann zwar auch die fluidische Scherbelastung, welche durch die Bewegung der Flüssigkeit um die Zellen bei Applikation der Kräfte über einen Kolben entsteht, nicht ausschließen, bietet jedoch die Möglichkeit, zusätzliche Reize dazu mit Hilfe einer Strömungsvariation zu setzen.

5.3.4 Dehnung der Substratebene - Membranverformung

Nicht unerwähnt soll bleiben, dass es die modernen Methoden der Mikrosystemtechnik bereits ermöglichen, sehr dünne Membranen (Sang et al. 2009) oder strukturierte Vliese herzustellen. Integriert man eine solche Komponente in das beschriebene Mikrosystem, wird es möglich, die Methoden der Flexercell[®]-Vorrichtungen anzuwenden (Tabelle 17). Als mögliche Materialien kommen unter anderem Gallium-Nitrit (GaNi) und PDMS in Frage. In den Ausführungsstärken als Membran sind diese transparent und ermöglichen so ebenfalls die Beobachtung während der Kultur.





6 Diskussion und Ausblick

6.1 Ergebnisse der Testläufe der Einzelkomponenten und des Gesamtsystems zum Aufbau einer stabilen Zellkultur

Die technischen Komponenten des in der Arbeit beschriebenen MZKS wurden einzeln auf ihre Funktion geprüft. Dafür wurde versucht, die Rahmenbedingungen für die Anwendung im Zellkulturlabor möglichst identisch zu halten. Für die Vorgaben, die externen Parameter betreffend, kamen die Ergebnisse aus Kapitel 3 zum Einsatz.

6.1.1 Mikrosystem

Das Silizium-Glas-Mikrosystem wurde vor allem im Hinblick auf Dichtigkeit der angeschlossenen Fluidkomponenten und Scaffoldträger untersucht. Undichtigkeiten wurden häufig bereits beim Fügen der Komponenten identifiziert und konnten durch Wiederholung des Fügevorgangs oder die Verwendung neuer Komponenten ausgeschlossen werden.

Unter Zuhilfenahme der Manipulatoren sind eine Integration frei beweglicher Scaffold-Komponenten und der anschließende Verschluss des Mikrosystems von Hand sicher realisierbar.

Das entwickelte Mikrosystem unterscheidet sich durch seinen Variantenreichtum und die Möglichkeit der Adaptierbarkeit an biologische Fragestellungen deutlich von den im Stand der Technik beschriebenen Systemen und löst die kritischen Punkte (Ankopplung an die Peripherie, Dichtigkeit, Strömungsbeeinflussung, Begrenzung der Zellkulturfläche) zufriedenstellend.

6.1.2 Versorgungseinheit

In Abschnitt 4.3 wurden die Varianten zur Versorgung und Parameterüberwachung der Mikrosysteme dargestellt. Diese decken den gesamten Bereich der in der Literatur dargestellten Vorschläge ab (siehe Tabelle 5).

- Linaer oder Kreisbetrieb
- Hydrostatisch oder –dynamisch
- Pumpen oder Saugen
- Kolbenhubpumpe oder Peristaltikpumpe

Mit Hilfe der existierenden Pumpen und Reservoirs können funktionierende Versorgungsstrecken aufgebaut werden. Die geschickte Auswahl und



Kombination mehrerer Varianten hebt sich von den Beschreibungen im Stand der Technik ab. Hier wird in der Regel nur eine Versorgungsmethode genutzt.

Anzumerken ist, dass die aufgezeigten Lösungen für die Versorgung und die Parametererfassung weit weg von einer Mikrointegration sind. Für weitere Entwicklungen ist unbedingt zu diskutieren, ob die Versorgung der Mikrosysteme in Form von miniaturisierten bzw. Mikropumpen erfolgen sollte.

Die für die Parametererfassung (Temperatur, pH-Wert, Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt) erläuterten Varianten sind für die Überwachung der Parameter absolut ausreichend. Sollte die biologische Fragestellung weitere Sensorik erfordern, ist deren Integration zu diskutieren.

6.1.3 Optische Beobachtungseinheit

Die technischen Komponenten der Beobachtungseinheit wurden durch den Einsatz eines herkömmlichen Durchlichtmikroskopes und einer CCD-Mikroskopkamera bewusst einfach gehalten. Komplexere hochtechnisierte Lösungen (CLSM oder 2PLSM) sind denkbar und mit dem Mikrosystem verwendbar, jedoch sollte eine labortaugliche Variante gefunden werden, die für Beobachtung und Überwachung der Systeme und Zellen geeignet ist.

Mit der aufgebauten Beobachtungseinheit wurden insbesondere Testaufnahmen der Mikrosysteme und Manipulationswerkzeuge bei verschiedenen Systemzuständen erstellt.

Die so erstellten Aufnahmen wurden für die Entwicklung der Bildverarbeitungssoftware für die Zell- und Werkzeugdetektion zur automatisierten Manipulatorsteuerung genutzt.

Die Analyse des Standes der Technik hierzu zeigte auch, dass solche bildverarbeitungsbasierten Algorithmen insbesondere im Bereich der Prozessüberwachung für die Qualitätssicherung zum Einsatz kommen und dass diese immer in Abhängigkeit von der zu erfüllenden Aufgabe realisiert werden.

Als bedeutendste Neuerung ist das Konzept der optisch kontrollierten Steuerung der Manipulationseinheit in der XY-Ebene (Anwendung der planaren Positionskoordinatenbestimmung mittels Werkzeugdetektion) und in der Z-Ebene (über die Fokussierung und das „Image-Stacking“) zu betrachten.



6.1.4 Manipulationseinheit

Die Entscheidung für die Nutzung eines Mikromanipulators zur mechanischen Manipulation als reine Handhabung und Unterstützung der Prozesse und nicht als Zellmanipulation zum Eingriff in die Zellen wurde auf Grundlage der anstehenden Aufgaben getroffen. Es gilt Mikrosysteme mittels Scaffolds zu kompletieren und Transport- und Positionierungsprozesse im Inneren der Kulturkammer durchzuführen. Dafür erweisen sich die Mikromanipulatoren der Firma Kleindiek® als geeignet. In Abschnitt 4.5.6 ist die durchgeführte Versuchsreihe zur Manipulation bereits dargestellt worden.

Besonders bedeutsam ist die Verknüpfung der Funktionen der Beobachtungseinheit mit der Manipulationseinheit. Das ist in Verknüpfung mit der Anwendung in einem Mikrosystem eine Lösung, die bisher nicht existierte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte exemplarisch gezeigt werden, dass diese Methode technisch umsetzbar ist und in der Biomikrosystemtechnik zur Steuerung der Manipulation genutzt werden kann. Weiteres Optimierungspotential besteht jedoch insbesondere die Steuerung der Manipulation in der Z-Ebene betreffend. Die bisher vorgestellte Lösung mittels der Fokussierung in Kombination mit der motorisierten Tischhöhenverstellung ist nur für eine Teilautomatisierung der Steuerung geeignet.

6.1.5 Software

NI-LabView® ist eine geeignete Plattform für den in der Entwicklung befindlichen Laborbetrieb eines solchen MZKS und dessen Peripherie. Das Ansteuern unterschiedlicher Schnittstellen (RS232, IEEE1349b, USB) zur Steuerung und Kontrolle der Funktionseinheiten ist einfach möglich. Für standardisierte Anwendungen, komplexere Steueralgorithmen und die Kombination mehrerer in einander übergreifender Funktionseinheiten ist eine Umsetzung auf der Basis einer Programmiersprache wie z. B. „C/C++“ zu empfehlen. So sind schnellere Programmabläufe möglich und die strukturierte Vorgehensweise kann besser umgesetzt werden.



6.1.6 Technische Funktion des Gesamtsystems

Abbildung 54 zeigt den Aufbau des Gesamtsystems inklusive aller Teilkomponenten und Funktionseinheiten. Die zuvor teilweise einzeln dargestellten Funktionsweisen und Tests sind auch als Gesamtsystem uneingeschränkt durchführbar. Für zukünftige Arbeiten ist eine Reduktion des „Bauraumes“ vorzusehen, vor allem unter dem Aspekt der Mobilität des Gesamtsystems und der geringen Größe der eigentlich interessierenden Strukturen, der Zellen.

