



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7182

Polymere, mikrostrukturierte Zellkulturträger für das Tissue Engineering

S. Giselbrecht

Institut für Mikrostrukturtechnik
Institut für Biologische Grenzflächen

Oktober 2005

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7182

**Polymere, mikrostrukturierte Zellkulturträger
für das Tissue Engineering**

S. Giselbrecht^{*)}

Institut für Mikrostrukturtechnik
Institut für Biologische Grenzflächen

^{*)} von der Fakultät für Maschinenbau der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2005

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071823

Polymere, mikrostrukturierte Zellkulturträger für das Tissue Engineering

Zur Erlangung des akademischen Grads eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften

von der Fakultät für Maschinenbau der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biol. Stefan Giselbrecht

aus Ulm

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juni 2005

Hauptreferent: Prof. Dr. V. Saile

Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Wintermantel

Kurzfassung

Die dreidimensionale Kultivierung von Zellen zur *in vitro* Rekonstitution von Geweben erfordert Gerüststrukturen, deren Geometrien, Materialeigenschaften und Porositäten definiert erzeugt werden können. Am Forschungszentrum Karlsruhe wurde ein polymerer, mikrostrukturierter Zellkulturträger im Chipformat für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen entwickelt, dessen Verfahren zur Herstellung im Rahmen dieser Arbeit verbessert wurde.

In einer ersten, **kurzfristigen Strategie** wurde ein modulares Konzept für den Aufbau des Zellkulturträgers vorgesehen. Dabei wurde der kosten- und zeitaufwändige Prozess des laserbasierten Mikroperforierens der Containerböden durch das Aufbringen einer vorkonfektionierten Ionenspurmembraan auf die Unterseite der spritzgegossenen und rückseitig geöffneten Gerüststruktur ersetzt. Um eine flächige und fluidisch dichte Verbindung der Membran mit dem mikrostrukturierten Grundkörper zu erzielen, wurde ein neuartiges Lösungsmittelschweißverfahren adaptiert, bei dem beide Fügepartner oberflächlich durch Lösungsmitteldampf angelöst werden. Die kurze aber gut kontrollierbare Lösungsmittelkontaktzeit verhindert eine Beeinträchtigung der Geometrie der Mikrostruktur und ermöglicht eine Aufrechterhaltung einer, z. B. durch UV-Bestrahlung, zuvor erzeugten Oberflächenmodifikation während des Fügeprozesses. Durch die Entwicklung einer teilautomatisierten Anlage konnten in einem Batch-Prozess 4 Zellkulturträger mit Lösungsmittelkontaktzeiten von etwa 15 s parallel miteinander verschweißt werden, so dass eine deutliche Kostenreduktion der Herstellung im Labormaßstab möglich war.

Im Rahmen einer zweiten, **langfristigen Strategie** wurde ein vor kurzem entwickeltes, formgebendes mikrotechnisches Verfahren, das Mikrothermoformen, zur Herstellung des Zellkulturträgers mit einem modifizierten Design angewendet. Dieses Verfahren ermöglichte die Herstellung eines Arrays aus 25 x 25 dünnwandigen, unvergrabenen und zylinderförmigen Mikrokavitäten mit einem Durchmesser von 350 µm und einer Tiefe von 300 µm. Hierfür wurden verschiedene dünne thermoplastische Folienhalbzeuge verwendet. Damit in den mikrothermogeformten Zellkulturträgern eine Nährstoffversorgung immobilisierter Zellen mittels Perfusion möglich ist, wurden drei Verfahrenskombinationen des Mikrothermoformens mit der Ionenspurtechnologie zur Perforation der Mikrokavitäten entwickelt. Dabei gelang es u. a. durch eine unkonventionelle Anordnung der einzelnen Prozessschritte in der Reihenfolge Bestrahlung, Mikrothermoformen und Ätzen dünnwandige und allseitig perforierte Mikrokavitäten herzustellen. Das Mikrothermoformen bietet darüber hinaus die Möglichkeit, texturierte und an der Oberfläche physikochemisch modifizierte Folien zu formen, ohne dass diese spezifischen Eigenschaften durch das Umformen verloren gehen. Das Mikrothermoformen könnte zukünftig eine kosteneffektive (Massen-) Produktion des Zellkulturträgers in einer Endlos-Fertigungslinie ermöglichen.

Die mit den neu entwickelten Verfahren hergestellten Zellkulturträger-Prototypen wurden sowohl mit verschiedenen Zelllinien als auch mit primären Zellen validiert. Anhand von verschiedenen zellbiologischen Tests konnte die Biokompatibilität der beiden Verfahren und der verwendeten Materialien nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten zellphysiologische Vergleichsmessungen zwischen den neuen Prototypen und der bisher verwendeten Form des Zellkulturträgers keine signifikanten Unterschiede.

Polymeric, Microstructured Tissue Culture Substrates for Tissue Engineering

Abstract

Three-dimensional cell cultivation for in vitro reconstitution of tissue requires scaffoldings which can be produced with well-defined geometries, material properties, and porosities. Forschungszentrum Karlsruhe has developed a polymeric, microstructured tissue culture substrate in the chip format for three-dimensional cell cultivation. Within the scope of this thesis, the manufacturing process of this microstructured substrate was improved.

The initial **short-term strategy** focused on a modular concept for the configuration of the tissue culture substrate. Cost- and time-consuming laser-based microperforation processing of the container bottoms was substituted by applying a pre-fabricated ion track membrane onto an injection-moulded scaffold which was open at the rear. In order to obtain a laminar and leak-proof bond between membrane and injection-moulded part, a novel solvent welding process was adapted – both joining parts were superficially dissolved by exposure to a solvent vapour. Any adverse effect on the microstructure's geometry was prevented by a short, well-controlled contact time with the solvent. This also allowed for the preservation of prior surface modifications, e.g. by UV irradiation, during the bonding process. Due to the development of a semi-automated system, a batch of 4 scaffolds could be welded simultaneously with solvent contact times of approximately 15 s and, hence, laboratory-scale manufacturing costs were reduced considerably.

Within the scope of a second, **longer-term strategy**, a recently developed microfabrication method, microthermoforming, was applied for the production of a modified design tissue culture substrate. An array of 25 x 25 thin-walled, recessed, cylindrical microcavities with a diameter of 350 μm and a depth of 300 μm was fabricated. For this purpose, various thin thermoplastic semi-finished foils were used. In order to enable medium supply by perfusion, three process combinations of microthermoforming and ion track technology were developed for the perforation of the microcavities. Using a new process sequence of irradiation, microthermoforming, and etching, it was succeeded in producing thin-walled microcavities perforated on all sides. Additionally, microthermoforming allows to shape textured foils and foils, the surfaces of which have been modified physico-chemically, without loss of these specific properties during the shaping process. In the future, microthermoforming may enable cost-effective (mass) production of the tissue culture substrate in a continuous production line.

Validation of the tissue culture substrate prototypes produced by these new processes was carried out with different cell lines and with primary cells. By assessing a range of different cell-based assays, biocompatibility of both processes and the materials used was demonstrated. Comparative measurements concerning the cell physiology of three-dimensionally cultured cells in these new prototypes and in the previous design of the tissue culture substrate did not show any significant differences.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Stand der Technik	7
2.1	Mikrostrukturtechnik und Scaffolds.....	7
2.2	Design und Anwendungsmöglichkeiten des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers	10
2.3	Bioreaktorsystem	13
2.4	Bisherige Methode der Herstellung des Zellkulturträgers.....	14
2.5	Kostenstruktur des bisherigen Herstellungsverfahrens	16
3	Mikrotechnische Arbeiten	19
3.1	Konzepte zur Herstellung des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers	19
3.1.1	Zielsetzungen	19
3.1.2	Kurzfristige Strategie – Mikrospritzguss kombiniert mit Membran-Bondprozess	21
3.1.3	Heißprägen und Membran-Bondprozess.....	21
3.1.4	Langfristige Strategie – Mikrothermoformen.....	21
3.1.5	Rapid Prototyping	22
3.2	Strategie I: Kombination Spritzguss – Lösungsmittelschweißen	22
3.2.1	Verbindungstechniken für mikrostrukturierte Polymere	22
3.2.2	Theorie Lösungsmittelschweißen	24
3.2.3	Redesign des Formeinsatzes	25
3.2.4	Prototyp einer Lösungsmittelschweißanlage im Labormaßstab	26
3.2.5	Presswerkzeuge für das Lösungsmittelschweißen.....	29
3.2.6	Allgemeiner Prozessablauf des Lösungsmittelschweißens in der Gasphase (Versuchsanlage).....	34
3.2.7	Verwendete polymere Materialien	36
3.2.8	Lösungsmittelschweißen von Zellkulturträgern.....	40
3.2.9	Teilautomatisierte Lösungsmittelschweißanlage	43
3.2.10	Nachträgliche Lösungsmittelabgabe des verschweißten Zellkulturträgers.....	47
3.2.11	UV-Modifizierung und Kompatibilität zum Verschweißprozess.....	51
3.3	Strategie II: Kombination Mikrothermoformen – Ionenspurtechnologie.....	54
3.3.1	Stand der Technik Mikrothermoformen	54
3.3.2	Hintergrund Mikrothermoformen.....	56
3.3.3	Alternative Werkzeug- und Verfahrenskonzepte für das Mikrothermoformen des polymeren Zellkulturträgers	57
3.3.4	Mikrothermoformwerkzeug – Geometrie und Herstellung	61
3.3.5	Aufbau einer hochdrucksicheren Thermoformanlage im Labormaßstab.....	63
3.3.6	Prozessablauf Mikrothermoformen.....	64
3.3.7	Charakterisierung der Folienhalbzeuge.....	67
3.3.8	Mikrothermogeformte Zellkulturträger.....	69
3.3.9	Mikroperforation.....	73
3.3.10	Variabilität und Anpassungsfähigkeit mikrothermogeformter Zellkulturträger.....	84
3.3.11	Verbindungstechniken für mikrothermogeformte Zellkulturträger.....	88
3.3.12	Möglicher kombinierter Prozessablauf.....	92

4	Biologische Validierung	95
4.1	Zellkultur (Methoden).....	95
4.1.1	Zelllinie Hep G2	95
4.1.2	Zelllinie L929.....	96
4.1.3	Primäres Zellmaterial (Ratte).....	96
4.2	Vorbehandlung der Zellkulturträger	97
4.3	Beimpfung der Zellkulturträger	97
4.4	Fixations- und Färbemethode.....	98
4.5	Biokompatibilitätstestung	98
4.5.1	Besiedelungstests.....	98
4.5.2	alamarBlue™-Assay	100
4.6	Oberflächenmodifikationen	103
4.6.1	Gasphasenfluorierung	103
4.6.2	Beständigkeit UV-basierter Oberflächenmodifikationen	107
4.7	Charakterisierung der Zellkulturträger-Prototypen anhand zellspezifischer Leistungen.....	111
4.7.1	Cytochrom P450-Monooxygenasen	112
4.7.2	Albuminsekretion	115
5	Diskussion.....	123
6	Zusammenfassung.....	141
7	Literatur	147

1 Einleitung

Das ‚Tissue Engineering‘, im Deutschen als Geweberekonstitution bzw. Gewebezüchtung bezeichnet, ist eine vergleichsweise sehr junge Wissenschaftsdisziplin, die es etwa seit 10 bis 15 Jahren gibt. Sie stellt einen stark interdisziplinären Ansatz dar, der unter Einbeziehung der Zellbiologie, der Biomaterialforschung und den Ingenieurwissenschaften das Ziel verfolgt, einen bioartifiziellen Organersatz zu entwickeln, der die Wiederherstellung, die Aufrechterhaltung oder die Verbesserung einer Gewebefunktion ermöglicht [1].

Das Tissue Engineering in seiner heutigen Form umfasst ein breites und vielfältiges Aufgaben- und Anwendungsspektrum. Eines der Hauptanwendungsgebiete ist die Bereitstellung einer neuartigen Behandlungsmöglichkeit von Erkrankungen oder Verletzungen, bei denen eine beeinträchtigte oder verloren gegangene Gewebefunktion nicht durch pharmakologische Ansätze oder durch rein technische Hilfsmittel (z. B. Dialysator) behandelt werden kann. Hier sollen vermehrt künstliche Gewebekonstrukte eingesetzt werden, die die spezifische Funktion des ursprünglichen Gewebes unterstützen bzw. ersetzen. Dies kann einerseits durch die Implantation von Einzelzellen (auch transgen) oder von künstlichem Gewebe erreicht werden. Andererseits kann eine Unterstützung oder ein Ersatz durch ein extrakorporales, bioartifizielles System erfolgen. Während es im Bereich der Implantationen bereits erste kommerzielle Anwendungen des Tissue Engineerings in Form von *in vitro* gezüchteter Haut und Knorpel gibt, befinden sich extrakorporale Organunterstützungssysteme für Patienten mit Organversagen noch in einer relativ frühen Entwicklungsphase. Der Einsatz dieser Systeme soll eine Überbrückung der Zeit bis zu einer Organtransplantation oder bis zur Regeneration des dadurch entlasteten Organs ermöglichen. Bei der Regeneration steht möglicherweise eine echte, langfristige Alternative zur Organtransplantation zur Verfügung, mit der die zunehmende Diskrepanz zwischen benötigter und verfügbarer Anzahl von Spenderorganen kompensiert werden könnte [2,3]. Damit würde zudem eine langjährige (lebenslängliche) Therapie, z. B. mit Immunsuppressiva entfallen, was eine Steigerung der Lebensqualität der Patienten zur Folge hat. Schließlich besteht durch eine solche Behandlung die Möglichkeit, die entstehenden Kosten, im Vergleich zu einer Transplantation inklusive der Folgebehandlungen, deutlich zu senken.

Neben diesen therapeutischen Anwendungsfeldern könnten funktionelle Gewebekonstrukte auch als zuverlässigere Gewebemodelle für *in vitro* Testsysteme, für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung oder für die allgemeine Grundlagenforschung eingesetzt werden. Der Grund hierfür ist, dass dreidimensionale Zellkulturen einen deutlichen Vorteil gegenüber einfachen, in Monolagen kultivierten Zellen hinsichtlich der Aufrechterhaltung ihres Differenzierungsstatus aufweisen [4]. In einem dreidimensionalen Gefüge kultivierte Zellen zeigen eine, im Vergleich zu herkömmlichen, einschichtigen Kultivierungsformen, natürlichere Morphologie und bessere spezifische zellphysiologische Eigenschaften. Weiterhin besitzen sie, aufgrund der räumlich ausgebildeten Zell-Zell-Interaktionen, eine der *in vivo* Situation ähnelndere Gewebeorganisation. Dreidimensional kultivierte Zellen stellen daher für die meisten Gewebetypen das bessere *in vitro* Modell dar.

Organotypische Gewebemodelle könnten es in Zukunft auch ermöglichen, besonders teure und ethisch bedenkliche Tierversuche in vielen Fällen zu ersetzen. Des Weiteren sind diese

Gewebemodelle insbesondere für die pharmazeutische Industrie interessant. Integriert in moderne und parallele High-Throughput-Screening-Systeme gestatten es diese Modelle möglicherweise in einem frühen Stadium der Entwicklung zuverlässige Aussagen über die Wirkung neuer Substanzen auf Gewebe und Organe zu erhalten. Funktionale und vor allem langzeitstabile, organotypische Zellkulturen können außerdem für die Bearbeitung spezieller Fragestellungen in den Bereichen der Grundlagenforschung, der Zell- und Entwicklungsbiologie, in der Tumorforschung und anderen benachbarten Disziplinen Beiträge leisten.

Aktuell beschäftigt man sich beim Tissue Engineering hauptsächlich damit, die gegenüber den herkömmlichen Kultivierungsmethoden veränderten und deutlich komplexeren Rahmenbedingungen solcher dreidimensionaler *in vitro* Kultursysteme zu erforschen bzw. zu definieren. Um eine effektive und reproduzierbare Kultivierung von dreidimensionalen, funktionellen und langzeitstabilen Zellkulturen verwirklichen zu können, müssen drei Probleme überwunden werden.