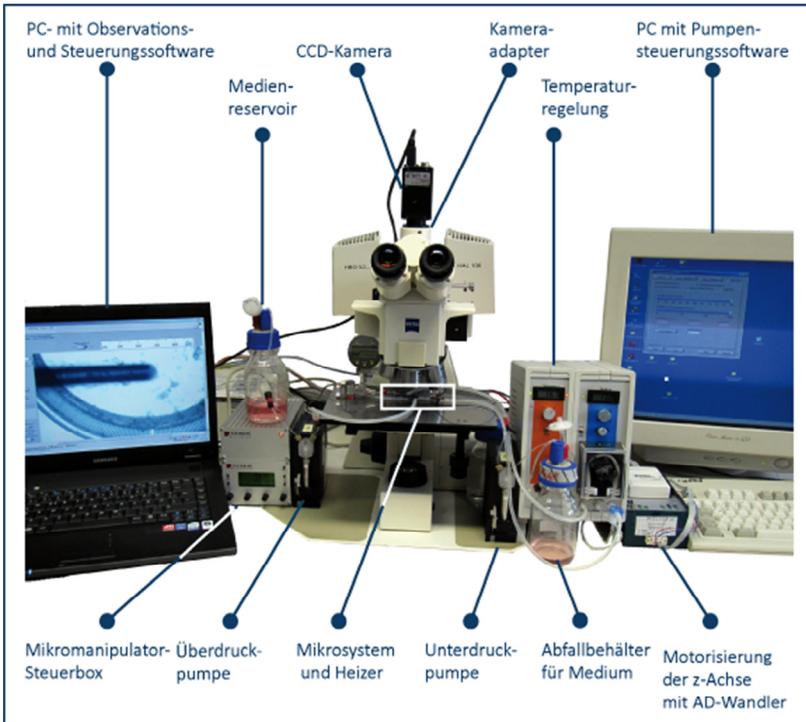


Abbildung 54: Aufbau des Gesamtsystems zur Überprüfung der technischen Funktionen aller Teilkomponenten in Kombination

6.2 Ergebnisse der Anwenderstudien in variierenden Anwendungssituationen

Die geschaffene Plattform wurde bereits frühzeitig für die Durchführung sehr unterschiedlicher Zell-Experimente eingesetzt. Sie ist dank der engen Zusammenarbeit mit den verantwortlichen Biologen und Medizinerinnen an die Ansprüche unterschiedlicher Zellarten und die Ansprüche der Nutzer und Laborbedingungen anpassbar.

Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt:

6.2.1 Biokompatibilitätsversuche mit der standardisierten Fibroblasten Zelllinie MC3T3-E1

Die Fibroblasten Zelllinie kommt in allen Partnerinstituten des Fachgebietes Biomechatronik zum Einsatz (INNOVENT e.V Technologieentwicklung Jena, Institut für Bioprozess-und Analysemesstechnik e.V Heilbad Heiligenstadt (iba), Klinikum der Friedrich Schiller Universität (FSU) Jena). Um die Biokompatibilität aller mit den Zellen in Kontakt kommenden Systemkomponenten (Materialien, Oberflächen) und der durchgeführten Prozesse nachzuweisen, wurden unter herkömmlichen Bedingungen Besiedelungen mit MC3T3-E1-Zellen ohne Perfusion in statischer Kultur durchgeführt. Dabei zeigten sich insbesondere in der Kulturkammer des Mikrosystems gute Ergebnisse in Form eines dichten Zellrasens bereits nach 72 Stunden (

Abbildung 55). Die Eignung der Komponenten konnte so nachgewiesen werden. Für weitere Ausführungen sei auf Fischer et. al. (2010) verwiesen.

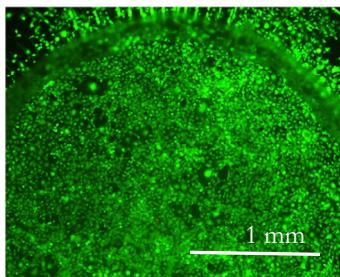


Abbildung 55: Biokompatibilitätsversuche mit MC3T3-E1 Zellen
Über die Öffnung im Glasdeckel wurden Fibroblasten der Maus (MC3T3-E1) mit einer Pipette in das, mit Medium befüllte, in einer Petri-Schale liegende Mikrosystem eingebracht. Dichter Zellrasen in der Kulturkammer und auch in den Siebstrukturen und Kanälen nach 72 Stunden im Inkubator erkennbar.

6.2.2 Erste Funktionstests der Mikrosysteme für die Scaffold-Integration mit primären bovinen Chondrozyten

Am iba werden bovine Chondrozyten auf 2PP-erzeugten Scaffoldstrukturen zur Erprobung geeigneter Materialien und Strukturen kultiviert. Das Gesamtsystem wurde ohne die Manipulationseinheit unter dem 2PLSM aufgebaut (Abbildung 56a). 72 Stunden im Inkubator vorkultivierte Scaffolds wurden mit der beschriebenen Methode in das Mikrosystem integriert (Abbildung 56b). Es gelang, die Kultur für ca. vier Stunden stabil zu betreiben. Danach kam es zu vermehrter Blasenbildung in der Kulturkammer.

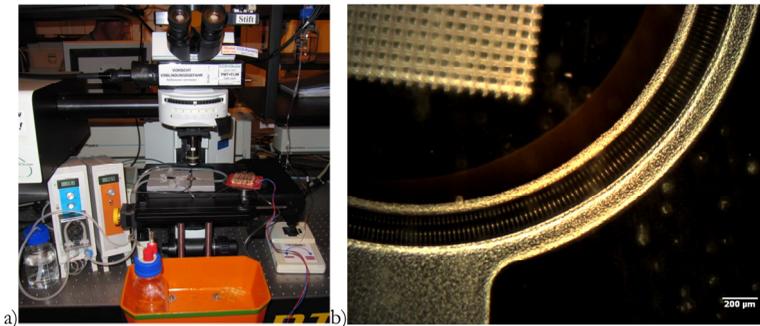


Abbildung 56: Abbildung: Versuche mit bovinen Chondrozyten auf Scaffolds im MZKS
 a) Versuchsaufbau unter 2PLSM am iba
 b) in das mit Kulturmedium befüllte Mikrosystem eingebrachter „woodpile“-Scaffold aus Ormocere®



6.2.3 Ansiedelung anspruchsvoller Monolayerkulturen mit humanen primären Osteoblasten

Zur Untersuchung krankhafter Prozesse wird Patienten des Klinikums der FSU Jena Knochengewebe aus dem Knie entnommen. Daraus werden primäre humane Osteoblasten gewonnen. Die Kultivierung dieser Zellen wurde seitens der Wissenschaftler der Arbeitsgruppe um Professor Hofmann etabliert. Es gelang, diese als sensibel eingestuften Zellen (nach einer Vorkultivierung auf einem Siliziumzellträger für 72 Stunden im Inkubator) in das MZKS zu integrieren. Für insgesamt vier Tage konnten diese erfolgreich extern ohne Inkubator mittels Kolbenhubpumpen im Saugbetrieb versorgt werden. Die Abbildung 57 belegt, dass sich die Zellen dabei deutlich vermehrten und gute Adhärenz zeigten. Eine mikroskopische Beobachtung in Echtzeit erfolgte bei diesen Versuchen nicht.

Vergleichbare Ergebnisse dieser Qualität mit primären humanen Osteoblasten in MZKS sind nicht bekannt.

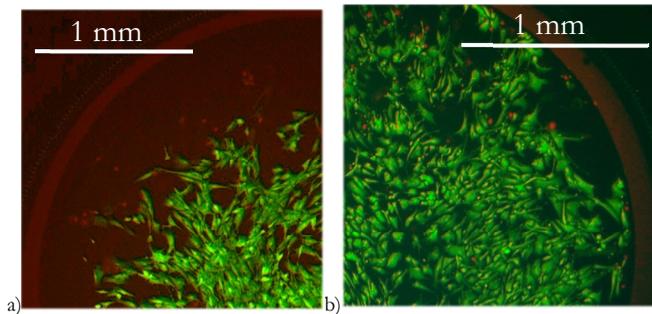


Abbildung 57: Primäre Humane Osteoblasten auf Siliziumzellträger in das MZKS integriert und mittels Kolbenhubpumpen versorgt

- a) Live-Dead-Färbung nach 24 Stunden, adhärenz Zellen nur auf der Kulturfläche erkennbar
 b) Live-Dead-Färbung nach 96 Stunden, deutliche Zunahme der Anzahl an adhärenzhaften Zellen

Das angestrebte Teilziel, Zellen stabil in einem MZKS zu kultivieren, wurde erreicht. Es gelang, die zum Gesamtsystem gehörenden peripheren Funktionsmodule Versorgungs-einheit, Beobachtungseinheit und Manipulationseinheit erfolgreich in Betrieb zu nehmen.

Die Versuche mit biologischem Material erfolgten in den Laboratorien der jeweiligen Anwender unter variablen Bedingungen. Die Manipulationseinheit wurde bisher im Betrieb mit Zellen nicht getestet, da die Sterilität und das stabile Kulturergebnis immer im Vordergrund der Versuchsreihen standen. Für die Handhabung der Scaffolds kam die Manipulationseinheit jedoch zum Einsatz.

6.3 Reizapplikationsmethoden und Vorschläge für deren Umsetzung im Mikrosystem für mechanische Reize

Das aufgebaute System eignet sich zur Entwicklung und Erprobung diverser Varianten zur Applikation mechanischer Reize auf Zellen. In der Literatur werden Methoden dargestellt und in erster Linie makroskopische Systeme beschrieben. Forschungsbedarf wurde vor allem im Bereich der mikrosystemtechnischen Realisierungen festgestellt. Auf Basis des MZKS und dessen peripheren Funktionsmodulen wurden eine Realisierung zur Kompressionsbeanspruchung, die strömungsmechanische Realisierung, die Kombination beider Realisierungen und eine Realisierung mittels integrierter verformbarer Membranen vorgeschlagen. Alle Prinzipien sind technisch umsetzbar. Den größten Variantenreichtum an applizierten Reizprofilen bieten die Kombinationsvarianten, denn damit könnten die unterschiedlichsten physiologischen und unphysiologischen Belastungssituationen getestet werden. Die technische Umsetzung der Realisierungsvorschläge würde die Möglichkeit zur Bearbeitung zellulärer Fragestellungen zur Osteo(neo)genese bieten und eine neue Qualität an Versuchen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen erlauben.