Als erstes muss geeignetes Zellmaterial gefunden werden, das in ausreichender Menge, passend zur Anwendung und unter Umständen zur richtigen Zeit verfügbar ist. Hier können prinzipiell primäre Zellen, Zelllinien aber auch embryonale und adulte Stammzellen verwendet werden. Im Fall einer patientenbezogenen Therapie bietet sich, aufgrund der immunologischen Toleranz im Körper, autologes Zellmaterial an. Davon ist jedoch meist nur eine geringe Zellzahl, z. B. aus Biopsiematerial, verfügbar. Bei der Verwendung von allogenen und xenogenem Zellmaterial bedarf es einer immunologischen Barriere, z. B. in Form einer porösen Membran oder einer immunologischen Suppression, um Abstoßungsreaktionen im Körper des Patienten zu verhindern. Zusätzlich besteht bei dem Einsatz von Zellen aus tierischen Quellen eine bis heute nicht klar abzuschätzende Gefahr des Infektionsrisikos (siehe z. B. PERV, Porcine Endogeneous Retrovirus). Gegenwärtig gibt es daher große Bestrebungen, autologe (oder allogene), pluripotente Stammzellen zu nutzen, die prinzipiell *in vitro* unbegrenzt vermehrt und schließlich in nahezu jeden Zelltyp ausdifferenziert werden können [5]. Die Stammzellforschung steht hier jedoch, hinsichtlich der Entwicklung spezifischer Stammzellmarker und besonders hinsichtlich der zu erwartenden komplexen Reifungs- und Differenzierungsprogramme, noch am Anfang ihrer Bemühungen.

Die Bestimmung optimaler *in vitro* Kulturbedingungen für dreidimensionale Zellkulturen stellt das zweite zentrale Problem dar. Dazu gehört in aller erster Linie die richtige Wahl der Mediumzusammensetzung, die einen großen Einfluss auf das Verhalten der Zellen besitzt. Je nach Anwendung und je nach Arbeitsgruppe werden heutzutage sehr unterschiedliche Zusammensetzungen verwendet. Die bisherigen Erkenntnisse zeigen jedoch, dass der Einsatz von definierten, serumfreien Medien für diese Anwendungen erforderlich ist [6]. Neben den essentiellen Nährstoffbestandteilen spielen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in definierten Konzentrationen ebenfalls eine maßgebliche Rolle für die Entwicklung bzw. für das Verhalten der Zellen. Auch statische oder dynamische physikalische und chemische Gradienten können je nach Gewebetyp ausschlaggebend sein. Darüber hinaus muss eine Optimierung der für die Zellen verfügbaren Gaspartialdrücke im Medium erfolgen. Schließlich ist entscheidend, in welcher Form und in welchem Ausmaß die Zellen mit Medium versorgt werden, z. B. allein durch Diffusionsvorgänge oder durch eine aktive Perfusion mit definierten Volumenströmen.

Das dritte Problem betrifft das Design und den Aufbau geeigneter, biokompatibler Gerüststrukturen (Scaffolds) für die räumliche Verankerung der Zellen. Besonders mit dieser Frage wird sich diese Arbeit beschäftigen. Die Scaffolds übernehmen zunächst die Stützfunktion der extrazellulären Matrix in natürlichen Geweben, die eine Einbettung und Verankerung der Zellen ermöglicht und gleichzeitig als dreidimensionale Leitstruktur für die Zellen dient. Viele technische Materialien verhindern jedoch aufgrund ihrer nativen Oberflächeneigenschaften eine Verankerung der Zellen auf der Oberfläche. In diesen Fällen müssen adhäsionsfördernde Maßnahmen ergriffen werden, z. B. eine Beschichtung mit Faktoren der extrazellulären Matrix, um eine Verankerung der Zellen auf dem Substrat zu ermöglichen. Ein von einem Scaffold unabhängiger Aufbau einer dreidimensionalen Zellkultur ist zwar prinzipiell möglich, besitzt aber entscheidende Nachteile gegenüber immobilisierten Zellaggregaten. Aus dem Bereich der Tumorforschung ist seit vielen Jahren die Kultivierung von Zellen in Form freischwimmender, multizellulärer Sphäroide bekannt [7,8]. Solche Sphäroide werden inzwischen z. B. auch als Gewebemodelle für viele nichtpathologische Anwendungen genutzt. Die wesentlichen Nachteile einer dreidimensionalen Kultivierung von Zellen in Form von Sphäroiden sind, dass aufgrund der fehlenden Immobilisierung und der radialsymmetrischen Geometrie dauerhaft keine physikalischen oder chemischen Gradienten über definierten Gewebeschichten aufgebaut werden können und eine aktive Perfusion der Zellen mit definierten Volumenströmen nicht möglich ist. Dies gelingt erst durch die Immobilisierung der Zellaggregate in fluidisch perfundierbaren Stützstrukturen.

Das Scaffold dient aber nicht nur als Verankerungssubstrat in der dritten Dimension, sondern definiert auch die Form und die Größe der in dem Gerüst eingebetteten Zellaggregate. Weiterhin nimmt die Gerüststruktur über die zu den Zellen zugängliche offene Fläche bzw. deren Porosität maßgeblich Einfluss auf die fluidische Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und den ebenfalls entscheidenden Abtransport von Metaboliten und Stoffwechselendprodukten. Über die Bereitstellung epigenetischer Faktoren, z. B. durch die Kopplung von spezifischen Differenzierungssignalen bzw. morphogenen Faktoren an die Oberfläche des Scaffolds oder die verzögerte Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der synthetischen Matrix, können Scaffolds möglicherweise einen weiteren wichtigen Beitrag zur Reifung oder Aufrechterhaltung funktioneller Gewebe leisten.

Abgesehen von Glas, Keramik, Silizium und Metall bieten sich, ähnlich wie in anderen Bereichen der Lebenswissenschaften, polymere Materialien zum Aufbau von Scaffolds an, besonders wenn es sich um die Herstellung mikrostrukturierter kostengünstiger Einweg-Zellkulturträger handelt. Der Aufbau von künstlichen Gerüststrukturen aus extrazellulärer Matrix, die aus tierischen oder menschlichen Geweben gewonnen wurde, ist ebenfalls möglich. Die Verwendung dieser extrazellulären Matrix und dieser natürlichen Polymere besitzt zwar den Vorteil, dass bereits wesentliche Informationen in ihrem Aufbau und ihrer Struktur für eine effektive Interaktion mit den Zellen vorliegen, z. B. in Form von adhäsionsfördernden Peptidsequenzen, jedoch liegt der schwerwiegende Nachteil dieser natürlichen Matrizen in der häufig auftretenden ‚batch-to-batch‘ Variation der Zusammensetzung dieser Substrate. Die schwankende Qualität dieser Stoffe verhindert einerseits die Schaffung einheitlicher und gleich bleibender Voraussetzungen für die anhaftenden Zellen und andererseits erschweren sie eine reproduzierbare Prozessierung. Hierin besteht der große Vorteil synthetisierter Polymere, deren Eigenschaften dank der rasanten Entwicklungen in der Kunststoffindustrie sehr präzise eingestellt werden können (z. B. Molekulargewichtsvertei-

lung, chemische, mechanische, optische, elektrische und thermische Eigenschaften, funktionale Seitenketten, Benetzungseigenschaften usw.). Neueste Entwicklungen, die teils auch in dieser Arbeit dargelegt werden, zeigen, dass die Nachteile gegenüber den natürlichen Substraten hinsichtlich der Verfügbarkeit extrazellulärer Faktoren zumindest ansatzweise überwunden werden können. Dabei handelt es sich um formgebende Verfahren, die die gute Prozessierbarkeit und die gleich bleibende Qualität der künstlichen Polymere nutzen und parallel die Aufrechterhaltung oder die globale bzw. lokale Erzeugung spezieller Oberflächen- und Volumeneigenschaften im dreidimensional strukturierten Kunststoff ermöglichen. Dadurch kann die Zelladhäsion und das Verhalten der anheftenden Zellen innerhalb einer dreidimensionalen Gerüststruktur gezielt beeinflusst werden. Für implantierbare Scaffolds werden vorzugsweise bioabbaubare, homo- oder heteropolymere Materialien, wie z. B. Polylactide (PLA), Polyglycolide (PGA) und Polylactid-co-glycolide (PLGA), eingesetzt. Diese können im Körper durch verschiedene Degradationsmechanismen (Polymerauflösung, Hydrolyse oder enzymatische Degradation) über einen definierbaren Zeitraum abgebaut werden [6].

Neben der physikalischen und chemischen Natur der Oberfläche spielt bei einem Scaffold, das die Funktionalität eines künstlichen Gewebes möglichst optimal unterstützen soll, dessen geometrisches Design eine wichtige Rolle. Dieses hängt von vielen Faktoren ab und kann aufgrund der sehr vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten sehr unterschiedlich ausfallen [6,9,10]. Ein für alle Scaffolds allgemeingültiges Kriterium ist jedoch die durchschnittliche Größe einer Zelle bzw. die typischen Ausmaße funktioneller Einheiten in natürlichen Geweben. Sie bestimmen in der Regel die minimale Größe der Freiräume, die für die Zellen in einer solchen Matrizie geschaffen werden müssen. Weiterhin werden *in vivo*, aufgrund des sehr hohen Grades der Vaskularisierung, lange Diffusionswege vermieden, so dass auch in einem künstlichen Trägersystem nur maximal Diffusionswege von etwa 150–200 µm innerhalb der Zellaggregate auftreten dürfen [11], um eine Unterversorgung innen liegender Zellen und eine Akkumulation von toxisch wirkenden Stoffwechselprodukten zu verhindern. Dadurch werden von biologischer Seite die wesentlichen Strukturgrößen eines Scaffolds auf einen Bereich von wenigen bis einigen hundert Mikrometern festgelegt.

Häufig vertretene Scaffold-Designs sind beispielsweise offen- und geschlossporige Schäume, textile Gewebe, mikroporöse Hohlfasern, Matrizen aus Gelen und poröse Mikrosphären. In der Regel werden diese Strukturen nicht durch klassische mikrotechnische Verfahren hergestellt, so dass sie häufig durch nicht exakt definierte und reproduzierbare Geometrien der für die Zellen vorgesehenen kapillaren Freiräume gekennzeichnet sind. Die dadurch teils stark streuende Form und Größe der sich ausbildenden Zellaggregate bewirkt, dass eine gleichmäßige Versorgungssituation für alle Zellen nicht gewährleistet werden kann. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von schlecht versorgten und nekrotischen Bereichen wird erhöht und die Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems wird möglicherweise beeinträchtigt. Nur durch eine definierte Geometrie und Porosität des Scaffolds kann eine effektive Ankopplung der Zellen an das angrenzende bzw. durchströmende Medium und damit eine optimale Ver- und Entsorgungssituation der Zellen *in vitro* erreicht werden. Dies ist insbesondere dann anzustreben, wenn eine Vielzahl von Scaffolds zu so genannten Superstrukturen oder ‚stacks‘ (Stapel) zusammengesetzt werden.

Da die wichtigsten Abmessungen der elementaren Strukturen eines biologischen Gewebes im Mikrometerbereich zu finden sind, ist es nahe liegend, für die Fertigung von geeigneten Scaffolds, auf die aus der Mikrotechnik bekannten Verfahren zurückzugreifen bzw. diese im Hinblick auf die spezielle Anwendung weiter zu entwickeln. Die Nutzung mikrotechnischer Verfahren macht den Aufbau geometrisch hoch aufgelöster, dreidimensionaler Mikrostrukturen erst möglich, die dann als Scaffolds mit reproduzierbarer Geometrie und mit orts aufgelösten Materialeigenschaften für das Tissue Engineering zur Verfügung stehen. Diese können auch eine wichtige Grundlage für die Realisierung biomimetischer Scaffolds bilden, die ein auf die immobilisierten Zellen abgestimmtes und optimiertes Mikroenvironment bereitstellen. Beim Einsatz mikrotechnischer Verfahren zur Herstellung von Scaffolds müssen neben den bereits aufgeführten Kriterien auch verschiedene Kriterien, die die Verfahrenstechnik selbst betreffen, erfüllt werden. Hierzu zählen z. B. die Biokompatibilität der eingesetzten Herstellungsverfahren und Hilfsmittel, die grundsätzliche Prozessierbarkeit der erforderlichen Materialien bzw. Materialkombinationen und nicht zuletzt die Wirtschaftlichkeit der Herstellung.

Ziel der Arbeit

Am Forschungszentrum Karlsruhe wurde ein polymerer, mikrostrukturierter Zellkulturträger im Chipformat für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen entwickelt [12]. Die Vervielfältigung der Struktur mit einer gleich bleibenden und reproduzierbaren Geometrie wurde bisher durch die Replikation einer Masterform mittels Mikrospritzguss sichergestellt. Der Zellkulturträger, mit seiner flächigen und regelmäßigen Anordnung von potentiell adressierbaren Mikrocontainern für die Immobilisierung von dreidimensionalen Zellaggregaten, wurde nicht nur für eine einzelne Anwendung konzipiert, sondern soll als eine variable Gewebekulturplattform fungieren, die in vielen Bereichen des Tissue Engineerings eingesetzt werden kann [13].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bisher sehr aufwändigen mikrotechnischen Herstellungsprozess im Hinblick auf den zeitlichen und damit auch finanziellen Aufwand zu reduzieren und eventuell geeignete neue mikrotechnische Herstellungsverfahren zu finden, die eine ökonomische Massenproduktion des Einweg-Zellkulturträgers ermöglichen. Neben der Vereinfachung des Herstellungsprozesses war ein weiteres wesentliches Merkmal eine verbesserte Kombinierbarkeit der Fertigungsverfahren mit verschiedenen Techniken zur Kunststoffmodifikation, um oberflächen- aber auch volumenspezifische Materialeigenschaften gezielt einstellen zu können. Damit sollte die Variabilität und die Anpassungsfähigkeit des Zellkulturträgersystems an spezielle Anforderungen der Kultivierung erhöht werden. Die veränderten bzw. neu erstellten Prototypen sollten dann in ersten Zellkulturversuchen mit Zelllinien und primären Zellen auf ihre Eignung hin getestet werden.

2 Stand der Technik

2.1 Mikrostrukturtechnik und Scaffolds

Die Mikrostrukturtechnik umfasst inzwischen eine ganze Reihe von verschiedenen Verfahren zur Strukturierung und zum Aufbau mikrotechnischer Bauteile und Baugruppen aus unterschiedlichsten Materialien. Die wahrscheinlich bedeutendsten Verfahren, die hier genannt werden können, sind die Silizium-Mikromechanik, die sich im Wesentlichen aus der Halbleitertechnologie entwickelt hat, das LIGA-Verfahren, das sich wiederum aus lithografischen und galvanischen Verfahren und der Kunststoffabformung zusammensetzt, die Lasermikromaterialbearbeitung, das Mikrozerspanen und die Mikroerodierttechnik [14-17]. Diese Verfahren werden allein, oder in Kombination verwendet, um 2D, 2½D oder echte 3D Strukturen mit definierten Geometrien zu erstellen, bei denen mindestens eine Dimension im Mikrometerbereich liegt.

In verschiedenen Bereichen der Lebenswissenschaften erfolgt bereits ein enges, synergistisches Zusammenarbeiten mit der Mikrotechnik, z. B. beim Aufbau und bei der Entwicklung so genannter BioMEMS (Biomedical Micro-Electro-Mechanical Systems) in Form von LOC-Systemen (Lab-on-Chip), μ TAS (Micro Total Analysis-Systems) und Drug-Delivery-Systemen [18-20]. Im Bereich des Tissue Engineerings und der Zellkulturtechnik wurden bis vor kurzem nur selten klassische Verfahren der Mikrotechnik für die Mikrostrukturierung natürlicher und synthetischer Substrate genutzt. In naher Zukunft wird jedoch, neben der Nanotechnologie, besonders die Mikrotechnik für das Tissue Engineering von wachsendem Interesse sein. Ein Grund hierfür ist, dass zunehmend die Wichtigkeit einer definierten Ausgestaltung des Mikroenvironments, und dazu gehört insbesondere die Form und die Strukturierung der angrenzenden Oberflächen des Scaffolds [1,21-23], für die Entwicklung und das Verhalten einzelner und aggregierter Zellen im dreidimensionalen Gewebe erkannt wird. Die Nutzung mikrotechnischer Verfahren ermöglicht einen reproduzierbaren Aufbau von Zellkulturträgern mit einer zunehmend höher aufgelösten Architektur [24]. Das Bereitstellen von artifiziellen Leitstrukturen für die Generierung von dreidimensionalen Geweben *in vitro*, deren Form, Größe und Materialeigenschaften global oder lokal exakt definiert sind, wird auch hier in den nächsten Jahren eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen den Biowissenschaften, der Mikrotechnik und der Nanotechnologie erfordern.

Einige verschiedene Beispiele, bei denen eine solche Zusammenarbeit ansatzweise oder bereits ausgeprägter vollzogen wurde, werden im Folgenden kurz vorgestellt. Das Verfahren der so genannten Softlithografie [25-27] wird beispielsweise angewendet, um Dünnschichten strukturiert auf ein Substrat zu übertragen. Hierbei wird zunächst, in der Regel mit lithografischen Methoden (z. B. Entwicklung eines UV-strukturierten SU-8 Resists), ein Master-Formwerkzeug hergestellt, dessen Geometrie mit einem Elastomer (z. B. PDMS) abgegossen wird. Der mikro- bzw. nanostrukturierte Elastomer-Stempel dient anschließend der Mustererzeugung auf der Oberfläche des Substrates. In vielen Fällen erfolgt dies durch so genanntes ‚micro-contact printing‘. Dabei wird der Stempel mit einer Substanz (z. B. Thiolderivate, aktivierte Silane, Proteine [28]) beschichtet, die nachfolgend durch das Aufdrücken der erhabenen Stellen des Stempels auf das Substrat selektiv nur im Bereich der Kontaktflächen übertragen wird. Die mikro- oder nanostrukturierten Schichten können im Folgenden

auch als Startschichten für weitere selektive Beschichtungsverfahren, z. B. mit Proteinen, verwendet werden [28]. Die nicht beschichteten Oberflächenbereiche können ebenfalls mit weiteren Substanzen derivatisiert werden. Das Verfahren wird u. a. im Bereich des Tissue Engineerings eingesetzt, um beispielsweise ausgewiesene Flächen auf ebenen Substraten adhäsionsfördernd oder adhäsionshemmend für Zellen einzustellen. Damit gelingt es beispielsweise, zweidimensionale Co-Kulturen mit einem definierten Verhältnis zweier verschiedener Zelltypen auf einem ebenen Substrat kultivieren zu können [29].

Darüber hinaus werden aus dem mikrotechnischen Bereich verschiedene Methoden verwendet, um die Oberflächen von natürlichen und künstlichen (Zellkultur-) Substraten mit Mikro- und Nanotopologien gezielt zu strukturieren, wie z. B.:

- lithografische Verfahren [30-33]
- laserbasierte Strukturierung [33-35]
- (Nano-) Imprint- bzw. Abformtechnologien [33,36-40]
- mechanische Mikrofertigung [33]
- Rapid Prototyping [41-44]
- Powder-Blasting-Verfahren [33,45-47]
- Ionenspurtechnologie [6,48,49].

Oberflächenstrukturierte Zellkultursubstrate wurden bisher vorwiegend für spezielle Fragen in der Grundlagenforschung verwendet, z. B. um den Einfluss von Topologien auf die Zellmorphologie, die Spreitung der Zellen, die Zellmigration, das Auswachsen von Neuriten [50], die Stoffwechselaktivität, die Wundheilung, die Zellorientierung und die DNA-Synthese [35] zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nicht nur chemische und physikochemische Eigenschaften, sondern auch die Oberflächenrauigkeit und -struktur einen maßgeblichen Einfluss auf die Biokompatibilität eines Materials haben [51]. Insbesondere im Bereich der Implantologie werden diese Erkenntnisse genutzt, um die Reaktionen des direkt benachbarten Gewebes auf den eingebrachten Fremdkörper möglichst in gewünschter Weise beeinflussen zu können [52].

Die Herstellung von mikro- bzw. nanoporösen Formkörpern und Hohlfasern, von geschlossenen- und offenzelligen Schäumen und von Vliesen bzw. textilen Geweben sind dem Grenzbereich der Mikrotechnik zuzuordnen. Diese Strukturen werden häufig als dreidimensionale Scaffolds für das Tissue Engineering, z. B. als Hohlfaserreaktor genutzt [53-56]. Hierbei werden Verfahren zur Herstellung verwendet, wie z. B. die Polymerisation mit Treibmitteln, Phaseninversionsprozesse, Extrusionstechniken kombiniert mit Phaseninversion, Sinterprozesse sowie Web-, Spinn- und Sticktechniken, um Kavitäten oder Poren teils mit genau definierten Formen zu erzeugen [9,57]. Jedoch sind die Anordnung, die Anzahl und/oder die Geometrien dieser Strukturen einer gewissen Varianz und teilweise einer starken Streuung unterworfen und können nicht wie bei den klassischen Verfahren der Mikrotechnik definiert eingestellt werden.

Die Silizium-Mikromechanik wurde ebenfalls nur zu einem geringen Teil für Zellkulturanwendungen und bisher nur am Rande für das Tissue Engineering genutzt. Dies ist zum einen wahrscheinlich auf die teils aufwändigen Strukturierungsverfahren und das vergleichsweise teure Material zurückzuführen. Auf der anderen Seite ist Silizium im Gegensatz zu typischen

Zellkultursubstraten, wie z. B. Glas und amorphe Polymere, optisch nicht transparent, so dass eine mikroskopische Beobachtung der Zellen erschwert wird. In der Silizium-Mikromechanik werden Mikrostrukturen in einem Silizium-Einkristall oder in siliziumhaltigen Substraten entweder mittels nass- oder trockenchemischer Ätzverfahren in der Tiefe des Materials erzeugt oder es werden durch verschiedene Abscheideprozesse (z. B. CVD, Chemical Vapour Deposition) Strukturen auf dem Substrat aufgebaut [16]. Häufig werden siliziumbasierte Techniken zum Erstellen einer mikrostrukturierten Matrize eingesetzt, um diese anschließend mit verschiedenen Materialien, z. B. mit PDMS oder Keramik, abzuformen. Erst diese abgeformten Strukturen werden dann entweder als Scaffolds [58,59], als strukturierte Zellkultursubstrate [39] oder wiederum für die Softlithografie verwendet (siehe oben). Die enge Verwandtschaft zwischen der Silizium-Mikromechanik und der Mikroelektronik wird beispielsweise genutzt, um elektrische Kopplungen zwischen künstlichen, elektronischen Halbleiter-Schaltkreisen und *in vitro* kultivierten Neuronen zu realisieren. Auf diese Weise sollen hybride, neuronale Netzwerke aufgebaut werden [60,61]. Im Bereich des Tissue Engineerings gibt es bisher jedoch nur wenige Ansätze mikrostrukturierte Siliziumsubstrate selbst als dreidimensionale Gerüststrukturen zu verwenden. So gibt es beispielsweise ein, dem polymeren Zellkulturträger des Forschungszentrums Karlsruhe, sehr ähnliches Scaffold-Design in Silizium [62]. Weiterhin gibt es Ansätze, Gerüstsysteme aus Silizium für den Aufbau künstlicher Gefäßsysteme zur Versorgung dreidimensionaler Gewebe herzustellen [63].

Verfahren basierend auf dem Rapid Prototyping finden seit kurzer Zeit auch zunehmende Beachtung im Bereich des Tissue Engineerings für die Erzeugung von teils komplex geformten und teils aus mehreren Materialien bestehenden, mikrostrukturierten Scaffolds [11,42-44]. Hier wird besonders die Möglichkeit genutzt, definierte Freiformflächen, beispielsweise in schaumartiger oder spongiöser Form, aus einem Material oder als Komposit in vergleichsweise kurzer Zeit herzustellen. In der Mikrotechnik wird das Rapid Prototyping im Wesentlichen für das Anfertigen von mikrotechnischen Prototypen, aber auch für die Abwicklung von Versuchs- und Kleinserien verwendet. Es umfasst inzwischen eine ganze Reihe von in den letzten Jahren entwickelten Verfahrensvarianten mit unterschiedlichsten Materialien [42]. Dieses Verfahren, das auf dem schichtweisen Aufwachsen, z. B. durch stereolithografische Methoden oder durch Lasersintern, von zwei- und dreidimensionalen mikrotechnischen Bauteilen beruht, wird auch bereits vereinzelt benutzt, um mikrotechnische Produkte in größerer Stückzahl herzustellen.

Zusammenfassend gilt, dass aus dem zwischenzeitlich großen Spektrum mikrotechnischer Verfahren bisher nur wenige gezielt eingesetzt werden, um definierte, dreidimensionale Gerüststrukturen für das Tissue Engineering zu fertigen. Des Weiteren wurde bisher der Großteil dieser Verfahren zur Herstellung von Prototypen für die Untersuchung sehr spezifischer Fragestellungen herangezogen, so dass in der Regel kein Augenmerk auf die Eignung der Fertigungsmethoden für eine Massenfertigung geworfen wurde. Nachfolgende Tab. 2-1 soll einen groben Einblick in die bis heute typischen Scaffold-Designs, die verwendeten Materialien und die entsprechenden Herstellungsverfahren geben:

Tab. 2-1 Auflistung verschiedener gebräuchlicher Scaffold-Designs, Materialien und Herstellungsverfahren

Design	Materialien	Verfahren	Arbeitsgruppe/ Literatur
Poröse Membranen/Filterstrukturen, Schaumstrukturen	z. B. Polymere, Keramiken	Sintern, Ionenspurtechnologie, Recken, Phaseninversion, ‚solvent casting and particulate leaching‘, ‚melt molding‘; 3D-Printverfahren; Gefrier-trocknung	[6,9,64-66]
Gelartige Matrizen	z. B. Fibrin, Kollagen, synth. Hydrogele	Gießen, Polymerisation	[67-71]
Poröse Mikrosphären bzw. Mikrokap-seln	z. B. Alginate, Agarose, bioab-baubare Polyme-re	Vertropfung (Zweistoffdü-sen)	[72-77]
Scaffolds im Chip-format	z. B. Polymere, Silizium	Lithografie, Mikrozerspan-nung, Kunststoffabformung usw.	[62,78-81]
Mikroporöse Hohlfasern	z. B. Polymere	Extrusion kombiniert mit Phaseninversion	[53-56,82]
Vliese/textile Gewebe	z. B. Polymere	Spinn- und Webtechniken, Flechten, Vernadelung	[57,83-85]
Freiformstrukturen	z. B. Polymere, Keramiken, Metalle	Stereolithografie, selektives Lasersintern, Lasergenerieren, 3D Printing, Fuse Deposition Modelling (FDM), Laminated Object Modelling (LOM), Organ printing etc.	[11,42-44,86-88]

2.2 Design und Anwendungsmöglichkeiten des polymeren, mikrostrukturier-ten Zellkulturträgers

Am Forschungszentrum Karlsruhe wurde ein mikrostrukturierter Zellkulturträger für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen bzw. Zellaggregaten entwickelt [12]. Auf der Basis zahlreicher Erkenntnisse mit dreidimensionalen multizellulären Sphäroiden [89,90] wurde ein

in Mikrocontainer unterteilter, chipförmiger Zellkulturträger entworfen, der mit gängigen Verfahren der Mikrostrukturtechnik hergestellt werden kann. Dabei wurden folgende Kriterien bzw. Überlegungen der Entwicklung und dem Design zugrunde gelegt:

Der chipförmige Zellkulturträger besitzt einen flachen, etwa 1 mm dicken Rahmen mit den Außenabmessungen von 20 x 20 mm², der einen zentralen, mikrostrukturierten Bereich von 10 x 10 mm² umschließt. Der Aufbau des Zellkulturträgers ist in Abb. 2-1 dargestellt und kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Array mit etwa 30 x 30 Mikrocontainern
- kubische, nach oben offene Mikrocontainer mit der Abmessung: 300 x 300 x 300 µm³, um Diffusionswege kleiner 150 µm zu erhalten
- mit pyramidenstumpfförmigen Vertiefungen mikrostrukturierte Containerböden, die eine räumliche Anordnung bzw. das dreidimensionale Wachstum der Zellen fördern
- mikroperforierter Boden der Mikrocontainer zur Versorgung der immobilisierten Zellen mit Nährmedium, entweder
 - passiv bei einer statischen Kultivierung, z.B. in einer Petrischale, durch Diffusion nicht nur von der Ober- sondern auch von der Unterseite
 - oder im Fall aktiver Versorgung in dem hierfür entwickelten Bioreaktor (siehe unten) durch das Überströmen oder Durchströmen der Zellen mit Nährmedium
- Perforation mit Poren kleiner 3 µm, um ein Migrieren von Zellen auf die Rückseite des Zellkulturträgers zu verhindern
- Containerzwischenwände mit einer Breite von 50 µm und einer Wandschräge von ca. 3°
- integrierte Aussparungen für die Zu- und Abführung des Mediums im Bioreaktor auf den zwei gegenüberliegenden Seiten des Rahmenbereichs
- plane Rahmenflächen für die Stapelung mehrerer Strukturen zu Zwecken der Skalierung

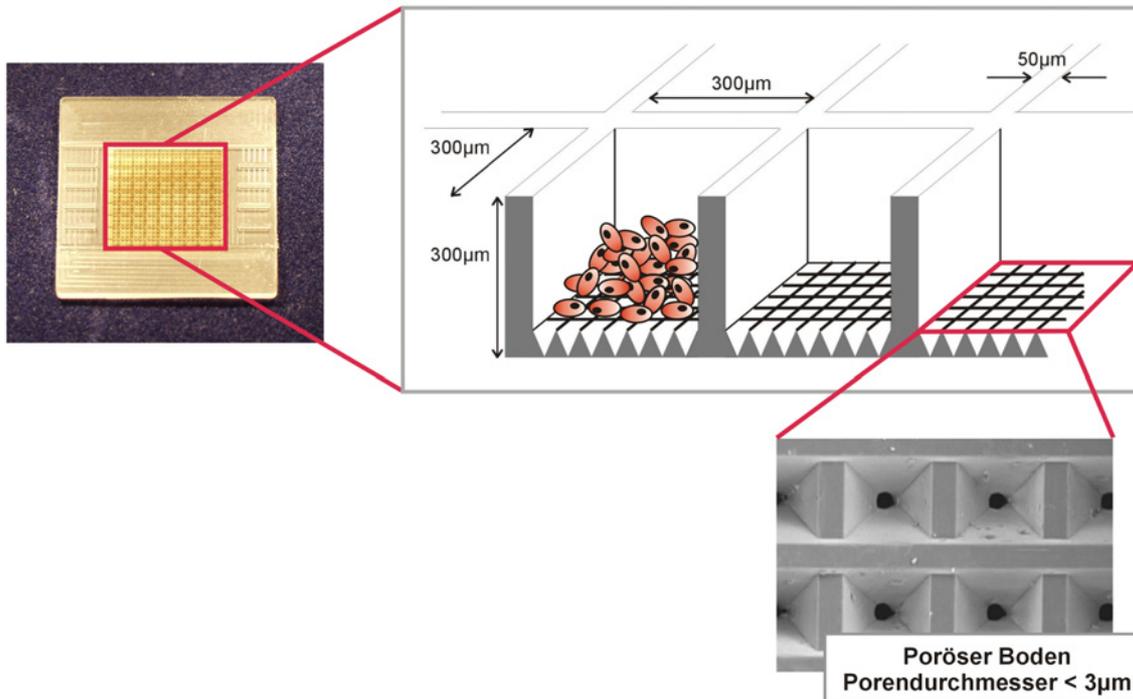


Abb. 2-1 Aufbau des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers des Forschungszentrums Karlsruhe. In der linken Abbildung ist der Zellkulturträger in der Aufsicht zu sehen. In der schematischen Querschnittsdarstellung, oben rechts, sind die Abmessungen der kubischen Mikrocontainer aufgeführt. Eine einzelne Kavität ist mit wenigen Zellen teilweise gefüllt. Das dritte Einschaltbild zeigt in einer REM-Aufnahme den pyramidenstumpfförmig strukturierten Boden mit Poren, deren Durchmesser ca. 2–3 µm betragen.

Dieses Design bietet für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen zahlreiche Vorteile, die mit anderen Kultivierungssystemen nicht oder nur teilweise realisiert werden können. Die Immobilisierung dreidimensionaler Zellaggregate in einer flächigen Struktur erlaubt eine parallele Analyse (z. B. mittels optischer Verfahren) der flächig angeordneten einzelnen Zellcontainer und eine potentielle Adressierung einzelner Kavitäten analog zu einem Mikrotiterplattenformat. Des Weiteren ermöglicht die flächige Anordnung der Mikrocontainer sowohl eine Überströmung bzw. Superfusion als auch eine Durchströmung bzw. Perfusion der Zellen mit Nährmedium. Die definierte Größe und Form der Kavitäten, die durch den Einsatz mikrostrukturtechnischer Verfahren möglich wird, bestimmt die darin immobilisierte maximale Größe der Zellaggregate sowie deren Form und damit auch die Ver- und Entsorgungswege aller Zellen. Darüber hinaus wird durch das mikrostrukturierte Design eine große Oberfläche für die Zelladhäsion bereitgestellt. Schließlich wird durch die modulartige Bauweise des Zellkulturträgers eine variable Skalierung des gesamten Kultivierungssystems ermöglicht.

Das Konzept des mikrostrukturierten Zellkulturträgers im Chipformat bietet eine breite Basis an verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten. So können beispielsweise Gewebemodelle für unterschiedliche Organe (Leber, Haut, Dünndarm, etc.) für die Grundlagenforschung bereitgestellt und Screenings von neuen Substanzen an standardisierbaren, dreidimensionalen

Gewebemodellen für die Pharma- und Wirkstoffforschung durchgeführt werden. In letzterem Anwendungsbereich sind auch Langzeitstudien an dreidimensionalen Zellkulturen und Penetrationsstudien von Agenzien durch definierte Gewebeschichten ein viel versprechender Ansatz. Im Bereich der medizinischen Diagnostik könnte eine solche gerasterte und adressierbare Struktur für die automatisierte Untersuchungen an einzelnen, isolierten Zellen genutzt werden. Schließlich ergibt sich durch die einfach zu skalierende Modulbauweise eine wichtige Anwendung in der klinischen Forschung und Therapie hinsichtlich des Aufbaus extrakorporaler, biohybrider Organunterstützungssysteme.