6.4 Schlussfolgerung

Ein MZKS erlaubt die effektive Kultivierung diverser Zellen als Monolayer oder auf integrierten dreidimensionalen Trägerstrukturen. Es ist auf Basis der entwickelten Mikrosysteme möglich Verfahren zur definierten Reizapplikation zu integrieren. Ob die vorgeschlagenen Methoden auch in der praktischen Anwendung die Forderungen erfüllen können, muss anhand von Simulationen und Versuchsreihen ermittelt werden.

Die entwickelten peripheren Module ermöglichen die Versorgung, Beobachtung und Manipulation der Zellen und auch der technischen Komponenten. Jedoch muss an der Optimierung der Versorgungskette gearbeitet werden, um die Bedingungen im Inneren der Kultivierungskammer besser an die Bedürfnisse der jeweiligen Zellarten anzupassen. Das betrifft insbesondere die Bildung von Luftblasen im verwendeten Medium. Zu erwähnen ist hier ebenfalls der Wunsch der Anwender nach einer Parameterkontrolle für die Temperatur, den Druck und den Betriebsstatus der Pumpen sowie die Integration einer automatisierten Bilderfassung inklusive der Zu- und Abschaltung des Mikroskops.

Die Bildverarbeitung bietet neben den bereits zum Einsatz kommenden Verfahren viele Möglichkeiten, die Leistungsfähigkeit der optischen Beobachtungseinheit deutlich zu erweitern. Das gilt unter anderem für die Manipulation in der dritten Dimension, die Beurteilung morphologischer Parameter der Zellen und auch für die Erfassung biomechanischer Zellparameter.

Die Kombination der medizinischen und biologischen Forschung mit den Erkenntnissen der Ingenieurwissenschaften ermöglicht die Schaffung neuer Werkzeuge für die Zellkultivierung und Zellforschung. Damit wird es möglich, detaillierte Untersuchungen an Proliferations- und Differenzierungsprozessen gewebebildender Zelllinien durchzuführen und therapeutische Ansätze abzuleiten.





Literaturverzeichnis

- Abbott, J. J., Nagy, Z., Beyeler, F. und Nelson, B. J.** (2007). Robotics in the small. *IEEE Robotics and Automation Magazine* 14, 92–103.
- Addae-Mensah, K. A. und Wiksw, J. P.** (2008). Measurement techniques for cellular biomechanics in vitro. *Experimental Biology and Medicine* 233, 792–809.
- Ali, M. H. und Schumacker, P. T.** (2002). Endothelial responses to mechanical stress where is the mechanosensor? *Crit Care Med* 30.
- Ashkin, A.** (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters* 24, 156–159.
- Beebe, D., Wheeler, M., Zeringue, H., Walters, E. und Raty S.** (2002). Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology* 57, 125–135.
- Berek, M.** (1927). Grundlagen der Tiefenwahrnehmung im Mikroskop. Marburger Sitzungsberichte 61, 189–223.
- DIN-EN 10993-5** (2009). Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität(DIN-EN 10993-5). Berlin: Beuth Verlag.
- Böswirth, L.** (2005). Technische Strömungslehre. Lehr- und Übungsbuch ; mit 30 Tabellen. Wiesbaden: Vieweg.
- Böttcher, M.** (2005). Gravitationsgetriebene Lab-On-Chip-Systeme. In *Proceedings BMT 2005*.
- Brehm-Stecher, B. F. und Johnson, E. A.** (2004). Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 538–559.
- Brevig, T., Krühne, U., Kahn, R. A., Ahl, T., Beyer, M. und Pedersen, L. H.** (2003). Hydrodynamic guiding for addressing subsets of immobilized cells and molecules in microfluidic systems. *BMC Biotechnology* 3.
- Bronstein, I. N., Semendjajew, K. A., Musiol, G. und Mühlig, H.** (2008). Taschenbuch der Mathematik. Frankfurt am Main: Deutsch.
- Brown, T. D.** (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics* 33, 3–14.
- Buerkele, A., Schmoedel, F., Kiefer, M., Amavasai, B. P., Caparelli, F., Selvan, A. und Travis, J. R.** (2001). Vision-based closed-loop control of mobile microrobots for microhandling tasks. In *Microrobotics and microassembly III. 29 - 30 October 2001, Newton, USA* (ed. B. J. Nelson), 187–198.
- Buican, T. N., Smyth, M. J., Crissman, H. A., Salzman, G. C., Stewart, C. C. und Martin, J. C.** (1987). Automated single-cell manipulation and sorting by light trapping. *Applied Optics* 26, 5311–5316.
- Cao, J., Usami, S. und Dong, C.** (1997). Development of a side-view chamber for studying cell-surface adhesion under flow conditions. *Annals of Biomedical Engineering* 25, 573–580.
- Carter, D. R. und Beaupré, G. S.** (2001). Skeletal function and form. *Mechanobiology of skeletal development, aging, and regeneration*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Chan, T. F. und Vese, L. A.** (2001). Active contours without edges. *IEEE Transactions on Image Processing* 10, 266–277.
- Chang, W. J., Akin, D., Sedlak, M., Ladisch, M. R. und Bashir, R.** (2003). Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and silicon hybrid biochip for bacterial culture. *Biomedical Microdevices* 5, 281–290.

- Charati, S. G. und Stern, S. A.** (1998). Diffusion of gases in silicone polymers: molecular dynamics simulations. *Macromolecules* 31, 5529–5535.
- Cheng, J. und Rajapakse, J. C.** (2009). Segmentation of clustered nuclei with shape markers and marking function. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 56, 741–748.
- Choi, Y., Ross, J., Wester, B. und Allen, M. G.** (2008). Mechanically driven microweeders with integrated microelectrodes. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18.
- Chronis, N. und Lee, L. P.** (2004). Polymer MEMS-based microgripper for single cell manipulation. In *Proceedings : Maastricht Exhibition and Congress Centre, Maastricht, the Netherlands*, 17–20.
- Chrush, D. D. und Podaima, B. W.** (2002). Cytobots: intracellular robotic manipulators. In *Conference proceedings. IEEE CCECE 2002, May 12 to 15, 2002, Hotel Fort Garry, Winnipeg, Manitoba, Canada* (ed. W. Kinsner), 1640–1645.
- Claes L., Wolf, S. und Augat, P.** (2000). Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung. *Der Chirurg* 71, 989–994.
- Cloppet, F. und Boucher, A.** (2008). Segmentation of overlapping/aggregating nuclei cells in biological images. In *19th International Conference on Pattern Recognition, 2008. ; 8 - 11 Dec. 2008, Tampa, Florida, USA*.
- Codourey, A., Zesch, W., Büchi, R. und Siegwart, R.** (1995). A robot system for automated handling in micro-world. In *Human robot interaction and cooperative robots.; August 5 - 9, 1995, Pittsburgh, Pennsylvania USA*, 185–190.
- Darell, T. und Wohn, K.** (1988). Pyramid based depth from focus. *Proceedings of IEEE Computer Vision and Pattern Recognition*, 504–509.
- Desai, J. P. und Pillarisetti, A.** (2007). Robotics for life science automation. In *Life science automation. Fundamentals and applications* (ed. M. Zhang). Norwood, Mass.: Artech House.
- Di C., D., Aghdam, N. und Lee L. P.** (2006). Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays. *Analytical Chemistry* 78, 4925–4930.
- Di Carlo, D., Wu, L. Y. und Lee Luke P.** (2006). Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* 6, 1445–1449.
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A. und Liotta, L. A.** (1996). Laser capture microdissection. *Science* 274, 989–1001.
- Fischer, R., Steinert, S., Fröber, U., Voges, D., Stubenrauch, M., Hofmann, G.O. und Witte, H.** (2010). Cell cultures in microsystems – biocompatibility aspects. (eingereicht)
- Focht, D. C.** (1996). Live-cell microscopy environmental control for mammalian specimens. *Nature Biotechnology* 14, 361–362.
- Fröber, U., Lehmann S. V., Würfel R., Mämpel, J., Stubenrauch, M. und Witte, H.** (2009a). Automated control of micromanipulators - a tool for BioMEMS based cell culture. *IEEE Symposium on Industrial Electronics & Applications*.
- Fröber, U., Stubenrauch, M., Voges, D., Berg, A., Weiß, T., Hoffmann, M. und Witte, H.** (2009b). Bio-microsystem for cell-cultivation and manipulation and its peripherals. In *IFBME Proceedings, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009 Munich, Germany* (ed. O. Dössel), 2384. Berlin: Springer.
- Fröber, U., Stubenrauch, M., Weiß T., Voges, D., Berg, A., Schade, R., Hildebrand, G., Schnabelrauch, M., Liefeth, K., Hoffmann, M. et al.** (2009c). Integration of scaffolds into

bio-microsystems for experiments in tissue engineering. In *Smart Systems Integration 2009* (ed. Gessner T.). Heidelberg: AKA Verlag Heidelberg.

Fröhlich, J. und König, H. (2000). New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 567–572.

Geigl, J. und Speicher, M. (2008). Neue Verfahren für Einzelzellanalysen in Forschung und Diagnostik. *Medizinische Genetik* 20, 407–415.

Gonzalez, R. C., Woods, R. E. und Eddins, S. L. (2009). *Digital image processing using MATLAB*. Upper Saddle River, NJ: Pearson/Prentice Hall.