2.3 Bioreaktorsystem

Die Kultivierung von immobilisierten Zellen in den mikrostrukturierten Zellkulturträgern mit einer aktiven Mediumversorgung wurde in einem hierfür entwickelten Bioreaktorsystem durchgeführt. Das Bioreaktorgehäuse war sandwichartig aus mehreren Elementen aufgebaut (siehe Abb. 2-2). Den zentralen Teil des Bioreaktors bildete ein Kunststoffkörper gefertigt aus dem Hochleistungspolymer Polyetheretherketon (PEEK). In diesen Kunststoffkörper waren sowohl eine Vertiefung für die Aufnahme eines einzelnen Zellkulturträgers als auch vier in der Aufsicht senkrecht zueinander angeordnete Luer-Konus Anschlüsse zur Medienversorgung eingearbeitet. Zwei der Anschlüsse endeten gegenüberliegend in der Kavität oberhalb des Zellkulturträgers und zwei gegenüberliegend in einer Kavität unterhalb. Fluidisch abgedichtet wurden diese beiden durch den Zellkulturträger getrennten Hohlräume mittels eines von der Rückseite gegen den Zellkulturträger gepressten und im PEEK-Gehäuse eingelassenen O-Rings.

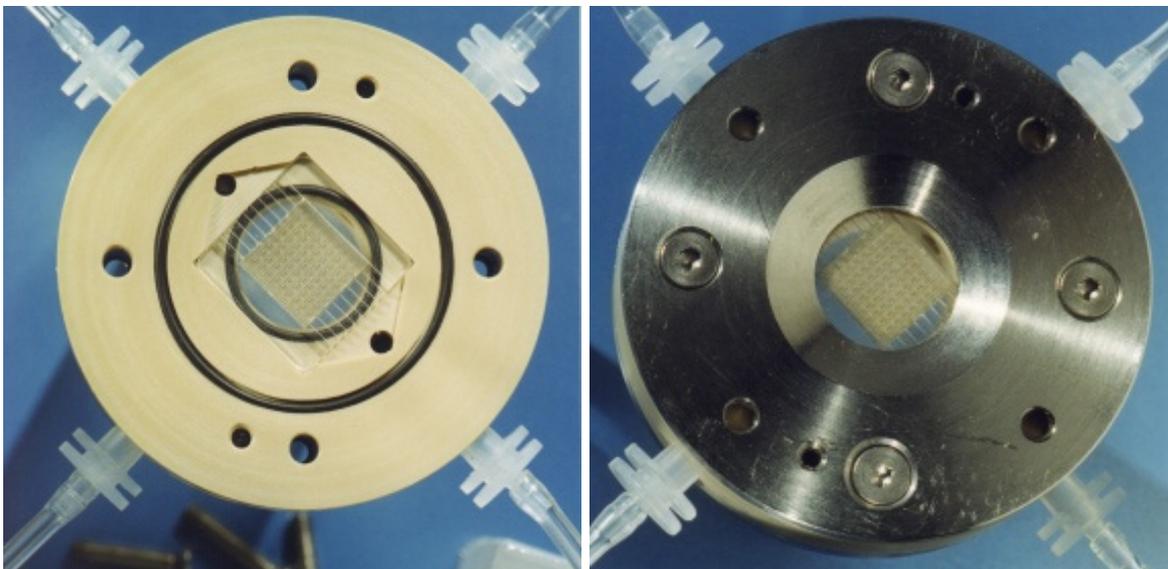


Abb. 2-2 Die linke Abbildung zeigt einen geöffneten ‚single-unit‘-Bioreaktor mit einem in das PEEK-Gehäuse eingelegten, spritzgegossenen Zellkulturträger in der Aufsicht. Auf der rechten Seite ist der geschlossene Bioreaktor zu sehen. Über die vier diametral angeordneten Luer-Anschlüsse erfolgt die Medienversorgung [91].

Aus einer sterilen Mediumvorlage konnte mit Hilfe einer Schlauchpumpe, je nach Belegung der vier fluidischen Anschlüsse, das Medium entweder in einem Superfusions- oder in einem Perfusionsmodus bereitgestellt werden. Darüber hinaus war es prinzipiell möglich unterschiedliche Medien oder Medienzusammensetzungen und unterschiedliche Strömungsparameter gezielt zu nutzen, um definierte chemische und physikalische Gradienten in den Gewebeschichten zu erzeugen. Der Bioreaktor wurde beidseitig steril durch flache Edelstahlringe geschlossen, die je ein Mikroskopier-Deckgläschen und einen Silikondichtungsring gegen den PEEK-Körper anpressten (siehe Abb. 2-2, rechts). Aufgrund der ringförmigen Ausgestaltung des Bioreaktor-Gehäuses sowie durch das Verschließen der zentralen Kavität mit Deckgläschen war eine permanente optische Kontrolle der zentral liegenden Mikrostruktur mit den immobilisierten Zellen möglich. Das gesamte Setup konnte sowohl in einem herkömmlichen Brutschrank als auch in einem Wärmerraum betrieben werden. Das Gehäuse war außerdem so ausgelegt, dass verschiedene Sensorsysteme prinzipiell mit in den Mediumfluss integriert werden konnten, z. B. zur online Messung verschiedener physikalischer und (bio-) chemischer Parameter.

2.4 Bisherige Methode der Herstellung des Zellkulturträgers

Die Replikation des Zellkulturträgers erfolgte bisher über einen mikromechanisch gefertigten Formeinsatz aus Messing (Ms58). Dieser besaß zwei nebeneinander angelegte Strukturfelder auf einer für das Forschungszentrum typischen Fläche für LIGA-Formeinsätze von 26 x 66 mm². Die inverse Geometrie der Masterstruktur wurde mittels eines CNC-gesteuerten, Hochgeschwindigkeits-Diamantfräsers mikrozerspanend am Institut für Mikroverfahrenstechnik (IMVT, Forschungszentrum Karlsruhe) gefertigt und kann sowohl für den Mikrospritzguss als auch für das Heißprägen genutzt werden. Im Hinblick auf eine zukünftige Herstellung der Struktur in großen Stückzahlen, wurde die Abformung bisher fast ausschließlich mittels eines (variothermen) Mikrospritzgussprozesses am Institut für Materialforschung (IMF-III, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt. Für die Fertigung der ersten Prototypen wurden die Kunststoffe Polymethylmethacrylat (PMMA, Typ G77 Q11) und Polycarbonat (PC, Typ 2405) verwendet, die sich im Spritzguss gut verarbeiten lassen. PMMA ist als biokompatibler Werkstoff bekannt, während PC für verschiedene Zellkulturanwendungen (Filtermembranen) und in medizintechnischen Produkten eingesetzt wird [92]. Weiterhin wurde der Zellkulturträger in diesem Design bereits mit biodegradierbaren Polymeren auf Basis von Glykol- und Milchsäure, PGA und PLA, im Spritzguss in einer kleinen Stückzahl gefertigt.

Die Kunststoffabformung war nur der erste Verfahrensschritt in einer längeren Prozesskette, die zur gebrauchsfertigen Herstellung des vorgestellten Zellkulturträgers notwendig war. Im Folgenden soll der gesamte Herstellungsprozess, wie er auch in Abb. 2-3 schematisch dargestellt ist, beschrieben und erläutert werden.

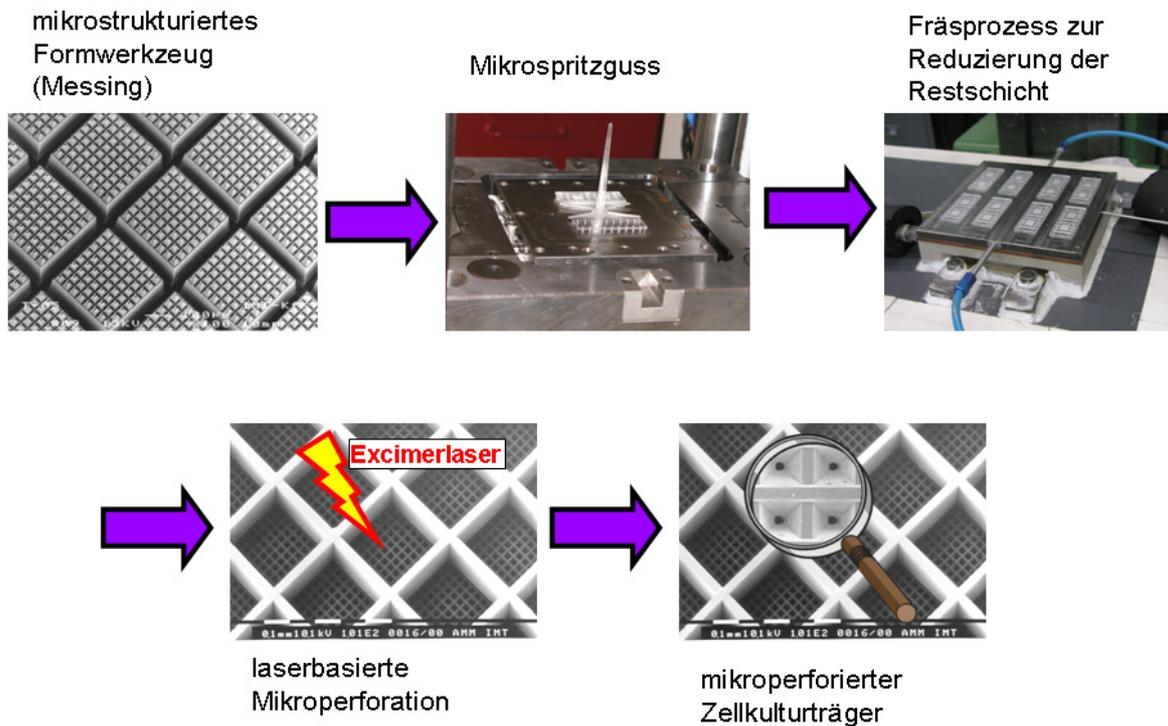


Abb. 2-3 Bisherige Form der Prozesskette zur Herstellung des laserperforierten Zellkulturträgers.

Ausgehend vom Kunststoffgranulat wurden pro Spritzgusszyklus jeweils zwei über die Angussstelle miteinander verbundene Rohlinge abgeformt. Diese bestanden jeweils aus einer Rahmenstruktur und zwei über Sollbruchstellen mit dem Rahmen verbundene Mikrostrukturen (siehe Abb. 2-3). Die strukturierte Restschicht der Spritzgussrohlinge diente einerseits der mechanischen Stabilisierung und andererseits erfolgte an dieser kammartigen Restschicht eine mechanische Verzahnung mit dem Gegenwerkzeug durch Hinterschnitt. Erst dadurch wurde eine Entformung des Kunststoffformkörpers aus dem Werkzeug möglich. Aufgrund der gewählten Geometrie und der sich daraus ergebenden Fließwege der Kunststoffschmelze, besonders im Bereich der 50 µm breiten Containerstege, musste die Abformung mittels eines variothermen Mikrospritzgussverfahrens erfolgen. Die benötigte Zykluszeit für diesen Prozess betrug daher etwa 3 min. Für die nachfolgenden Bearbeitungsschritte wurden die Spritzguss-Rohlinge vereinzelt und entgratet. Diese Schritte nahmen eine Zeit von etwa 2 h für etwa 80 Rohlinge in Anspruch.

Die Restschicht wurde danach in einem Prozess mittels einer CNC-gesteuerten Fräse (Deckel FP 3A, Ø 50 mm Diamantfräser mit 6 Schneiden, 1600 U/min) abgetragen. Um ein zerstörungsfreies Bearbeiten der Mikrostruktur zu ermöglichen, wurden 8 Kunststoffrohlinge (d. h. 2 x 8 Zellkulturträger) auf einer Vakuumspannplatte parallel fixiert und schließlich mit Wasser bei -10 °C festgefroren (siehe Abb. 2-3). Das Einspannen und Vereisen der Rohlinge dauerte durchschnittlich etwa 1,5 h. Die Restschicht der auf dieser Gefrierspannvorrichtung fixierten Zellkulturträger wurde anschließend in mehreren Frässchritten mit abnehmender Zustelltiefe und Vorschubgeschwindigkeit bis auf eine Dicke von etwa 80 µm reduziert. Dieses aufwändige Fräsprotokoll war erforderlich, um eine ausreichend hohe Oberflächenplanität für die nachfolgend durchgeführte, laserbasierte Mikroperforation der Contai-

nerböden zu erzielen. Die hohe Oberflächenplanität wird für diesen Prozess benötigt, da nur in der Abbildungsebene des Lasers die höchste Energiedichte für das Perkussionsbohren zur Verfügung steht. Aufgrund dessen ergab sich für die Reduzierung der Restschicht eines einzelnen Zellkulturträgers eine Bearbeitungszeit von ca. 15 min.

Für das anschließend am Institut für Materialforschung (IMF-I, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführte Laserperkussionsbohren mit einem Excimerlaser (Wellenlänge 248 nm) wurde eine mit Yag-Laserbearbeitung hergestellte Maske aus Stahl verwendet. Diese besaß auf einer Fläche von etwa 10 x 10 mm² Poren mit einem Durchmesser von etwa 20–30 µm. Aufgrund der Strahlführung des Excimerlasers wurde die Struktur der Maske etwa 10-fach verkleinert auf der Rückseite des etwa 50 cm entfernten Zellkulturträgers abgebildet. Bei einer Energiedichte von 4 J/cm² und einer Laserfrequenz von 15 Hz wurden etwa 150 Pulse für das Bohren der Poren benötigt. Durch diese maskenbasierte Lasermikroperforation konnte die gesamte mikrostrukturierte Fläche in 9 x 9 Positionierschritten von der Rückseite mit etwa 45000 Poren, mit einem Durchmesser von weniger als 3 µm, versehen werden (siehe Abb. 2-4). Dieser Vorgang dauerte für einen einzelnen Zellkulturträger etwa 10 min.

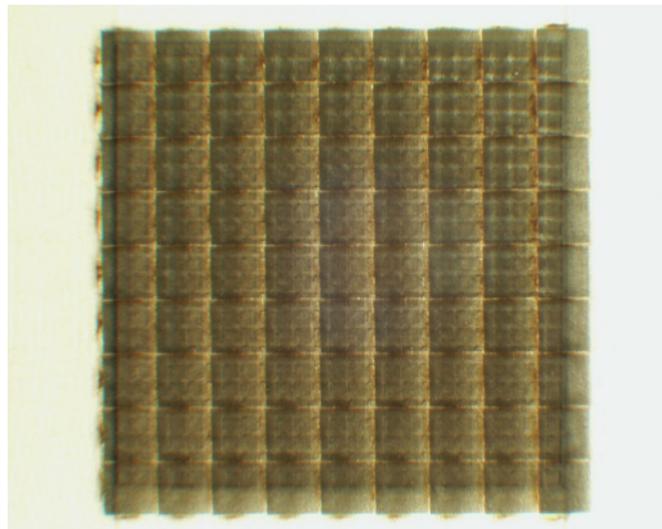


Abb. 2-4 Rückseite eines laserperforierten, spritzgegossenen Zellkulturträgers. Deutlich ist das Positioniergitter der Maske (9 x 9) über dem mikrostrukturierten Bereich des Zellkulturträgers zu erkennen.

2.5 Kostenstruktur des bisherigen Herstellungsverfahrens

Das bisherige Verfahren zur Herstellung des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers, wie es im Kapitel zuvor beschrieben wurde, zeichnete sich durch einen sehr hohen Zeit- und Arbeitsaufwand aus. Dieser hohe Aufwand ergab sich einerseits durch die notwendigen Arbeitsschritte zur mechanischen Nachbearbeitung der Spritzgussrohlinge, um die strukturierte Restschicht auf ein Niveau von etwa 80 µm Dicke mit hoher Oberflächengüte zu reduzieren, und andererseits durch den nachfolgenden Einsatz einer laserbasierten Mikroperforationsmethode, um die Böden der Zellcontainer mit etwa 45000 Poren kleiner 3 µm zu versehen. Insbesondere der aufwändige Fräsprozess war mit ca. 15 min Bearbeitungszeit für einen einzelnen Zellkulturträger in dieser Form ungeeignet, um in einem automatisierten

Prozess große Stückzahlen kostengünstig herstellen zu können. Die laserbasierte Mikroperforationsmethode stellt zwar prinzipiell ein großserientaugliches Verfahren dar, aber aufgrund relativ geringer Standzeiten und intensiver Wartungsarbeiten der optischen Einrichtungen ist diese Methode sehr kostenintensiv. Die Herstellungskosten für den mikrostrukturierten Zellkulturträger, basierend auf dem bisherigen Verfahren (Tab. 2-2; siehe auch Abb. 2-3), gliederten sich wie folgt:

Tab. 2-2 Kostenstruktur und Dauer der Prozessschritte des bisherigen Herstellungsverfahrens

Bearbeitungsschritt	Prozesszeit	Kosten
Mikrospritzguss (Variotherm-Prozess; inkl. Formeinsatz- und Materialkosten pro spritzgegossenem Teil)	ca. 3 min pro Zellkulturträger	etwa 0,20 bis 0,70 €
Vereinzeln, Entgraten und Gefrierspannen	ca. 5 min pro Zellkulturträger	ca. 3,30 € (bei einem durchschnittlichen Stundensatz von 40 €)
Mechanische Bearbeitung der Restschicht	ca. 15 min pro Zellkulturträger	ca. 10 € (bei einem durchschnittlichen Stundensatz von 40 €)
Laserbasierte Mikroperforation (inkl. Prozessgase, Lasergase, Wartungsarbeiten an Laser und Anlage und der Austausch optischer Elemente (Spiegel, Linsen, Objektive, Homogenisator, Abschwächer) nach 6-12 Monaten Betriebsdauer; Weitere Aufwendungen, z. B. für Personal, wurden nicht berücksichtigt)	ca. 10 min pro Zellkulturträger	ca. 29 € pro Zellkulturträger
Gesamt pro Zellkulturträger	ca. 30 min	ca. 43 €

Damit ergaben sich für die bisherige Herstellung des Zellkulturträgers im Labormaßstab, ohne eine Berücksichtigung weiterer Betriebsmittel, Umrüstarbeiten und Wartungsarbeiten, Produktionskosten von etwa 43 € pro Stück.

Die durchgeführte Kostenkalkulation eines potentiellen, externen Industriepartners über einen möglichen Fertigungsauftrag zur laserbasierten Mikroperforation von spritzgegossenen Zellkulturträgern führte ebenfalls zu keiner kostengünstigeren Herstellung der bisherigen Form des mikrostrukturierten Zellkulturträgers. Hier wurden allein die Kosten für die Perfora-

tion eines einzelnen Zellkulturträgers mit einem Excimerlaser auf etwa 100 € und für die Perforation von 1000 Zellkulturträgern auf etwa 96500 € veranschlagt.

3 Mikrotechnische Arbeiten

3.1 Konzepte zur Herstellung des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers

3.1.1 Zielsetzungen

Um einerseits der Aufgabenstellung im Hinblick auf die Vereinfachung der Herstellung des polymeren mikrostrukturierten Zellkulturträgers und andererseits dem kontinuierlichen Bedarf an Zellkulturträgern im Labor für dessen biologische Validierung gerecht zu werden, wurden bei dieser Arbeit zwei Strategien parallel verfolgt. Die erste Strategie umfasste dabei die fortlaufende Vereinfachung des bestehenden Herstellungsprozesses durch Änderungen einzelner Prozessschritte und stellte damit einen kurz- bis mittelfristigen Ansatz dar. Daneben wurde eine langfristige Strategie verfolgt, bei der auch vollständig neue Herstellungsverfahren und auch neue Materialien mit in Betracht gezogen wurden. Folgende Kriterien wurden dabei der Ausarbeitung beider Strategien zu Grunde gelegt:

- Vereinfachte Herstellung des Zellkulturträgers im Vergleich zu der bisherigen Variante hinsichtlich der Anzahl und des Umfangs der einzelnen Prozessschritte
- Annäherung an einen gewählten Richtwert für die Herstellungskosten des Zellkulturträgers von etwa 0,50 €
- Erhöhung der Variabilität und verbesserte Anpassungsfähigkeit des Zellkulturträgers durch eine Steigerung der Kombinationsmöglichkeiten des Herstellungsprozesses mit (Oberflächen-) Modifikationstechniken
- Eignung der neuen Herstellungsverfahren für eine Massenproduktion

In Abb. 3-1 sind neben der bisherigen Herstellungsmethode (erste Spalte) eine Auswahl verschiedener Verfahren bzw. Prozesse schematisch aufgeführt, die für die Fertigung des mikrostrukturierten Zellkulturträgers diskutiert wurden. In den folgenden Abschnitten werden diese Prozesse bzw. Verfahrenskombinationen kurz erläutert. Auf die praktische Umsetzung des kurzfristigen Ansatzes (Abb. 3-1, zweite Spalte, blau hinterlegt) wird in Kapitel 3.2 ausführlicher eingegangen, während die theoretischen Grundlagen und ersten Versuche zu den ausgewählten Prozessen der langfristigen Strategie (Abb. 3-1, orange hinterlegt) im Kapitel 3.3 dargelegt werden.

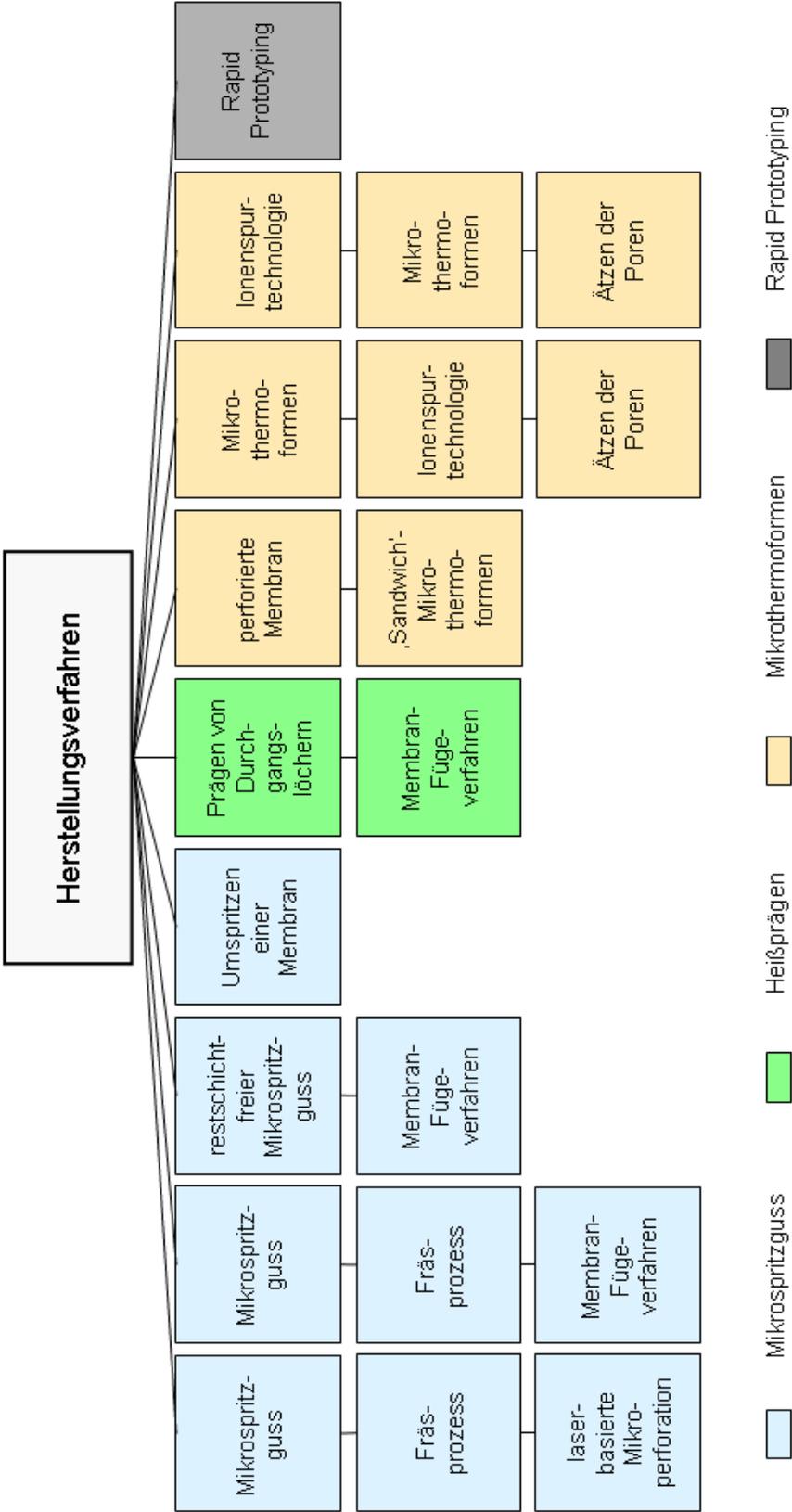


Abb. 3-1 Schematische Übersicht über denkbare Fertigungsmethoden für den polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträger.

3.1.2 Kurzfristige Strategie – Mikrospritzguss kombiniert mit Membran-Bondprozess

Die kurzfristige Strategie (siehe Abb. 3-1, zweite Spalte, blau hinterlegt) sah eine Beibehaltung des Mikrospritzgussprozesses vor, da das Verfahren momentan eines der schnellsten und ein, im Hinblick auf große Stückzahlen, vergleichsweise kostengünstiges Mikroreplikationsverfahren darstellt. Vorderstes Ziel dieses Konzeptes war es daher, einerseits den Aufwand bei dem auf den Replikationsschritt folgenden Fräsprozess zu reduzieren und andererseits die deutlich zu kostenintensive Laserperforation durch ein vereinfachtes, schnelleres und kostengünstigeres Verfahren zu ersetzen. Verschiedene Ansätze innerhalb dieser kurzfristigen Strategie sind in der Abb. 3-1 blau hinterlegt. Die grundlegende Idee zur Reduzierung des Herstellungsaufwandes bei diesem Konzept war es, den abgeformten und perforierten Boden der Zellcontainer durch das Aufbringen einer vorgefertigten, mikroperforierten Kunststoffmembran auf die Rückseite des Zellkulturträgers zu erhalten. Zudem steigert diese Vorgehensweise die Variabilität des Zellkulturträgers, indem es prinzipiell einen Aufbau aus verschiedenen Materialien für die beiden Module, der Membran und der Gerüststruktur, ermöglicht. Die beiden Module können außerdem vor dem Verbindungsverfahren einer unabhängigen und möglicherweise verschiedenen Vorbehandlung unterzogen werden. Und schließlich ist die Verwendung von verschiedenen Membrantypen mit unterschiedlichen Poreneigenschaften denkbar. Die restschichtfreie Abformung des Zellkulturträgers durch Spritzguss, wie es beispielsweise bei der Abformung verschiedener makroskopischer Teile möglich ist, oder das Umspritzen einer mikroperforierten Membran würde den Gesamtaufwand der Herstellung aufgrund des Wegfalls des Fräsprozesses bzw. des Fräsprozesses und dem Fügeverfahren deutlich senken. Da jedoch eine zuverlässige Abformung eines Arrays mit oben und unten offenen Mikrocontainern in einem solchen Design mittels Mikrospritzguss wahrscheinlich auch in naher Zukunft nicht realisierbar erschien, wurden diese Konzepte zwar aufgeführt und in Erwägung gezogen, aber nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Heißprägen und Membran-Bondprozess

Ein zweiter, diskutierter Ansatz beruhte auf der Herstellung des Zellkulturträgers durch Heißprägen (grün hinterlegt). In diesem Fall hätten das Design und die bereits für den Mikrospritzguss bestehenden Formeinsätze übernommen werden können. Ein solches Verfahren für die Fertigung des Zellkulturträgers würde jedoch nur unter den Umständen Vorteile gegenüber dem deutlich schnelleren Spritzgussprozess erbringen, falls es gelingt Durchgangslöcher zu prägen [93,94]. Dadurch wäre eine direkte Abformung des Zellkulturträgers mit oben und unten offenen Zellcontainern möglich und der nach der Replikation bisher erforderliche Fräsprozess könnte vollständig entfallen. Die Laserperforation könnte hierbei ebenfalls durch das Aufbringen einer dünnen mikroperforierten Membran mit einer geeigneten Verbindungstechnik ersetzt werden.

3.1.4 Langfristige Strategie – Mikrothermoformen

Der in Abb. 3-1 dargestellte, dritte große Block (orange hinterlegt) fasst die drei ursprünglich angedachten Ansätze zur Herstellung des Zellkulturträgers mittels Mikrothermoformen zusammen. Das Mikrothermoformen mit dünnen Kunststofffolien wurde vor kurzer Zeit am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelt [95] und stellt daher ein sehr neues Verfahren in der Mikrostrukturtechnik dar. Aufgrund des großen Entwicklungspotenzials dieses Verfahren,

bilden die Konzepte rund um das Mikrothermoformen die langfristige Strategie für die Herstellung des mikrostrukturierten Zellkulturträgers (siehe Kapitel 3.3).

3.1.5 Rapid Prototyping

Einen vierten Block (Abb. 3-1, grau hinterlegt) stellt ein Verfahren basierend auf dem so genannten ‚Rapid Prototyping‘ dar (siehe Kapitel 2). Für den Fall des polymeren Zellkulturträgers des Forschungszentrums Karlsruhe würde dieses Verfahren die direkte Herstellung von Zellkulturträgern entweder mit definiert dicken Zellcontainerböden oder einem oben und unten offenen Zellcontainerarray prinzipiell ermöglichen, so dass auch hier ein aufwändiges Abfräsen der Restschicht entfallen könnte. Unter Umständen ist mittels einer maskenbasierten Variante auch die Herstellung eines mikroporösen Bodens mit Poren kleiner $3\ \mu\text{m}$ möglich, so dass der Boden direkt mikroperforiert gefertigt werden und sogar das Bonden einer perforierten Membran auf den Zellkulturträger entfallen könnte. Der Vorteil dieses Verfahrens wäre somit eine direkte Herstellung des Zellkulturträgers ohne teure Formwerkzeuge und ohne eine aufwändige Nachbearbeitung. Das Verfahren ermöglicht weiterhin eine schnelle Änderung der Geometrie des Bauteils, so dass eine schnelle Anpassung, beispielsweise für den Aufbau eines Stapels, möglich ist. Bisher wurden jedoch im Rahmen dieses Projektes noch keine Versuche hinsichtlich der Realisierbarkeit des Zellkulturträgerdesigns durchgeführt. Des Weiteren ist dieses Verfahren vorzugsweise für die Prototypenherstellung und für Kleinserien geeignet, so dass eine angestrebte, kostengünstige Massenfertigung des Zellkulturträgers mit dem Rapid-Prototyping wahrscheinlich nicht erreichbar sein wird.

3.2 Strategie I: Kombination Spritzguss – Lösungsmittelschweißen

3.2.1 Verbindungstechniken für mikrostrukturierte Polymere

Die Grundlage der kurzfristigen Strategie war, in Anlehnung an die bisherige Methode, das Mikrospritzgießen zur Replikation des Zellkulturträgers weiterhin zu nutzen. Da mit diesem Verfahren jedoch weder Mikroporen noch restschichtfreie Containerarrays bzw. Durchgangslöcher bei diesen Geometrieverhältnissen gefertigt werden können, müssen sich weitere Verfahrensschritte angliedern, die die Erzeugung eines mikroporösen Bodens im Zellcontainerarray ermöglichen. Als Ersatz für den zu arbeits- und zeitintensiven Prozess der Lasermikroperforation wurde im Rahmen der kurzfristigen Strategie eine Verbindung einer vorgefertigten, mikroporösen Membran mit dem spritzgegossenen und beidseitig geöffneten Grundkörper des Zellkulturträgers vorgesehen. Die hierzu notwendige Füge-technik muss einerseits der Bedingung der Biokompatibilität genügen und muss andererseits eine langzeitstabile und fluidisch dichte Verbindung zwischen dem mikrostrukturierten Kunststoffgrundkörper und einer polymeren Mikrofiltrationsmembran ermöglichen.

Für die Verbindung von Kunststoffbauteilen sind verschiedene Wirkprinzipien, Stoffschluss, Formschluss, Kraftschluss und Kraftformschluss, anwendbar. Die meisten der zugehörigen Verbindungstechniken wurden für den Aufbau makroskopischer, integrierter Bauteile entwickelt, können aber entweder unverändert oder in ähnlicher Weise auch im mikrotechnischen Bereich eingesetzt werden. Wichtige Verbindungsverfahren im Bereich des Stoffschlusses sind beispielsweise die Kleb-, Siegel- und Schweißverfahren, während ein Formschluss z. B.

mit Schnappen, Nieten, Bördeln, Umspritzen und Stift- bzw. Bolzenverbindungen hergestellt werden kann. Pressen, Schrumpfen, Schrauben und Klemmen sind typische Verfahren, um einen Kraftschluss zu erzielen. Die kombinierte Variante des Kraftformschlusses wird in der Regel über Schrauben, Nieten oder über Schnappen realisiert. Während im Übergangsbereich der Feinwerktechnik zur echten Mikrotechnik vielfach Verfahren angewendet werden, die auf Form- bzw. Kraftschluss beruhen, sind in der Mikrotechnik im Wesentlichen Verbindungstechniken basierend auf dem Stoffschluss vertreten.