Gosse, C. und Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal* 82, 3314–3329.

Greching, W., Fellingner, M. und Peicha, G. (182). *Grundlagen der Fixateur-externe-Montage*. *European Surgery* 34, 29–32.

Grodozinsky, A. J., Levenston, M. E., Jin, M. und Frank, E. H. (2000). Cartilage tissue remodelling in response to mechanical forces. *Annual Review in Biomedical Engineering* 2, 691–713.

Häusler, G. (1972). A method to increase the depth of focus by two step image processing. *Optics Communications* 6, 38–42.

Hegelmaier, C. (1993). *Biomechanische Aspekte der Knochenbruchheilung unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten Mikrobewegungen im Frakturspalt*. Habilitation, Ruhr-Universität Bochum. Bochum.

Hentschel, E. J. und Wagner, G. H. (1990). *Zoologisches Wörterbuch. Tiernamen, allgemeinbiologische, anatomische, physiologische Termini und biographische Daten*. Jena: Fischer.

Herberhold, C., S. Faber, S., Stammberger, T., Steinlechner, M., R. Putz, R. und Englmeier, K. H. (1999). In situ measurement of articular cartilage deformation in intact femoropatellar joints under static loading. *Journal of Biomechanics* 32, 1287–1295.

Hesse, A., Mrotzek, S., Hülsenberg, D., Rädlein, E. (2008). High aspect ratio glass structures produced by means of the drawing technology. *Microsystem Technology*, 14, 1541–1544.

Hickory, W. B. und Nanda, R. (1987). Effect of tensile force magnitude on release of cranial suture cells into S phase. *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopaedics* 91.

Hing, W. A., Poole, C. A. und Jensen, C. G. W. M. (2000). An integrated environmental perfusion chamber and heating system for long-term, high resolution imaging of living cells. *Journal of Microscopy* 199, 90–95.

Hodneland, E., Bukoreshltiev, N. V., Eichler, T. W., Tai, X. C., Gurke, S., Gerdes, L. A. und Gerdes, H. H. (2009). A unified framework for automated 3-d segmentation of surface-stained living cells and a comprehensive segmentation evaluation. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 28, 720–738.

Hohmann, M., Schmelz, M., Wurzinger, H. und Schwesinger, M. (1999). Anschlussträger für plattenförmige Mikrokomponenten (EP 1 413 776 A2).

Hsieh, C. C., Huang, S. B., Wu, P. C., Shieh, D. B. und Lee, G. B. (2009). A microfluidic cell culture platform for real-time cellular imaging. *Biomedical Microdevices* 11, 903–913.

Huang, C. W. und Lee, G. B. (2007). A microfluidic system for automatic cell culture. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17, 1266–1274.

Hung, P. J., Lee, P. J., Sabounch, P., Aghdam, N. und Lin, R. (2005). A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. *Lab on a Chip* 5, 44–48.

- Hung, P. J., Lee P. J., Sabounch P., Lin, R. und Lee L. P.** (2004). Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 1–8.
- Ikegame, M., Ishibashi, O., Yoshizawa, T., Shimomura, J., Komori, T., Ozawa, H. und Kawashima, H.** (2001). Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 24–32.
- Ince, C. und Beekman, R. E. V. G.** (1990). A micro-perfusion chamber for single-cell fluorescence measurements. *Journal of Immunological Methods* 128, 227–234.
- Indebetouw, G. und Bai, H.** (1980). Imaging with fresnel zone pupil masks: extended depth of field. *Applied Optics* 23, 4299–4302.
- Iribe, G., Helmes, M. und Kohl, P.** (2007). Force-length relations in isolated intact cardiomyocytes subjected to dynamic changes in mechanical load. *American Journal of Heart Circulatory Physiology* 292, 1487–1497.
- Ishoy, T., Kvist, T., Westermann, P. und Ahring, B. K.** (2006). An improved method for single cell isolation of prokaryotes from meso-, thermo- and hyperthermophilic environments using micromanipulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 510–514.
- Jager, E. W. H., Immerstrand, C., Holmgren Peterson, K., Magnusson, K. E., Lundström, I. und Inganäs, O.** (2002). The cell clinic: closable microvials for single cell studies. *Biomedical Microdevices* 3, 177–187.
- Johansson, S.** (1995). Micromanipulation for micro- and nanomanufacturing. In *Proceedings of the ETFA, 3–8. Paris, France.*
- Kachouie, N. N., Fieguth, P. und Jervis, E.** (2008). Watershed deconvolution for cell segmentation. In 30th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2008.; 20 - 25 Aug. 2008, *Vancouver, Canada*, 375–378.
- Kallenbach, E.** (1981). Präzisionsrobotertechnik. Erfurt: VEB Druckerei Fortschritt Erfurt.
- Kaneda, K., Ishida, S., Ishida, A., Nakamae und E.** (1992). Image processing and synthesis for extended depth of field of optical microscopes. *The Visual Computer* 8, 351–360.
- Kawaji, A., Arai, F. und Fukuda, T.** (1999). 3d calibration of bio-micromanipulator with local illumination. In *Engineering solutions for the next millennium.* (ed. M. Meng), 1431–1436.
- Kawase, Y., Tachibe, T., Hani, T., Tateishi, H., Jishage, K. I. und Suzuki, H.** (2009). Effect of zona incision by piezo-micromanipulator (ZIP) in vitro fertilization in 21 transgenic mice lines. *Experimental Animals* 58, 415–419.
- Kim, D. H., Yum, S. und Kim, B.** (2004). Mechanical force response of single living cells using a microrobotic system. *Proceedings of the International Conference on Robotics & Automation*, 5013–5018.
- Klank, H., Kutter, J. P. und Geschke, O.** (2002). CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems. *Lab on a Chip* 2, 242–246.
- Kleindiek Nanotechnik GmbH** (2006). System Manual, MM3A Micromanipulator System.
- Kochel, M. B.** (2004). Tissue engineering von Knochen - Entwicklung eines Zweikreis-Perfusionssystems für die Langzeitkultivierung von Knochenzellen in einer dreidimensionalen Matrix. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Würzburg.
- Kuijper, A. und Heise, B.** (2008). An automatic cell segmentation method for differential interference contrast microscopy. In 19th International Conference on Pattern Recognition, 2008.; 8 - 11 Dec. 2008, *Tampa, Florida, USA.*

- Kwon, Y. U.** (2001). Visuell unterstütztes Lageregelungssystem für Industrieroboter. Dissertation, Techn. Univ. Berlin, 2001. Berlin: IPK.
- Lacroix, D. und Prendergast, P. J.** (2002). A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *Journal of Biomechanics* 35, 1163–1171.
- Leclerc, E., Sakai, Y. und Fuji, T.** (2003). Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices* 5, 109–114.
- Lehoux, S. und Tegudi, A.** (2003). Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *Journal of Biomechanics* 36, 631–643.
- Li, S., Floriano, P. M., Christodulides, N., Fozdar, D. Y., Shao, D., Ali, M. F., Dharshan, P., Mohanty, S., Neikirk, D. et al.** (2005). Disposable polydimethylsiloxane/silicon hybrid chips for protein detection. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 574–580.
- Lin, G. W. V. I., Hainley, R. E., Flanagan, L. A., Monuki, E. S. und Tang, W. C.** (2004). Development of a MEMS microsystem to study the effect of mechanical tension on cerebral cortex neurogenesis. In *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS; 1 - 5 September 2004, San Francisco, California* ; 2607–2610.
- Lindl, T. und Gstraunthaler, G.** (2008). Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Liu, X., Kim, K., Zhang, Y. und Sun, Y.** (2009). Nanonewton force sensing and control in microrobotic cell manipulation. *The International Journal of Robotics Research* 28, 1065–1076.
- Luo, C., Li, H., Xiong, C., Peng, X., Kou, Q., Chen, Y., Ji, H. und Ouyang, Q.** (2007). The combination of optical tweezers and microwell array for cells physical manipulation and localization in microfluidic device. *Biomedical Microdevices* 9, 573–578.
- Messerer, P., Halfmann, H., Czichy, M., Schulze, M. und Awakowicz, P.** Plasma Sterilisation and Surface Modification of Thermolabile Materials. In *TMS 2005 - Annual Meeting, San Francisco, California*.
- Minuth, W. W., Denk, L. und Glashauser, A.** (2010). A modular culture system for the generation of multiple specialized tissues. *Biomaterials* 31, 2945–2954.
- Minuth, W. W. und Strehl, R.** (2007). Technical and theoretical considerations about gradient perfusion culture for epithelia used in tissue engineering, biomaterial testing and pharmaceutical research. *Biomedical Materials* 2, R1-R11.
- Minuth, W. W., Strehl, R. und Schuhmacher K.** (2002). *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*. Lengerich: Pabst Science Publishers.
- Mitsubishi, M., Kobayashi, K., Nagao, T., Hatamura, Y., Sato, T. und Kramer, B.** (1993). Development of tele-operated micro-handling / machining system based on information transformation. In *IROS '93. Proceedings of the 1993 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems: Intelligent Robots for Flexibility, July 26-30, 1993, Yokohama, Japan*, 1473–1478.
- Moriguchi, H., Wakamoto, Y., Sugio, Y., Takahashi, K., Inoue, I. und Yasuda, K.** (2002). An agar-microchamber cell-cultivation system: flexible change of microchamber shapes during cultivation by photothermal etching. *Lab on a Chip* 2, 125–132.
- Nakao, M., Tsuchiya, K., Matsumoto, K. und Hatamura, Y.** (2001). Micro Handling with Rotational Needle-type Tools under Real Time Observation. *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 50, 9–12.
- Nasr-Isfahani, S., Mirsafian, A. und Masoudi-Nejad, A.** (2008). A new approach for touching cells segmentation. In *Proceedings of the first international symposium on software testing, verification and validation. April 9 - 11, 2008, Lillehammer, Norway*, 816–820.

- Nelson, B. J., Dong, K. und Arai, F.** (2008). Micro/Nanorobots. In Springer Handbook of Robotics, pp. 411–450. Berlin, Heidelberg: Springer Science+Business Media.
- Okabayashi, M., Kikuchi, S. und Ohyama, N. H. T.** (1989). Increasing focal depth of reflecting microscope images by synthetic method. *The Visual Computer* 8, 351–360.
- Otto, L.** (1954). *Der Mikromanipulator und seine Hilfsgeräte*. Berlin: VEB Verlag Technik Berlin.
- Owan, I., Burr, D. B., Turner, C. H., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J. E. und Duncan, R. L.** (1997). Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *American Journal of Physiology and Cell Physiology* 273, C810–C815.
- Padfield, D., Rittscher, J. und Roysam, B.** (2008). Spatio-temporal cell segmentation and tracking for automated screening. In 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: from Nano to Macro, 2008. 14 - 17 May 2008, Paris, France; 376–379.
- Paetzold, H., Morlock, M. M. und Schilling, A. F.** (2009). Gezüchteter Knorpel braucht Bewegung - Wie Belastung bei Kultivierung die Knorpelqualität verbessert. *Bioforum* 5, 33–35.
- Penzlin, H.** (1991). *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Jena: Fischer.
- Pieper R.J. und Korpel A.** (1983). Image processing for extended depth of focus. *Applied Optics* 22, 1449–1453.
- Powers, M. J., Domansky, K., Kaazempur-Mofrad, M. R., Kalezi, A., Capitano, A., Upadhyaya, A., Kurzawski, P., Wack, K. E., Stolz, D. B., Kamm, R. et al.** (2002). A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 257–269.
- Prokop, A., Prokop, Z., Schaffer, D., Kozlov, E., Wikswo, J., Cliffel, D. und Baudenbbbacher, F.** (2004). NanoLiterBioReactor: Long-term mammalian cell culture at nanofabricated scale. *Biomedical Microdevices* 6, 325–339.
- Rau, T. S.** (2009). Optimierungspotentiale für das Einwachsverhalten lasttragender Implantate in Knochengewebe. Eine strukturierte, biomechanische Analyse regenerativer und adaptiver Fähigkeiten des Knochens. Techn. Univ., Diplomarbeit--Ilmenau, 2005. Ilmenau: Univ.-Verl. Ilmenau.
- Rotem, A., Toner, M., Tompkins, R. G. und Yarmush, M. L.** (2004). Oxygen uptake rates in cultured rat hepatocytes. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 1286–1291.
- Rüedi, T. P., Murphy, W. M., Renner, M. und Fackelman, G. E.** (2000). AO principles of fracture management. [AO teaching videos on CD-ROM included]. Stuttgart: Thieme.
- Saliterman, S. S.** (2006). *Fundamentals of BioMEMS and medical microdevices*. Bellingham, WA: SPIE Press.
- Sang, S., Fröber, U. und Witte, H.** (2009). Concept of a microfluidics and tunneling effect-based BioMEMS to detect cells. *Weltkongress Medizintechnik In IFBME Proceedings, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009 Munich, Germany* (ed. O. Dössel), 2384. Berlin: Springer.
- Sanpanich, A., Woranut I., Pintavirooj, C. und Tosranon, P.** (2008). White blood cell segmentation by distance mapping active contour. In *International Symposium on Communications and Information Technologies, 21 - 23 Oct. 2008*. Piscataway, NJ: IEEE.
- Schilling, C., Fröber, U., Fischer, R., Stubenrauch, M., Hoffmann, M. und Witte, H.** (2010). Werkstoffmix für BioMEMS - Interaktion von Bio-Mikrosystemen mit deren Werkstoffen. In *Thüringer Werkstofftag 2010. Technische Universität Ilmenau, 24. März 2010 ; wissenschaftliche Beiträge* (ed. L. Spieß, E. Rädlein and P. Schaaf), 109–114. Ilmenau: Univ.-Verl. Ilmenau.
- Schmitz, S.** (2009). *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

- Seide, K., Schümann, U. und Jürgens, C.** (2005). Klinische Erfahrungen mit dem computergesteuerten Hexapodfixateur. *Trauma und Berufskrankheit* 7, 148–152.
- Serrell, D. B., Law, J., Slifka und A. J.** (2008). A Uniaxial bioMEMS device for imaging single cell response during quantitative force-displacement measurements. *Biomedical Microdevices* 10, 883–889.
- Shermann, F.** (1973). Micromanipulator for Yeast Genetic Studies. *Applied Microbiology* 26, 829.
- Siekmann, H.E. und Thamsen, P.U.** (2007). *Strömungslehre. Grundlagen.* ISBN 978-3-540-73727-8. Springer Berlin.
- Skerman, V. B. D.** (1968). A New Type of Micromanipulator and Microforge. *Journal of General Microbiology* 54, 287–297.
- SPECTARIS Deutscher Industrieverband für optische, m. u. m. T. e. V.** (2008). Mikroskopische Schärfentiefe. *BioPhotonik - Optische Technologien in den Live Sciences*, 36–37.
- Spero, R. C., Vicci, L., Cribb, J. B. D., Swaminathan, V., O'Brien, E. T., Rogers, S. L. und Superfine, R.** (2008). High throughput system for magnetic manipulation of cells, polymers, and biomaterials. *Review of Scientific Instruments* 79.
- Stangegaard, M., Petronis S., Jorgensen A. M., Christensen C. B. V. und Dufva M.** (2006). A biocompatible micro cell culture chamber for the culturing and online monitoring of eukaryote cells. *Lab on a Chip* 6, 1045–1051.
- Stubenrauch, M., Fischer, F., Kremin, C., Lilienthal, K., Fröber, U., Voges, D., Witte, H. und Hoffmann, H., eds.** (2007). 'Black Silicon' - einstellbare Nanostrukturen mit neuen Applikationsfeldern. 3. Thüringer Grenz- und Oberflächentage: INNOVENT e.V., Jena.
- Stubenrauch, M., Fröber, U., Fischer, M., Kremin, C., Lilienthal, K., Witte, H. und Hoffmann, M., eds.** (2009a). Fertigungsinnovation: Kletten statt Kleben. 3. MATERIALICA Surface Kongress.
- Stubenrauch, M., Fröber, U., Fischer, M., Kremin, C., Witte, H. und Hoffmann, M.** (2009b). Klebe- und klemmfreies Anschlusskonzept für mikrofluidische Systeme mittels nanostrukturierter Oberflächen. *GMM-Fachbericht Mikro-Nano-Integration CD-ROM*.
- Stubenrauch, M., Fröber, U., te Boekhorst L, Voges, D., Hoffmann, M. und Witte, H.** (2009c). How to connect 23 tube to a 4x4mm microchip? 20th MicroMechanics Europe Workshop.
- Stubenrauch, M., Fröber, U., Voges, D., Schilling, C., Hoffmann, M. und Witte, H.** (2009d). A modular BioMEMS platform for new procedures and experiments in tissue engineering. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19.
- Sugimoto, S. A. und Ichioka, Y.** (1985). Digital composition of images with increased depth of focus considering depth information. *Applied Optics* 24, 2076–2080.
- Sung, J. H. und Shuler M. L.** (2009). Prevention of air bubble formation in a microfluidic perfusion cell culture system using a microscale bubble trap. *Biomedical Microdevices* 11, 731–738.
- Suzuki, A., Mae Y., Tanikawa, T., Arai, T. und Inoue, K.** (2003). Automated micro handling. In *Computational intelligence in robotics and automation for the new millennium. 2003 IEEE International Symposium on Computational Intelligence in Robotics and Automation ; July 16 - 20, 2003, Kobe, Japan ; 348–353.*
- Tai, X. C., Hodneland, E., Weickert, J., Bukoreshtliev, N. V., Lundervold, A. und Gerdes, H. H.** (2007). Level set methods for watershed image segmentation. In *SSVM 2007* (ed. F. Sgallari, A. Murli and N. Paragois), 178–190. Berlin-Heidelberg: Springer.