Die Silizium-Mikrotechnik bedient sich hierbei typischerweise Verfahren, wie dem anodischen Bonden, dem ‚Silicon Fusion Bonding‘ und dem eutektischen Bonden, z. B. um Silizium mit Silizium oder auch um Silizium mit Glas zu verbinden. In der Kunststoff-Mikrotechnik werden vorzugsweise Kleb-, Siegel- und Schweißverfahren verwendet, beispielsweise um Kanäle und Mikrokavitäten mikrofluidischer Bauteile (z. B. Lab-on-a-Chip-Systeme) zu deckeln [96,97]. Das Laserschweißen ist ein flexibles, kontaktloses und schnelles Verbindungsverfahren, das u. a. auch in der Mikrotechnik eingesetzt wird. Wichtige Parameter bei diesem Verfahren, das für nahezu alle thermoplastischen Kunststoffe anwendbar ist, sind die Wellenlänge des eingesetzten Lasers (z. B. CO₂-Laser, Nd:YAG-Laser, Hochleistungsdiodenlaser), die eingebrachte Energie, die Absorptionseigenschaften des bzw. der zu verschweißenden Polymere und die Fügeform [98]. Durch das Einbringen von absorbierenden Additiven und Pigmenten sind auch transparente Kunststoffe miteinander verschweißbar (Laserdurchstrahlschweißen). Andere Schweißverfahren (Ultraschallschweißen, Heizelementschweißen, Warmgasschweißen, Induktionsschweißen etc.), mit Ausnahme des thermischen Schweißens, kommen im Bereich der Mikrotechnik eher selten oder gar nicht zum Einsatz. Im Allgemeinen stellt die Maßbeständigkeit und Dimensionsstabilität der Mikrostrukturen bei diesen Verbindungstechniken, die auf einem Wärmeeintrag basieren, einen kritischen Faktor dar, da hier besonders die Gefahr einer geometrischen Änderung der Mikrostrukturen aufgrund der einwirkenden Anpresskraft und der thermisch bedingten Erweichung des Kunststoffs besteht. Moderne Ansätze versuchen diese Problematik zu umgehen, indem die Erweichungstemperatur oberflächennaher Schichten des Kunststoffs im Bereich der Fügeflächen z.B. durch eine UV-Bestrahlung herabgesetzt wird. Dadurch kann ein Bonden der Teile bei einer geringeren Temperatur erfolgen, wodurch die thermische Belastung empfindlicher Mikrostrukturen verringert wird [97].

Das Kammer- oder Kapillarkleben ist ein Verfahren, das z. B. beim so genannten AMANDA-Verfahren (entwickelt am Forschungszentrum Karlsruhe) genutzt wird, um mikrofluidische Bauteile (abgeformte Gehäuse, fotolithografisch strukturierte Membranen, etc.) leakagefrei miteinander zu verbinden [99]. Hierbei dienen definierte, meist in das Gehäuse eingebrachte Kanäle und Kavitäten der hydraulischen und kapillaren Füllung mit Klebstoffen, um eine unkontrollierte Verteilung des Klebstoffs zwischen den Fügepartnern zu vermeiden und nur speziell ausgewiesene Adhäsionsflächen zu benetzen. Das Arbeiten mit Klebstoffen erfordert in der Mikrotechnik erhöhte Achtsamkeit hinsichtlich der Gefahr des Verschließens oder der Verlegung von fluidischen Kanälen und Hohlräumen. Eine mögliche Alternative zum Kammerkleben stellt hier auch die Anwendung von Dünnschichttechniken dar. Hierbei wird der Klebstoff in so dünnen Schichten flächig oder strukturiert z. B. durch Aufschleudern oder Aufdrucken auf die Fügepartner aufgebracht [100], dass ein Fließen des Haftvermittlers in mikrostrukturierte Bereiche nicht möglich ist.

Im Bereich der Folien- und Verpackungstechnologie werden häufig relativ niedermolekulare, thermoplastische oder auch vernetzende, reaktive Siegelschichten eingesetzt, die in sehr geringen Dicken (in der Regel wenige 100 nm) flächig oder partiell aufgetragen werden können (z. B. in Coextrusion) und eine gegenüber den zu verbindenden Kunststoffbauteilen deutlich erniedrigte Erweichungs- bzw. Schmelztemperatur aufweisen. Als Materialien für Siegelschichten werden heutzutage vorzugsweise Copolymere des Ethylens mit höheren Olefinen, mit Ethylenvinylacetat oder auch mit Ionomen verwendet [101]. Dieser Prozess wird mitunter auch im mikrotechnischen Bereich eingesetzt, beispielsweise um Mikrokapillarstrukturen mit dünnen Folien zu deckeln [95].

Das Lösungsmittelschweißen steht technisch zwischen den bereits genannten Verfahren des Siegelns und des Klebens [101]. Hierbei wird durch den Kontakt der zu verbindenden Flächen mit einem geeigneten, leicht flüchtigen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch die Oberflächen der Bauteile kurzzeitig angelöst und miteinander verpresst. Nach dem vollständigen Entfernen des Lösungsmittels besteht eine feste Verbindung zwischen den Bauteilen. Auch hier ergibt sich das Problem der Maßhaltigkeit und Dimensionsstabilität, da die polymeren Bauteile in einem gequollenen Zustand einer äußeren Krafteinwirkung unterliegen. Dieses Verfahren wurde u. a. bereits im Bereich Tissue Engineering genutzt, um dreidimensionale Scaffolds durch das flächige Verschweißen von porösen Membranen mit Lösungsmittel herzustellen [9,102].

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen deutlich, dass die Bandbreite der eingesetzten Verbindungs- und Fügeverfahren im Bereich der Mikrotechnik trotz mikroskopischer Bauteilgeometrien recht hoch ist. Dies trägt in der Regel der Tatsache Rechnung, dass die eingesetzten Verfahren speziell an die entsprechenden Anwendungen und Geometrien angepasst sind und somit fast durchgehend Nischenlösungen darstellen.

3.2.2 Theorie Lösungsmittelschweißen

Für das Verbinden der mikroperforierten Membran (Polycarbonat, 3 µm Porendurchmesser, 10 µm dick, Osmonics Inc.) mit dem mikrostrukturierten, spritzgegossenen Grundkörper des Zellkulturträgers wurde das Lösungsmittelschweißen ausgewählt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für ein flächiges und irreversibles Fügen von Thermoplasten. Dabei erfolgt ein Verbinden der Kunststoffbauteile, ohne dass ein zusätzlicher Haftvermittler im Endprodukt verbleibt. Dies stellt, z. B. gegenüber dem Einsatz von Klebstoffen, einen wichtigen Vorteil für die angestrebte Biokompatibilität dar.

Thermoplastische Kunststoffe sind hochmolekulare Werkstoffe, deren lineare oder verzweigte Polymerketten über verschiedene zwischenmolekulare Kräfte wechselwirken. Wird ein Polymerfestkörper einem niedermolekularen, gasförmigen oder flüssigen Lösungsmittel ausgesetzt, so adsorbieren die Lösungsmittelmoleküle zunächst an der Oberfläche und dringen anschließend aufgrund der Brownschen Molekularbewegung und des bestehenden Konzentrationsunterschiedes in den Festkörper ein. Die Verteilung der Lösungsmittelmoleküle erfolgt innerhalb des polymeren Körpers durch Diffusionsvorgänge. Je nach Löslichkeit, die z. B. durch das Molekulargewicht, der Molekülgestalt und der Temperatur maßgeblich beeinflusst wird [103], wird eine bestimmte Menge der niedermolekularen Substanz im Polymeren gelöst. Diese Vorgänge stehen im Gleichgewicht mit dem gleichzeitig stattfindenden

den Desorptionsprozess, bei dem ein bestimmter Anteil an Lösungsmittel aus dem Festkörper an die Umgebung abgegeben wird. Durch die Bildung von Solvathüllen aus Lösungsmittelmolekülen werden die zwischenmolekularen Kräfte im Polymer teilweise oder auch vollständig aufgehoben. Dies bewirkt eine Zunahme der Beweglichkeit der Polymerhaupt- und Seitenketten oder zumindest Teile dieser.

Werden zwei an der Oberfläche gequollene bzw. angelöste Bauteile an ihren Fügeflächen miteinander verpresst, so bildet sich eine gemeinsame Diffusionszone mit einer erhöhten mikrobrownschen Molekularbewegung der Polymerketten. Dadurch können diese ineinander greifen bzw. in Wechselwirkung treten. Im günstigsten Fall entstehen vermehrt neue zwischenmolekulare Bindungen und eine temporäre physikalische Vernetzung in Form von Verschlaufungen und Verhakungen zwischen den Polymerketten der beiden Fügepartner. Das Entfernen des Lösungsmittels aus der direkten Umgebung der verpressten Teile führt zu einer Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts in Richtung Desorption. Eine Abnahme der Konzentration der Lösungsmittelmoleküle ist gleichbedeutend mit dem Einfrieren der neu angeordneten Kettenpositionen, wodurch sich eine stabile Verbindung ohne eine stoffverschiedene Zwischenschicht ergibt. Ein Restgehalt an Lösungsmittel kann jedoch je nach Kunststoff und Lösungsmittel und je nach Bauteilgeometrie eventuell über einen sehr großen Zeitraum im verschweißten Material verbleiben [103](siehe Stichwort Inklusion, Kapitel 3.2.10).

3.2.3 Redesign des Formeinsatzes

Das Ersetzen der mikrostrukturierten Containerböden des Zellkulturträgers durch eine vorgefertigte, mikroporöse Membran ermöglichte eine Vereinfachung der Geometrie des zugehörigen Formeinsatzes [104]. Die Anpassung des Formeinsatzdesigns an dieses neuartige Herstellungsverfahren beinhaltete verschiedene Punkte. Der ursprünglich mikrostrukturierte Boden der Container wurde durch flache, unstrukturierte Containerböden ersetzt (siehe Abb. 3-2, links) und die Wandschräge der Containerwände wurde auf etwa $5\text{--}7^\circ$ erhöht. Der Verzicht auf die mikrostrukturierten Böden der Zellcontainer erlaubte prinzipiell einen vereinfachten Spritzgussprozess mit geringerer Zykluszeit. Die Füllung des Formeinsatzes mit Kunststoffschmelze war infolge der reduzierten geometrischen Anforderungen einfacher und schneller zu gewährleisten. Jedoch konnte auch bei diesem Design nicht auf die, auf der Rückseite befindliche, strukturierte Restschicht als Entformhilfe verzichtet werden. Somit musste auch hier in einem nachfolgenden Bearbeitungsschritt diese Restschicht, z. B. mittels Fräsen, abgetragen werden. Den Gitterstegen der Mikrocontainer im mikrostrukturierten Bereich wurde ein zusätzlicher Vorhalt von $100\ \mu\text{m}$ zugewiesen, so dass sie nach der Abformung eine Höhe von insgesamt $400\ \mu\text{m}$ besaßen. Im anschließenden Fräsprozess konnten dadurch zusätzlich zur Restschicht die ersten $100\ \mu\text{m}$ der Rückseite der Mikrostruktur mit abgetragen werden. Die ursprüngliche Containersteghöhe von $300\ \mu\text{m}$ blieb somit letztendlich erhalten. Der Fräsprozess wurde dadurch im Vergleich zum bisherigen vereinfacht, da eine hochpräzise Bearbeitung auf eine plane und definiert dicke Restschicht nicht mehr erforderlich war. Zusätzlich gewährleistete diese Vorgehensweise der Nachbearbeitung des Rohlings ein sicheres Entfernen der gesamten Restschicht und ein vollständiges, rückseitiges Öffnen der Container. Das Auftreten von Restmaterial und Grate auf der Unterseite des Zellkulturträgers, die den anschließende Fügeprozess und eine

reproduzierbare Kultivierung von Zellen in den Mikrocontainern behindern würde, konnte so vermieden werden.

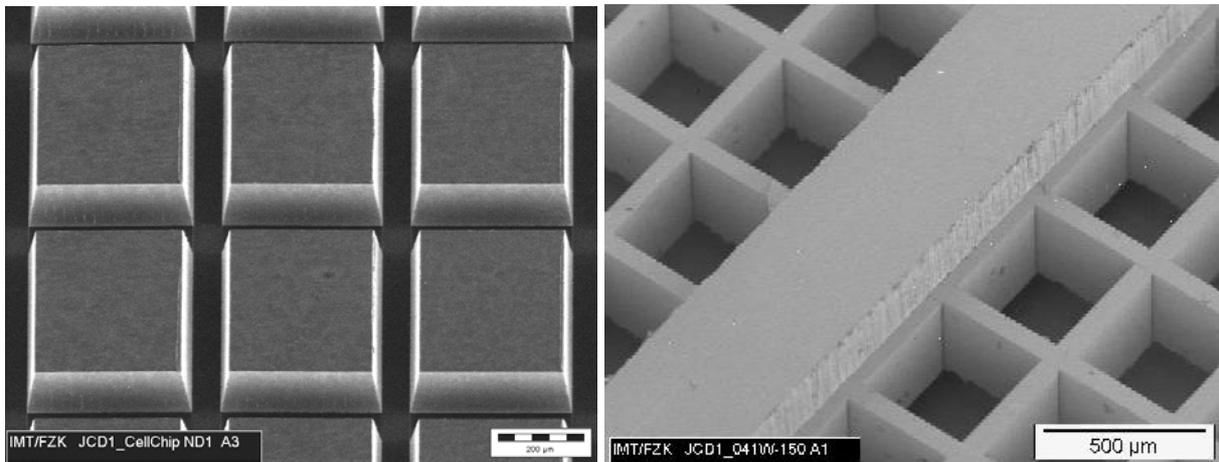


Abb. 3-2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Teilbereichen des Formeinsatzes (links, Messbalken entspricht 200 µm) und eines abgeformten Zellkulturträgers mit dem neuen Design. Der Ausschnitt rechts zeigt den mittleren, verlängerten Strömungssteg. Die Restschicht inklusive der unstrukturierten Containerböden wurde bereits vollständig entfernt.

Weiterhin wurde einer der so genannten Strömungsstege im Randbereich des Zellkulturträgers zur mechanischen Stabilisierung in gleich bleibender Höhe mittig über den gesamten mikrostrukturierten Containerbereich geführt. Aus Symmetriegründen wurden daher nur noch drei dieser Strömungsstege in den Versorgungsöffnungen des Rahmens vorgesehen. Der mittlere Steg besaß eine Breite von 400 µm, so dass für die Immobilisierung von Zellen genau eine Mikrocontainerreihe weniger zur Verfügung stand (siehe Abb. 3-2, rechts). Die mechanische Stabilisierung des Mikrostrukturarrays durch diesen zentralen Strömungssteg ermöglichte eine Verringerung des Ausschusses, der durch das Ausbrechen von Gitterstrukturbereichen während des Fräsprozesses entstand. Des Weiteren wurden außerdem die Höhe der seitlich gegenüberliegenden Versorgungsöffnungen im Rahmenbereich auf 150 µm und der Abstand von der unteren Kante der seitlichen Versorgungsöffnung zur oberen Kante der Mikrocontainerstege auf 40 µm herabgesetzt. Dieses Design des Formeinsatzes wurde, wie bereits bei den Formeinsätzen zuvor, mittels einer CNC-gesteuerten, Hochgeschwindigkeits-Fräsmaschine mit Diamantfräser mikrozerspanend in Form von zwei identischen Mastern (LIGA-Format: 26 x 66 mm²; 2 Formnester; Material: Ms58) am IMVT gefertigt.

3.2.4 Prototyp einer Lösungsmittelschweißanlage im Labormaßstab

Das Lösungsmittelschweißen von makroskopischen Bauteilen ist ein vergleichsweise einfach zu kontrollierender Prozess. Die meist großen Fügeflächen können mit einem geeigneten Lösungsmittel, das in der Regel einen nicht allzu hohen Dampfdruck besitzt, benetzt und angelöst werden, ohne dass funktionelle und möglicherweise filigrane Bereiche der Bauteile mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen. Das Anlösen der Oberfläche kann bei vielen Kunststoffen visuell und auch haptisch überprüft werden, wodurch in der Regel eine einfache Prozesssteuerung möglich wird. Mikrotechnische Bauteile besitzen ein im Vergleich zu

makroskopischen Teilen deutlich gesteigertes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Dies erfordert eine präzisere Steuerung der oberflächenwirksamen Prozesse während des Lösungsmittelschweißens, z. B. hinsichtlich der Einwirkungsdauer. Des Weiteren ist eine gezielte Benetzung der Fügeflächen mit Lösungsmittel häufig aufgrund der reduzierten Größe oder der eingeschränkten Erreichbarkeit nicht mehr möglich und das Anlösen der Oberfläche kann meist nicht mehr visuell oder haptisch verfolgt werden.