- Tan, W., Scott, D., Belchenko, D., Qi H. J. und Xiao, L.** (2008). Development and evaluation of microdevices for studying anisotropic biaxial cyclic stretch on cells. *Biomedical Microdevices* 10, 869–882.
- Tanikawa, T., Arai, T. und Masuda, T.** (1996). Development of Micro Manipulation System with Two-Finger Micro Hand. In *Robotic intelligence interacting with dynamic worlds. Proceedings of the 1996 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, November 4 - 8, 1996, Senri Life Science Center, Osaka, Japan* (ed. M. Asada), 850–855.
- Thielecke, H., Impidjati, Zimmermann, H. und Fuhr, G. R.** (2005). Gentle cell handling with an ultra-slow instrument: creep-manipulation of cells. *Microsystem Technology*, 11, 1230–1241.
- Thompson, D. M., King, K. R., Wieder, K. J., Toner, M., Yarmush, M. L. und Jayaraman, A.** (2004). Dynamic gene expression profiling using a microfabricated living cell array. *Analytical Chemistry* 76, 4098–4103.
- Toh, Y. C., van Zhang, C., Zhang, J., Khong, Y. M., Chang, S., Samper, V. D., Noort, D., Hutmacher, D. W. und Yu, H.** (2007). A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab on a Chip* 7, 302–309.
- Tourovskaia, A., Figueroa-Masot, X. und Folch, A.** (2005). Differentiation-on-a-chip: A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip* 5, 14–19.
- Tscherepanow, M., Zöllner, F. Z., Hillebrand, M. und Kummert, F.** (2008). Automatic segmentation of unstained living cells in bright-field microscope images. In *MDA 2008* (ed. P. Perner and O. Salvetti), 158–172. Berlin-Heidelberg: Springer.
- Uhlemann, J., Freyer, R., Kühnel, T., Steller, U. und Töpfer, E.** (1999). Biokompatibilität der Funktionswerkstoffe Glas und Silizium. In *Mikro-System-Technik Chemnitz '99. Mikromechanik & Mikroelektronik*; 4. Chemnitzer Fachtagung Mikromechanik & Mikroelektronik, 93–100.
- Valdecasas, A. G., Marschall, D., Becerra, J. M. und Terrero J.J.** (2001). On the extended depth of focus algorithms for bright field microscopy. *Micron* 32, 559–569.
- Villa-Diaz, L. G., Yu-suke Torisawa, Y. S., Uchida, T., Ding, J., Nogueira-de-Souza, N. C., O'Shea K. S., Takayama, S. und Smith, G. D.** (2009). Microfluidic culture of single human embryonic stem cell colonies. *Lab on a Chip* 9, 1749–1755.
- Visscher, K., Brakenhoff, G. J. und Krol, J. J.** (1993). Micromanipulation by "Multiple" Optical Traps Created by a Single Fast Scanning Trap Integrated with the Bilateral Confocal Scanning Laser Microscope. *Cytometry* 14, 105–114.
- Volland, B. E., Ivanova, K., Ivanov, T., Sarov, Y., Guliyev, E., Persaud, A., Zöllner, J. P., St. Klett, Kostic, I. und Rangelow, I. W.** (2007). Duo-action electro thermal micro gripper. *Microelectronic Engineering* 84, 1329–1332.
- Wang, L., Li, Y., Zuo, Y., Zhang, L., Zou, Q. und Cheng, L.** (2009). Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomed. Materials* 4.
- Wang, M. M., Tu, E., Raymon, D. E., Yang, J. M., Zhan, H., Hagen, N., Dees, B., Mercer, E. M., Forster, A. H., Kariv, I. et al.** (2005). Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature Biotechnology* 23, 83–87.
- Wang, W. H., Liu, X. Y. und Sun, Y.** (2007). Contact Detection in Microrobotic Manipulation. *The International Journal of Robotic Research* 26, 821–828.
- Wang, Z., Hu, B.-G., Liang, L. C. und Jig, Q.** (2000). Cell Detection and Tracking for Micromanipulation Vision System of Cell-operation Robot. In *Cybernetics evolving to systems, humans, organizations, and their complex interactions. : SMC 2000 conference proceedings*, 1592–1597.
- Watanabe, T. und Jiang, Z.** (2006). Mechanism of micro manipulation using oscillation. In *Proceedings. May 15 - 19, 2006, [Orlando, Florida]*, 661–668. Piscataway, NJ: IEEE Operations Center.

- Weiß, T., Hildebrand, G., Schade, R. und Liefeth, K.** (2008). Nanoskalige Strukturierung mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) zur Generierung ECM-analoger Biointerphasen. In Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. 14. Heiligenstädter Kolloquium (ed. D. Beckmann and M. Meister), 69–75.
- Welford, W. T.** (1960). Use of annular apertures to increase focal depth. *Journal of the Optical Society of America* 50, 749–753.
- Widjanarko, T. und Hardie, R. C.** (2002). A post-processing technique for extending depth of focus in conventional optical microscopy. *Optics & Laser Technology*, 299–305.
- Witte, H. und Günther, M. M.** (1999). Die Bewegungsanalyse ist das wichtigste Werkzeug der Biomechanik zur Beantwortung klinischer Fragestellungen. Wie wähle ich die richtigen Verfahren und Geräte aus? In Rechnergestützte Verfahren in der Orthopädie (ed. J. N. K. Jerosch and Peikenkamp K.), 121–144. Darmstadt: Steinkopff-Verlag.
- Witte, H., Recknagel S., Kaufmann C., Hegelmaier C., Kozuschek W. und Preuschhof H.** (1999). In vivo-Messung der Relativbewegungen von Fragmenten gebrochener Langknochen. *Biomedizinische Technik* 40(Suppl. 1), 365–366.
- Witte, H. und Schilling, C.** (2008). Biomechatronik: erfolgreiches Konzept. *Mechatronik* 114, 30–33.
- Witte, H., Voges, D., Schwerda, N. S. C. und Fischer, M.** (2003). Eine Beschreibungsgröße für die Gleichförmigkeit zyklischer Bewegungen. In Prävention von arbeitsbedingten Gesundheitsgefahren und Erkrankungen. 9. Erfurter Tage ; (ed. R. Grieshaber), 323–336. Leipzig: Monade Agentur für Kommunikation.
- Würfel, R.** (2008). Steuerung von Mikromanipulatoren: Softwareentwicklung unter NI LabView. Diplomarbeit, Technische Universität Ilmenau. Ilmenau.
- Xie, Z., Chen, G., Lin, W., Yang, K., Chen, J. und Chen, R.** (2008). A new center location algorithm used in cell segmentation. In First International Congress on Image and Signal Processing. 27 - 30 May 2008, Sanya, Hainan, China (ed. D. Li), 610–614.
- Xu, Q. und Li, Y.** (2008). Experimental studies on a micromanipulator for micro/nano manipulation. In IEEE Asia Pacific Conference on Circuits and Systems, 2008. ; Nov. 30, 2008 - Dec. 3, 2008, Macao, China, 754–757.
- Xu, Q., Li, Y. und Xi, N.** (2009). Design, fabrication, and visual servo control of an xy parallel micromanipulator with piezo-actuation. *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering* 6, 710–719.
- Yamamoto, A., Mishima, S., Maruyama, N. und Sumita, M.** (1998). A new technique for direct measurement of shear force necessary to detach a cell from a material. *Biomaterials* 19, 871–879.
- Yanagida, K., Katayose, H., Yazawa, H., Kimura, Y., Konnai, K. und Sato, A.** (1998). The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction* 14, 448–453.
- Yasuda, S. I., Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Katho, K., Saeki, Y., Kaneko, H., Suda, Y., Nagai, R. et al.** (2001). A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers. *American Journal of Heart Circulatory Physiology* 281, 1442–1446.
- Zawadzak, E., Bil, M., Ryszkowska, J., Nazhat, S. N., Cho, J., Bretcanu, O., Roether, J. A. und Boccaccini A. G.** (2009). Polyurethane foams electrophoretically coated with carbon nanotubes for tissue engineering scaffolds. *Biomedical Materials* 4.



Anhang

A1 In Mikrozellkultivierungssystemen verwendete Zellarten

Tabelle 18 In MZKS verwendete Zellarten

Abkürzung	Bezeichnung
293T	human embryonic kidney
A549	carcinomic human alveolar basal epithelial cells
BMSC	bone marrow stromal cells
C2C12	mouse myoblast cell line
Caco-2	caucasian colon adenocarcinoma cell line
Colo-205	colorectal adenocarcinoma cell line
-	Frosch-Melanophore (<i>Xenopus laevis</i>)
H9	human T-cell
HeLa	human cervical carcinoma
Hep G2	hepatocarcinoma
HESBGN-01	human embryonic stem cells
HMVEC-ad	human adult dermal microvascular endothelial cells
Jurkat	human T-cell Leukemia
LLC-MK2	monkey kidney cells
MCF 7	human breast adenocarcinoma cell line
MCF10A	immortal noncancerous mammarised epithelial cells
MeT-5A	human pleural mesothelial cells
OC-2,	human oral cancer cell line
weitere	Hepatozyten und Endothelzellen der Ratte, als Sphäroide 100-150 µm, Humane Makrophagen aus peripheren Blutmonozyten, Escherichia coli mit grün fluoreszierendem Protein Mausfibroblasten, Hybridoma Zellen, Nervenzellen

A2 Zytotoxizität - Schwellwerte

DIN-EN 10993-5 (2009)

0 – Akzeptanz: das Material ist nicht zytotoxisch:

Es sind nicht weniger als 96 % der Zellen vital (grün). Die Zellteilungsaktivität ist normal, d.h. 5 % der Zellen befinden sich in Mitose. Das Zellspreading ist sehr gut und es liegt eine gute Zelldichte bei einem konfluenten Zellrasen vor.

1 – Leichte Hemmung: das Material ist schwach toxisch

In der Zellkultur sind nicht weniger als 96 % der Zellen vital (grün). Es ist eine reduzierte Mitoseaktivität bei normaler Zellstruktur bzw. Zellausbreitung und semikonfluenter bis konfluenter Zelldichte zu beobachten.

2 – Deutliche Hemmung: das Material ist mäßig toxisch

Neben vitalen Zellen ist in der Kultur ein Anteil, größer 4 %, an toten (roten) Zellen zu sehen. Es sind keine Mitosen zu erkennen, bzw. das Zellwachstum ist gehemmt. Die Zelldichte ist dementsprechend semikonfluent bzw. hat sich in den 24 Stunden der Kultivierung nicht verändert. Die Zellen sind schlechter gespreadet, spindelig oder abgekugelt.

3 – Toxizität: das Material ist stark toxisch

Es sind nur noch wenig vitale Zellen zu finden. Die Zellen sind schlecht gespreadet und abgekugelt. Die Mitoseaktivität ist gleich Null. Die Zelldichte ist geringer als vor 24 Stunden, zu Beginn des Tests.

+ 0 – Stimulation: das Material wirkt kanzerogen

Die Zellen sind zu 96 % vital. Die Mitoseaktivität liegt über 5 %. Die Zellen sind nur mäßig gespreadet auf Grund einer hyperkonfluenten Zelldichte.



A4 Datenblatt MCP-D303 (Auszug)

Cooling Smarter and Smaller

Ultra-small thermoelectric coolers with unique pumping performance and dynamics.

Extremely high cooling power density of more than 50 W/cm² and temperature switching on a millisecond level. The patented wafer based micro-structuring process of our thermoelectric thin films make Micropelt Peltier coolers the ideal choice for smart, innovative TEC solutions. Smaller packaging, automatic assembly and attractive economies of scale will make any thermally managed volume product more attractive and reliable.



MPC-D303 on TO46



MPC-D303 on TO5

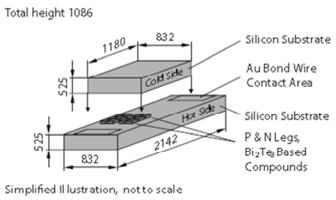
Smallest Possible Package

Micropelt chip-sized thermoelectric coolers offer superior performance in the smallest available foot-print. Supporting thermal management and fast, precise control of low-power and passive devices (e.g. VCSELs and optical components). Second stage cooling on a larger bulk TEC is another ideal scenario.

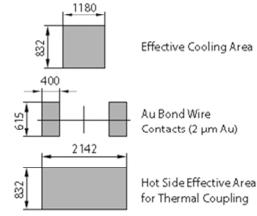
Customizable Properties

Micropelt breaks size and performance limitations of conventional TE coolers. Perfectly adapted designs from < 1 mm² up to 25 mm², each with customizable thermal and electrical properties — including sensor integration — open up new dimensions of thermal management.

MPC-D303 (in μm)



Bonding Area (in μm)



Cooling Smarter and Smaller

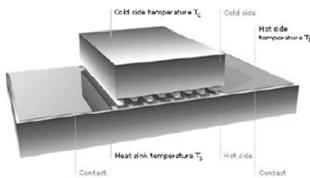
Ultra-small thermoelectric coolers with unique pumping performance and dynamics.

Applications

- Laser temperature management
- Sensor temperature management
- Passive wavelength control devices
- Micro-scale thermal cycling
- Gas sensor temperature control
- Lab-on-Chip
- Technical device characterization
- PCB embedded device cooling

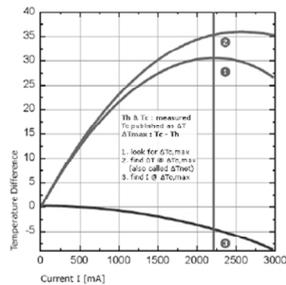
ΔT Defined

It would be tempting to specify our coolers by the more impressive ΔT_{max} value. However, with heating-up of the hot side and usually less-than-optimal thermal coupling to the heat sink in mind, we have decided to be conservative and publish more realistic net values T_0 !



Features & Benefits

- World's smallest Peltier elements with high cooling power density facilitate packaging and optimally support small devices.
- Smaller packages for higher density designs
- High volume manufacturing reduces unit cost
- Reduced bill of material (BOM) for TE cooling
- Chip format enables cheaper assembly on common die and wire bonders
- Cheaper, faster and more reliable assembly



Product Family

Type	Dimensions [mm] cold side hot side	Thickness [μm]	Number of leg pairs	Thermal Resistance at 85 °C	Electric Resistance at 23 °C	ΔT_{max} at 85 °C	Q_{max} at 85 °C	I_{max} at 85 °C
MPC-D303	1.18 x 0.832 2.142 x 0.832	1090	4	135 K/W	0.3 Ω	48 K	0.33 W	1.2 A
MPC-D305	0.94 x 0.832 1.666 x 0.832	1090	3	175 K/W	0.3 Ω	40 K	0.23 W	1.0 A

micropelt

Cooling in new dimensions.

A5 Methoden zur Zelldetektion

Tabelle 20: Literatur zu Bildverarbeitungsmethoden für die Zelldetektion

Die Tabelle ist online veröffentlicht und zu finden unter:

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:ilm1-2010000436>



A6 Algorithmen für das „Image Stacking“

Tabelle 21: „Image Stacking“ Algorithmen

Autor	Algorithmen für „Image-Stacking“
(Pieper & Korpel 1983)	Vergleich der Maximum-/Minimumwerte Nichtdirektionaler Differenzoperator Differenzen zwischen Grauwerten von benachbarten Pixeln Immer vier Paare gleichzeitig übernommen
(Sugimoto & Ichioka 1985)	Lokale Variation der Bildintensität Pseudo-stereoskopisches Bild Spiegelt nicht die realen Höhenverhältnisse wieder
(Darell & Wohn 1988)	Laplace- und Gauß-Pyramiden Zur Objekthöhenermittlung
(Okabayashi et al. 1989)	Fouriertransformation
(Gonzalez et al. 2009)	Fourier-/Wavelettransformation Frequenzraum eines transformierten Bildes
(Kaneda et al. 1992)	Rauschanteilreduktion der Originalbilder Erzeugen und Glätten von Map-Bildern Extrahieren der Bereiche Filterung mittels Median-Filter und arithmetischem Mittel Zur Bestimmung der Bereiche mit den höchsten räumlichen Frequenzen, indem man vom Originalbild ein tiefpassgefiltertes Bild abzieht
(Valdecasas et al. 2001)	Wavelettransformation Punktweise übernommen
(Widjanarko & Hardie 2002)	Fouriertransformation Hochpassfilterung Wichtung Punktweise übernommen



Glossar

Adhärenz: Anheftung von Zellen an eine inerte Oberfläche. Viele Zellen wachsen und vermehren sich nur, wenn sie sich anheften können. (Lindl & Gstraunthaler 2008)

BioMEMS: Mikro-elektromechanisches System, das biologische Elemente enthält oder das in biologischen Systemen enthalten ist.

Bonden: Verbindungsverfahren in der Mikrosystemtechnik

Byssus-Fäden: Byssusdrüse am Fuß vieler Muscheln sondert eine klebrige Substanz ab, die im Wasser schnell zu feinen, seidenartigen und zugfesten Fäden erhärtet. Die Fäden dienen zum Festhaften an der Unterlage. (Hentschel & Wagner 1990)

Eluat: lateinisch eluere – Auswaschen; durch Auswaschen herausgelöste Stoffe.

Differenzierung: entwicklungsphysiologisch das morphologische und funktionelle Verschiedenwerden der Keimteile, die Entfaltung der einzelnen Keimbezirke; Spezialisierung (Hentschel & Wagner 1990)

Force Feedback: englisch Krafrückmeldung

Fibroblasten: Zellen im Bindegewebe, stellen undifferenzierte Fibrozyten dar. (Hentschel & Wagner 1990)

Fibronectin: extrazelluläres Adhäsionsmolekül (Schmitz 2009)

Finite-Elemente-Methode: numerisches Verfahren mit welchem man elliptischer partieller Differentialgleichungen mit Randbedingungen näherungsweise lösen kann

Fixateur Externe: französisch äußerer Festhalter, durch die Haut von außen angebrachtes System zur Stabilisierung von Knochenbrüchen

Homiostase: Selbstregulation

HSL-Farbraum: definiert Farbe mit Hilfe des Farbtons (hue), der Farbsättigung (saturation) und der relativen Helligkeit (lightness)

Immersionsojektive: erreichen höhere Auflösungen durch numerische Aperturen $>1,0$. Öl oder Wasser, die einen höheren Brechungsindex haben als Luft, werden zwischen Objektiv und Probe eingebracht. (www.mikroskopie.de, zuletzt geprüft am: 06.07.2010)



Intrazytoplasmatische Spermieninjektion: Methode der künstlichen Befruchtung, bei der die Samenzelle direkt in das Zytoplasma der Eizelle gespritzt wird.

Konfluenz: dichtest mögliche Anordnung von adhärenenten Zellen als Monolayer in Kultur (Lindl & Gstraunthaler 2008).

Kreuztisch: (auch XY-Tisch genannt) ist ein zweiachsiges System das Bewegungen eines Objektes in einer Ebene in zwei Richtungen ermöglicht. Es besteht aus zwei einachsigen Linearführungssystemen.

Lab on a Chip: Integration einer oder mehrerer analytischer Funktionen auf einem kleinen meist mikrofluidischen System.

Laminin: extrazelluläres Adhäsionsmolekül (Schmitz 2009)

Lithografie: Flachdruckverfahren in der Mikrosystemtechnik zum Strukturieren von Mikrosystemen.