Aus den genannten Gründen wurde für die Verschweißung einer mikroperforierten Folie mit einem spritzgegossenen, mikrostrukturierten und beidseitig geöffneten Zellkulturträger ein am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT, Forschungszentrum Karlsruhe) entwickelter Gasphasen-Lösungsmittelschweißprozess adaptiert, der diese Nachteile weitestgehend kompensieren kann. Hierbei wird eine verbesserte Steuerung des Prozesses über den gut zu kontrollierenden Dampfdruck eines Lösungsmittels in einem evakuierten Rezipienten ermöglicht.

Hierfür stand im Vorfeld zu dieser Arbeit bereits eine modular aufgebaute, vakuumdichte Anlage am IMT zur Verfügung. An dieser Anlage wurden sowohl Vorversuche für das Lösungsmittelschweißen von Kunststoffen in der Gasphase als auch Gasphasenfluorierungen [105] für Projekte innerhalb des IMT durchgeführt. Der modulare Aufbau der Laboranlage gewährte eine hochgradige Variabilität hinsichtlich des Verwendungszwecks und ermöglichte eine sehr rasche Anpassung der Apparatur an die hier beschriebene Aufgabenstellung. Den letztendlichen Aufbau der Apparatur für dieses neu entwickelte Verfahren für das Lösungsmittelschweißen von mikroperforierten Membranen auf die Rückseite der geöffneten Zellkulturträger ist in Abb. 3-3 zu sehen. Die wichtigsten Elemente der Anlage waren hierbei Vakuumschläuche und Rohre aus Edelstahl, die über Kupfer-, Viton- und teflondichtete Verschraubungen bzw. Kleinflansche miteinander verbunden waren, Vakuumventile, eine Drehschiebervakuumpumpe (Pfeiffer/Balzars) und ein vakuumdichter Edelstahl-Rezipient (1). Der Rezipient konnte über zwei endständige, verschraubbare und teflondichtete Endflansche für die Be- und Entladung von Proben geöffnet und verschlossen werden. Er besaß überdies einen integrierten, mechanischen Hubzylinder, der über ein Handrad (2) und eine Feingewindestange in vertikaler Richtung von außen angehoben und gesenkt werden konnte. Über die zwei diametral angeordneten Sichtfenster in den beiden Endflanschen war eine permanente Sichtkontrolle der Proben während des Versuchsablaufs möglich. An die Anlage waren zwei weitere vakuumdichte Behälter angeschlossen, wobei der eine als Lösungsmittelvorratsbehälter (3) und der andere als Kühlfalle (4) fungierte. Der zentrale Rezipient wurde außerdem von dem Strahlengang eines FT IR-Spektrometers (Bruker IFS 88) gekreuzt, so dass eine online Messung in der Gasphase möglich war.

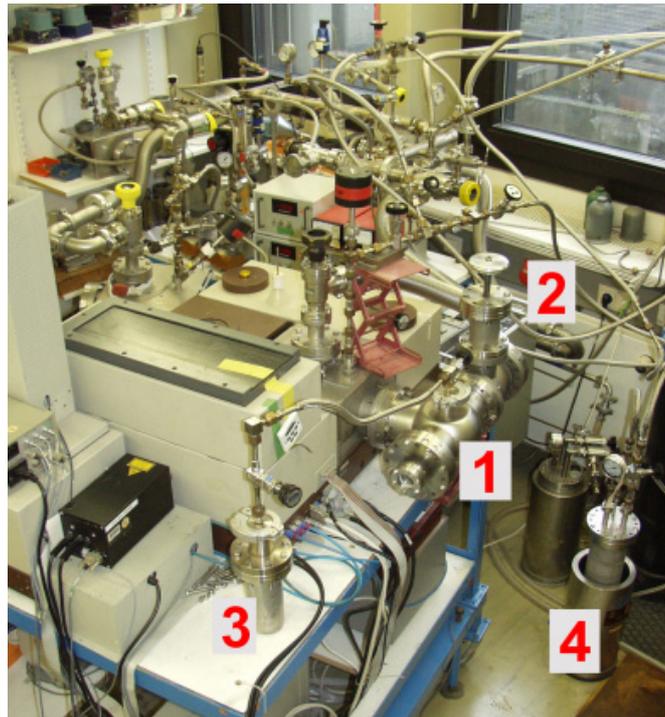


Abb. 3-3 Versuchsanlage für das Lösungsmittelschweißen in der Gasphase. (1) Rezipient, (2) Handrad, (3) Lösungsmittelvorratsbehälter und (4) Kühlfalle

Folgende Darstellung zeigt schematisch das Schaltbild der wichtigsten Elemente dieser Versuchsanlage für das Lösungsmittelschweißen (siehe Abb. 3-4).

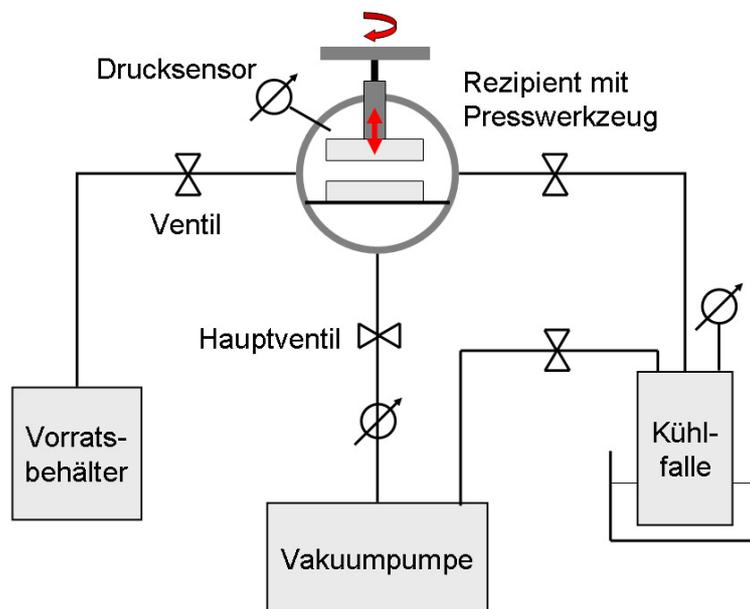


Abb. 3-4 Vereinfachtes schematisches Schaltbild der Versuchsanlage für das Lösungsmittelschweißen in der Gasphase.

Der entscheidende Parameter für den Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase ist der Dampfdruck. Verschieden platzierte Sensoren (Thermovac TM 210, Fa. Leybold; TPR010,

Fa. Balzers) ermöglichten ein kontinuierliches Messen des Drucks innerhalb unterschiedlicher Teilstücke der Anlage. Neben der Messung des Drucks zwischen Vakuumpumpe und erstem Hauptventil wurde u. a. auch der Druck in der Kühlfalle gemessen. Der für die Prozesskontrolle jedoch wichtigste Sensor ermittelte den aktuellen Gasdruck im Rezipienten.

3.2.5 Presswerkzeuge für das Lösungsmittelschweißen

Abb. 3-5 zeigt den durch den entfernten Endflansch einseitig geöffneten Rezipienten mit dessen zentral positionierten, mechanisch getriebenen Hubzylinder. Am unteren Ende des Hubzylinders konnte über ein Stiftsystem das eigentliche Presswerkzeug, ein planer Stempel aus Edelstahl, formschlüssig aufgesetzt und mittels einer Innensechskantschraube befestigt werden. Das Gegenstück zu dem oberen Hubzylinder bildete die Basisplatte, die auf der konkav geformten Unterseite des Rezipienten auflag und über eine Innensechskantschraube sowie über Passstifte an einer hochragenden Leiste des Rezipientengehäuses fest positioniert war.

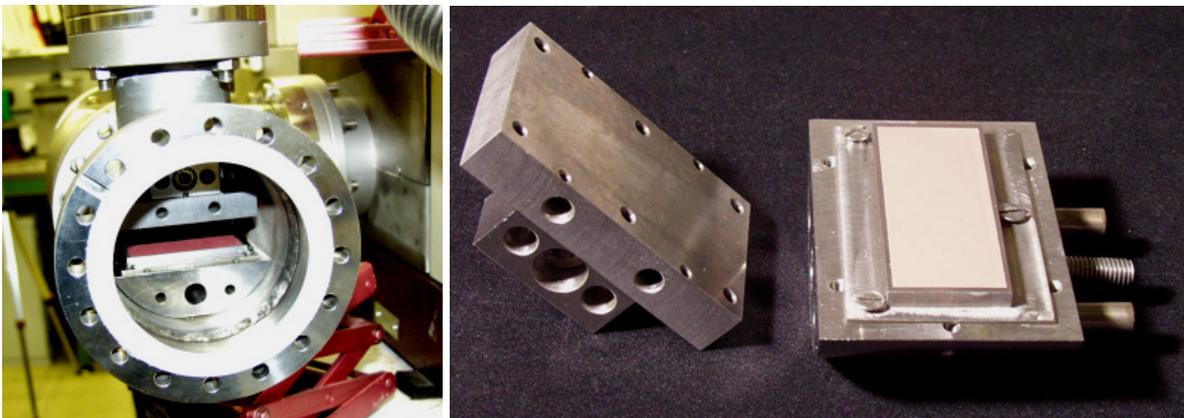


Abb. 3-5 Einseitig geöffneter Rezipient mit eingebautem Presswerkzeug (links). Auf der rechten Seite ist das ausgebaute Presswerkzeug, bestehend aus oberem und unterem Stempel, zu sehen. Das von einem Metallrahmen eingefasste rote Silikonkissen des unteren Stempels diente einer gleichmäßigen Lagerung des unteren Fügepartners.

Vorversuche mit Paaren bestehend aus planen und ungleich großen Kunststoffplättchen (siehe Kapitel 3.2.7) wurden mit einem relativ einfach aufgebauten Stempelwerkzeug durchgeführt (siehe Abb. 3-5). Das jeweils größere der beiden rechteckförmigen Kunststoffplättchen wurde hierbei über dessen vier Ecken mittels vier dünner Blattfedern aus Edelstahl auf der oberen Stempelfläche befestigt. Der kleinere Fügepartner wurde auf einem planen, von einem flachen Edelstahlrahmen eingefassten, Silikonkissen (Elastosil RT 604, Wacker, 27 x 67 x 5 mm³) frei gelagert (siehe Abb. 3-5, rechts). Dieses Kissen stellte eine flächig homogene Anpressung der Plättchen sicher und verhinderte ein Verrutschen des kleineren Fügepartners während des Pressvorgangs.

Das so genannte Einzel-Presswerkzeug setzte sich aus einem formgenauen Aufnahmesystem für einen einzelnen Zellkulturträger und einem Aufnahmesystem für dessen zugehörigen Fügepartner, die mikroperforierte Membran, zusammen. Der Oberstempel bestand aus

einem Edelstahlzylinder mit einer ebenen Pressfläche der Abmessung 50 x 80 mm². Auf diese Fläche wurden 2 Polypropylenfolien (ca. 40 µm) gespannt, um eventuell geringfügige Unebenheiten des Bauteils oder eine geringe Keiligkeit zwischen den Pressflächen und einer daraus resultierenden ungleichmäßigen Druckverteilung über der Fügefläche zu nivellieren. Auf diese zwei Polypropylenfolien wurde die zu verschweißende und auf 2 x 2 cm² zugeschnittene, mikroperforierte Membran (K30SH58050, Osmonics Inc.) flach aufgelegt. Aufgrund der relativ starken statischen Aufladung der nur 10 µm dicken Folie war ein flächiges, faltenfreies Positionieren durch vorsichtiges Aufrollen auf die Unterlage möglich. Die elektrostatische Fixierung war jedoch nur für die Fixierung der Folie während des Zusammenbaus hilfreich. Für die Verschweißung im Rezipienten wurde eine zusätzliche Fixierung benötigt, da die elektrostatischen Wechselwirkungen der Folien bei der Beaufschlagung mit Lösungsmitteldampf nicht mehr wirksam waren. Aus diesem Grund wurde ein ebener, 100 µm dicker Rahmen aus Edelstahl über vier in den Ecken der oberen Stempelfläche lokalisierte Verschraubungen auf die Polycarbonatmembran gleichmäßig gepresst. Der Einbau des Folienhalbzeugs in den Oberstempel erfolgte außerhalb des Rezipienten an einem staubgeschützten Arbeitsplatz.

Der untere Stempel umfasste die bereits zuvor beschriebene Basisplatte aus Edelstahl und einem darauf positionierten, jedoch nicht fixierten Aufnahmesystem für einen einzelnen Zellkulturträger. Dieses Aufnahmesystem bestand aus einer etwa 1 cm dicken Silikonmatrize mit den Außenabmessungen 2 x 2 cm², die die inverse Struktur des Zellkulturträgerrahmens und eine etwa 1 x 1 cm² zentrale quadratische Aussparung beinhaltete. Dadurch wurde der Zellkulturträger im Rahmenbereich während des Verschweißprozesses formgenau von der Matrize unterstützt, während die auf Druck sehr sensibel reagierenden 50 µm dicken Stege freistehend waren. Die Silikonmatrize wurde durch das Abformen eines Zellkulturträgerrahmens mit einem raumtemperaturvernetzenden, 2-Komponenten-Silikonkautschuk (Sylgard 184, Dow Corning, Mischungsverhältnis 10:1) hergestellt. Dabei wurde, durch einen zuvor an die Stelle des mikrostrukturierten Gitters eingesetzten Platzhalters, dieser zentrale Bereich nicht mit abgegossen. Für den Verschweißprozess konnte somit der beidseitig geöffnete und gereinigte Zellkulturträger mit seiner Oberseite formgenau in die Silikonmatrize eingelegt werden. Danach wurde die beladene Silikonmatrize auf die Basisplatte im Rezipienten lose aufgesetzt und gegen den nicht positionierbaren oberen Stempel mit der fixierten Membran ausgerichtet.

Zusätzlich zu dem Einzel-Presswerkzeug wurden weitere Werkzeuge für eine parallele Verschweißung von Zellkulturträgern entwickelt. Eine solche Parallelisierung kann sowohl in der Ebene als auch in der Vertikalen erfolgen. Für den ersten Fall wurde ein Mehrfach-Presswerkzeug hergestellt, mit dem 3 x 3 Zellkulturträger in einer flächigen Anordnung gleichzeitig verschweißt werden konnten. Der Ober- und Unterstempel dieses Mehrfach-Presswerkzeuges wurden spanend aus Edelstahl gefertigt (siehe Abb. 3-6). Der Oberstempel hatte eine Stempelfläche von 8 x 10 cm² und besaß ein zum Einzel-Presswerkzeug identisches Muster an Bohrungen für die positionierte Fixierung des Stempels am unteren Ende des Hubzylinders. Des Weiteren befand sich an den zwei schmalen, gegenüberliegenden Enden jeweils ein etwa 2 cm langer, senkrecht nach unten ragender Positionierstift mit einem Durchmesser von 4 mm. Im Gegensatz zum Einzel-Presswerkzeug wurde als ausgleichende Unterlage eine 100 µm dicke Silikonfolie verwendet. Die Folie wurde durch das Giessen eines vernetzenden Silikonelastomers (Sylgard 184, Dow Corning) zwischen zwei

auf Abstand gehaltenen und nach außen abgedichteten Glasplatten hergestellt. Auf die seitlich mit Klebeband fixierte Silikonfolie wurden 3 Bahnen der mikroperforierten Membran mit der Abmessung 25 x 80 mm² der Länge nach parallel angeordnet. Die Folien wurden jeweils in einem schmalen Bereich ihres Randes mit einem dreifenstrigen Edelstahlrahmen auf die Silikonfolie angedrückt. Je Folienbahn und Fenster konnten somit drei Zellkulturträger und damit insgesamt 9 Zellkulturträger parallel verschweißt werden.