Luer-Anschlüsse: **Luer-Lock-**Anschluss für medizinische Produkte, genormte Verbindung für die Kombination von Spritzen und Infusionsbestecken unterschiedlicher Hersteller

Metabolismus: griechisch Stoffwechsel

Monolayer: einschichtige Zellschicht, die auf einer Oberfläche wächst (Minuth et al. 2002). Für die hier vorliegende Arbeit werden jedoch auch alle mehrschichtigen Zellkonstrukte, die ohne Scaffoldmaterial entstehen als Monolayer bezeichnet.

Navier Stokes Gleichungen: Grundgleichungen der Strömungsmechanik newtonscher Flüssigkeiten und Gase nach C. Navier und G. Stokes

Osteoblasten: knochenbildende Zellen

Osteo(neo)genese: (Neu)bildung von Knochen

Oxygenator: medizintechnisches Gerät, das unter Flüssigkeiten mit Sauerstoff anreichert.

Patch-Clamp-Technik: Messverfahren in der Elektrophysiologie. Der Strom durch einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran einer Zelle lässt sich damit darstellen.

Pathogenese: Entstehung und Entwicklung einer Krankheit

Paul'sche Käfige: sind in der Lage Ionen oder Elektronen durch die spezielle Formgebung der Wände und elektrischer Felder, in einem begrenzten Raum zu halten.



Peltier-Elemente: elektrothermischer Wandler nach J. Peltier, erzeugt bei Stromdurchfluss eine Temperaturdifferenz oder bei Temperaturdifferenz einen Stromfluss.

Penning traps: Festhalten geladener Teilchen unter Nutzung eines homogenen statischen Magnetfeldes und eines räumlich inhomogenen statischen elektrischen Feldes. (www.wikipedia.de)

Phänotyp: Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung ausgebildeten (äußeren) Eigenschaften eines Organismus (Hentschel & Wagner 1990)

Polydimethylsiloxan: anorganische Polymer auf Siliziumbasis, Silikon

Polysaccharide: entstehen durch glykosidische Verkettung sehr vieler Monosaccharide, bedeutsam als Gerüst-substanzen, z. B. Cellulose, Chitin, Reservestoffe, Glykogen, (Hentschel & Wagner 1990) Dextran, Chitosan, Hyaluronsäure und Kompositmaterialien

Reinraumwerkbank: mit horizontaler oder vertikaler laminarer Strömung abhängig vom Verwendungszweck (Meaterial-/oder Personenschutz). Luftstrom wird von einem Gebläse erzeugt, durch ein Filtersystem gedrückt, das alle Partikel, die größer als 0,3 mm sind, zurückhält. (Lindl & Gstraunthaler 2008).

Salutogenese: Präventionskonzept, dass sich mit der Entstehung/Erhaltung von Gesundheit befasst.

Scaffold: 3-dimensionaler Zellträger, künstliche ECM

Sensorspot: punktförmiges flaches Sensorelement, das aufgeklebt wird. Mittels optischer Verfahren wird die Reaktion auf Konzentrationsänderungen registriert.

Stewart-Plattform: Hexapod

Synoviozyten: Zellen des Gelenkknorpels

Thermistor: variabler elektrischer Widerstand, dessen Wert von der Temperatur abhängt.

Tissue Engineering: Herstellung künstlicher Gewebe. (Minuth 2002)

Viabilität/Lebensfähigkeit: Zellüberlebensfähigkeit nach bestimmten Verfahren, denen man eine Zellkultur unterzieht. (Lindl & Gstraunthaler 2008)

Zwei-Photonen-Polymerisation: ist ein Verfahren zur dreidimensionalen Mikro- und Nanostrukturierung.





Thesen zur Dissertationsschrift

1. Die Entwicklung neuer Therapien sollten auf der Applikation definierter Reize basieren, welche bei Zellen zu veränderten Prozessabläufen führen.
2. Existierende Methoden zur Reizapplikation *in vivo* sowie mit herkömmlichen makroskopischen Methoden *in vitro* sind nicht oder nur bedingt zur Beantwortung zellulärer Fragestellungen geeignet.
3. Die Designvorgaben für ein Mikrozellkultivierungssystem (MZKS) zur Applikation mechanischer Reize auf Zellen werden orientiert an der medizinischen oder biologischen Fragestellung in primär durch die Anforderungen der verwendeten Zellarten und sekundär durch den Nutzer des Systems bestimmt.
4. Es existiert kein Mikrosystem, welches gleichermaßen zur Kultivierung von Zellen, zur Handhabung von Zellen und zur Applikation mechanischer Reize auf Zellen geeignet ist.
5. Erforderliche Komponenten zur Sicherstellung der Funktion eines MZKS für die Handhabung und die Beanspruchung von Zellen sind: ein Mikrosystem, eine Versorgungseinheit, eine Manipulationseinheit, eine Beobachtungseinheit und auch eine Beanspruchungseinheit; komplettiert durch systemübergreifende Steuer-Software, jedoch in unterschiedlicher Komplexität (Grundfunktionen oder Zusatzfunktionen).
6. Die Entwicklung neuer Technologien zur Mikrostrukturierung von Scaffoldmaterialien für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen erfordert kompatible Handhabungs-konzepte sowie Besiedelungs- und Analysemethoden dieser 3D-Konstrukte.
7. Zur Beobachtung der Zustände im System, der Zelle und zur Bestimmung der Parameter für die Manipulation ist ein optisches System (Observationseinheit) notwendig.
8. Das optische System (einachsige) reicht aus, um die Bewegung des Manipulators in drei Dimensionen zu teilautomatisieren.
9. Die Mikromanipulatoren sind für die Handhabung der Zellen, Scaffolds und Mikrosystemkomponenten geeignet.



10. Es ist möglich, Zellen in definierter Anzahl auf Teilkomponenten des entwickelten Mikrosystems vor zu kultivieren, diese in das Mikrosystem zu integrieren und dort über einen längeren Zeitraum stabil zu versorgen.
11. Die Struktur und das Design des MZKS ermöglichen die Integration von im Makroskopischen etablierten Methoden zur Applikation mechanischer Reize in dieses System.
12. Für die Nachbildung der natürlichen Belastungssituation im Frakturspalt ist die Überlagerung von Scher- und Druckkräften als applizierte Last auf die Zellen in MZKS geeignet.



Erlaubnis zum Wiederabdruck

Für die hier gelisteten Abbildungen und Tabellen Dritter wurde bei den zuständigen Autoren, Verlagen oder Firmen die Genehmigung zum Wiederabdruck eingeholt:

Abbildung 1:

Minuth, W. W., Denk, L. und Glashauser, A. (2010). A modular culture system for the generation of multiple specialized tissues. *Biomaterials* 31, 2945–2954.

Minuth, W. W. und Strehl, R. (2007). Technical and theoretical considerations about gradient perfusion culture for epithelia used in tissue engineering, biomaterial testing and pharmaceutical research. *Biomedical Materials* 2, R1-R11.

Tabelle 1, Abbildung 3:

Minuth, W. W., Strehl, R. und Schuhmacher K. (2002). *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*. Lengerich: Pabst Science Publishers.

Abbildung 4:

Powers, M. J., Domansky, K., Kaazempur-Mofrad, M. R., Kalezi, A., Capitano, A., Upadhyaya, A., Kurzawski, P., Wack, K. E., Stolz, D. B., Kamm, R. et al. (2002). A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 257–269.

Abbildung 5:

Hung, P. J., Lee, P. J., Sabounch, P., Aghdam, N. und Lin, R. (2005). A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. *Lab on a Chip* 5, 44–48.

Abbildung 7:

Lindl, T. und Gstraunthaler, G. (2008). *Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

Abbildung 8:

Zawadzak, E., Bil, M., Ryszkowska, J., Nazhat, S. N., Cho, J., Bretcanu, O., Roether, J. A. und Boccaccini A. G. (2009). Polyurethane foams electrophoretically coated with carbon nanotubes for tissue engineering scaffolds. *Biomedical Materials* 4.

Wang, L., Li, Y., Zuo, Y., Zhang, L., Zou, Q. und Cheng, L. (2009). Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomedical Materials* 4.

Abbildung 27 und 29:

Quelle PreSens GmbH, Regensburg, Germany

Tabelle 17:

Brown, T. D. (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics* 33, 3–14.

Abbildung 49:

Hickory, W. B. und Nanda, R. (1987). Effect of tensile force magnitude on release of cranial suture cells into S phase. *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopaedics* 91.

Ikegame, M., Ishibashi, O., Yoshizawa, T., Shimomura, J., Komori, T., Ozawa, H. und Kawashima, H. (2001). Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 24–32.

Abbildung 50:

Yasuda, S. I., Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Katho, K., Sasaki, Y., Kaneko, H., Suda, Y., Nagai, R. et al. (2001). A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers. *American Journal of Heart Circulatory Physiology* 281, 1442–1446.

Iribe, G., Helmes, M. und Kohl, P. (2007). Force-length relations in isolated intact cardiomyocytes subjected to dynamic changes in mechanical load. *American Journal of Heart Circulatory Physiology* 292, 1487–1497.

Abbildung 53:

Seide, K., Schümann, U. und Jürgens, C. (2005). Klinische Erfahrungen mit dem computergesteuerten Hexapodfixateur. *Trauma und Berufskrankheit* 7, 148–152.