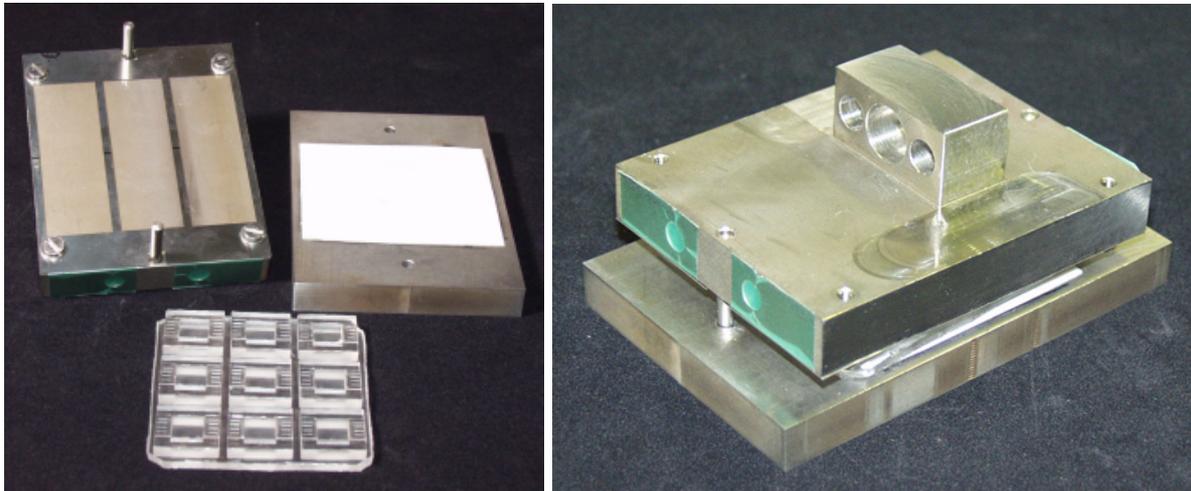


Abb. 3-6 Mehrfach-Presswerkzeug für das Lösungsmittelschweißen von 3 x 3 Zellkulturträgern. Die Zellkulturträger wurden dabei formgenau von der im Vordergrund liegenden Silikonmatrize unterstützt (links). Die Folien wurden am oberen Werkzeugstempel mit einem dreifenstrigen Edelstahlrahmen auf einer dünnen Silikonfolie fixiert. Auf dem unteren Stempel wurde eine Teflonfolie aufgeklebt, um eine Trennung der Elemente nach dem Verpressen zu erleichtern. Die rechte Abbildung zeigt das zusammengesetzte Werkzeug.

Der untere Stempel, der wiederum lose auf die untere Basisplatte aufgesetzt wurde und eine identische Pressfläche wie der obere Stempel besaß, bestand aus einer 1,5 cm dicken Edelstahlplatte. An den schmalen Enden der Platte befanden sich Durchgangsbohrungen für die Positionierstifte des Oberstempels. Auf dieses Gegenwerkzeug wurde zunächst eine Teflonfolie und darüber eine Silikonmatrize für 3 x 3 Zellkulturträger flächig aufgelegt. Die Trennfolie aus Teflon diente der sicheren Öffnung des Werkzeuges ohne die möglicherweise stark an der Matrize haftenden Zellkulturträger wieder von den am oberen Stempel fixierten Folien abzuschälen.

Für die Herstellung der Silikonmatrize wurde eine Gussform mittels Erodieretechnik gefertigt (siehe Abb. 3-7), in deren 9 vertiefte Platzhalter je ein Zellkulturträger mit der Rückseite nach unten mit einem 1-Komponenten-Cyanacrylat-Klebstoff (DELO-CA[®] 2153, DELO Industrieklebstoffe GmbH & Co KG) eingeklebt wurde.

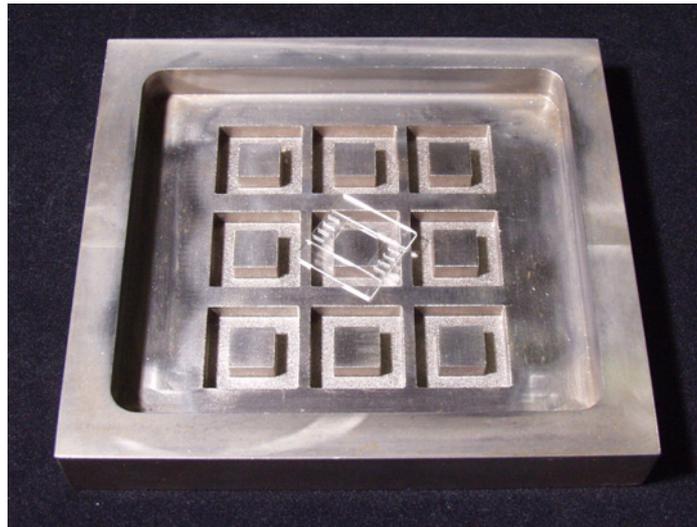


Abb. 3-7 Gussform zur Herstellung der 3 x 3 Silikonmatrize.

Aufgrund fehlender Entformschrägen und erhöhter Seitenwandrauhigkeit musste die Form vor dem Gießen mit einem Trennmittel durch Aufdampfen in einem evakuierten Exsikkator beschichtet werden (Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silan, Aldrich Chem. Co., USA), um ein zerstörungsfreies Entformen zu ermöglichen. Nach dem Ausgießen wurde das noch unvernetzte Elastomer (Sylgard 184, Dow Corning) in einem Exsikkator entgast und bei etwa 50 °C für mehrere Stunden getempert. Nach vollständiger Vernetzung konnte die Matrize entformt werden. Mit dieser Silikonmatrize konnten 9 Zellkulturträger im Bereich ihres Rahmens gleichzeitig und formgenau unterstützt werden, während analog zu dem Einzel-Presswerkzeug auch hier die drucksensiblen, mikrostrukturierten Bereiche der Zellkulturträger jeweils freistehend gelagert waren. Die Bestückung des oberen und des unteren Stempels sowie die Positionierung der Silikonmatrize zu den fixierten Folien erfolgten außerhalb des Rezipienten. Danach konnte das, über die Positionierstifte zusammengesetzte, gesamte Presswerkzeug in die Versuchskammer eingesetzt und mit dem Hubzylinder verschraubt werden. Für die Beaufschlagung der Fügepartner mit Lösungsmittel (siehe Kapitel 3.2.6) wurde vor Prozessbeginn der obere Stempel über den Hubzylinder vom Gegenwerkzeug leicht angehoben, so dass sich zwar ein kleiner Spalt zwischen den Zellkulturträgern und den Folien bildete, aber die Positionierstifte des oberen Stempels noch in die Bohrungen der unteren Platte griffen.

Für den zweiten Fall, die Parallelisierung des Verschweißprozesses in der Vertikalen, wurde für die Vorversuche ein sehr einfaches Werkzeug entwickelt. Die folgende Abb. 3-8 zeigt den Aufbau des so genannten Stapel-Werkzeuges.

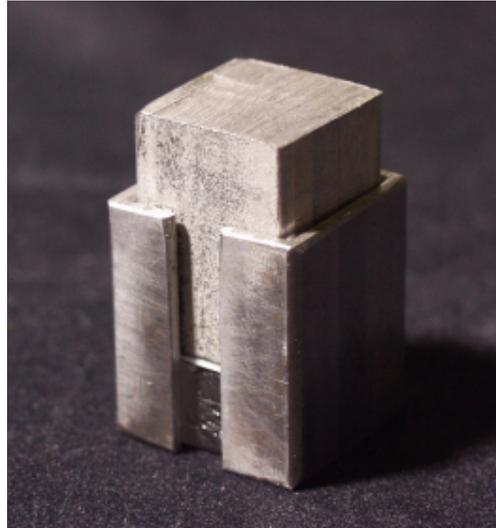


Abb. 3-8 Aufbau des Stapel-Werkzeuges: Die Führung des Stempels erfolgte in einem einseitig geschlitzten Vierkantrohr. Als Auflagefläche für den untersten Zellkulturträger diente ein Silikonkissen.

Die gestapelten Teile wurden während des Verschweißprozesses in ihrer Lage durch ein seitlich geschlitztes, hohles Vierkantrohr aus Edelstahl mit den Innenabmessungen $21 \times 21 \text{ mm}^2$ und einer Länge von 40 mm fixiert. Der auf einer Seite des Vierkantrohres befindliche, zentrale Schlitz mit einer Breite von 7 mm übernahm dabei eine doppelte Funktion. Einerseits vereinfachte er die Bestückung des Werkzeuges mit den Fügeteilen und andererseits verbesserte er das Entfernen von Lösungsmittel durch Evakuieren während des Verpressens. Der Stapel innerhalb des Vierkantrohres war so konzipiert, dass das unterste Element analog zum Einzel-Presswerkzeug ein auf einer Silikonmatrize gelagerter Zellkulturträger war. Darauf wurde in direktem Kontakt eine mikroperforierte Membran lose auf die Rückseite des Zellkulturträgers aufgelegt. Um mehrere einzelne verschweißte Zellkulturträger herstellen zu können, wurden zwischen die jeweils vorhergehende Paarung, bestehend aus Zellkulturträger und Folie, und der direkt folgenden Paarung eine etwa $40 \mu\text{m}$ dicke Polypropylenfolie als Trennfolie mit der Abmessung $20 \times 20 \text{ mm}^2$ eingelegt. Diese Abfolge wurde bis zur letzten Paarung fortgesetzt, so dass ein loser Stapel aus mehreren Zellkulturträgern und Membranen mit zwischen den Paarungen eingefügten Trennfolien entstand. Um einen vollständig verschweißten Stapel zu erhalten, wurden die Paarungen direkt in der entsprechend gewünschten Orientierung ohne Trennfolien gestapelt. Dadurch erfolgte nicht nur eine Verbindung zwischen den einzelnen Zellkulturträgern und den jeweiligen Membranen, sondern die Paarungen konnten auch gleichzeitig miteinander verschweißt werden. Zwischen die oberste Paarung und der darauf aufsetzenden Stempelfläche wurden mindestens zwei der $40 \mu\text{m}$ dicken Trennfolien eingesetzt. Als oberer Stempel wurde ein kurzer Vierkantzylinder mit einer Fläche von $20 \times 20 \text{ mm}^2$ aus Edelstahl verwendet, der mittels doppelseitigen Klebebandes an der Unterseite des im Rezipienten vorhandenen Hubzylinders befestigt wurde. Der Zusammenbau des Stapels erfolgte außerhalb des Rezipienten und der untere Teil, bestehend aus Vierkantrohr, Silikonmatrize und gestapelten Kunststoffteilen, wurde lose auf der Basisplatte unterhalb des Hubzylinders und des daran befestigten Stempels positioniert.

3.2.6 Allgemeiner Prozessablauf des Lösungsmittelschweißens in der Gasphase (Versuchsanlage)

Die für die Versuche (Vorversuche, Verschweißversuche mit Zellkulturträgern) eingesetzten Proben wurden alle, mit Ausnahme der sehr dünnen Polycarbonatmembranen, vor dem Lösungsmittelschweißprozess mit Ultraschall (dest. Wasser + Isopropanol) bei geringer Leistung (ca. 10% der max. Leistung, Sonorex Super 10P, Bandelin) für mindestens 5 min gereinigt. Danach wurden sie außerhalb des Rezipienten in das jeweilige Stempelwerkzeug und anschließend zusammen mit dem Werkzeug in den Rezipienten eingebaut.

Neben der Vorbereitung der Probekörper musste vor jedem Versuch die Lösungsmittelschweißanlage präpariert werden. Dies umfasste zum einen das Bereitstellen von flüssigem Stickstoff für den späteren Schritt der Auskondensierung des Lösungsmittels. Zum anderen wurde die Anlage wiederholt mit Stickstoff gespült und evakuiert, um Verunreinigungen und Restfeuchtigkeit aus den Leitungen und Kammern zu entfernen. Für den Fall, dass ein neues Lösungsmittel eingesetzt oder das bis dahin verwendete Lösungsmittel im Vorratsbehälter aufgefüllt werden musste, wurde der belüftete Behälter von außen mit flüssigen Stickstoff unter den Gefrierpunkt des Lösungsmittels gekühlt. In diesem Zustand konnte die noch gasförmige Luft oberhalb des gefrorenen Lösungsmittels evakuiert werden. Danach wurden der Vorratsbehälter und das darin befindliche Lösungsmittel wieder bis auf Raumtemperatur erwärmt. Dieser Vorgang wurde mindestens zweimal durchgeführt, damit eine nahezu reine Lösungsmitteldampfphase im Behälter oberhalb des Flüssigkeitsspiegels erhalten wurde.

Das in Abb. 3-9 dargestellte Flussdiagramm zeigt den Ablauf eines typischen Lösungsmittelschweißprozesses in der Gasphase.

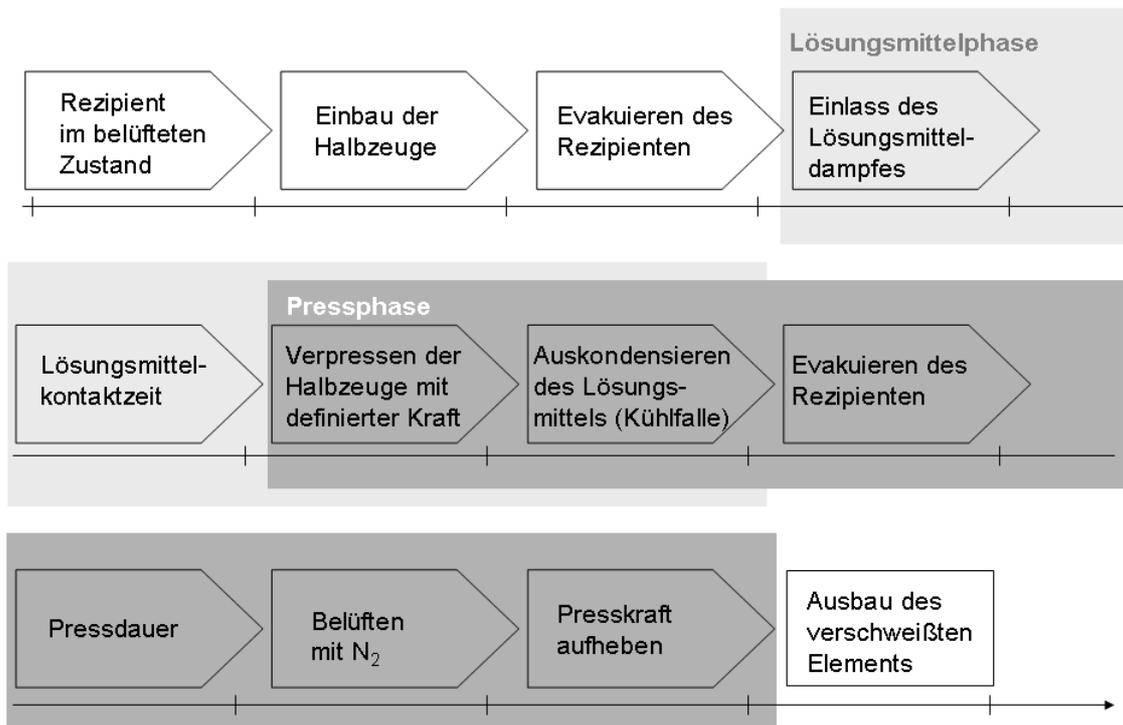


Abb. 3-9 Allgemeines Schema eines Lösungsmittelschweißprozesses in der Gasphase.

Nach dem Einbau der bestückten Stempelwerkzeuge und dem Verschließen des Rezipienten wurde die gesamte Anlage schrittweise ausgehend von der Vakuumpumpe evakuiert. Sobald sich ein Vakuum besser 10^{-1} mbar einstellte, wurde der Rezipient von der restlichen Anlage über Ventile abgekoppelt. Im ersten Schritt der so genannten Lösungsmittelphase wurden die beiden Ventile geöffnet, die sich zwischen dem Lösungsmittelvorratsbehälter und dem Rezipienten befanden. Dies führte zu einem verstärkten Verdampfen des Lösungsmittels im Vorratsbehälter und zur Ausbreitung des Dampfes in den Rezipienten. Der Anstieg des Dampfdrucks wurde über den im Rezipienten integrierten Drucksensor kontrolliert, während gleichzeitig über die beiden Sichtfenster sichergestellt wurde, dass es zu keinem Auskondensieren des Lösungsmittels kommt. Ein Kondensieren des Lösungsmittels führte in der Regel zu einem verstärkten Quellen bzw. Anlösen der Oberfläche der Kunststoffteile, wodurch es im speziellen in den mikrostrukturierten Bereichen zu Veränderung der Bauteilgeometrie, beispielsweise in Form von starken Kantenverrundungen, kam.

Als so genannte Lösungsmittelkontaktzeit wurde hier der Zeitraum definiert, während dem die Bauteile mindestens einem Lösungsmitteldampfdruck ausgesetzt waren, der etwa 20 mbar unterhalb des Sättigungsdampfdrucks des jeweiligen Lösungsmittels bei Raumtemperatur lag (für Aceton ca. 220 mbar bei 20 °C). Die Ursache hierfür war, dass bei einem Dampfdruck von etwa 10–20 mbar unterhalb des Sättigungsdampfdruckes kein merkliches Anlösen des Kunststoffs auch über längere Zeiträume beobachtet werden konnte. Die Lösungsmittelkontaktzeit lag, je nach Bauteil, in der Regel zwischen einer und mehreren Minuten und ging direkt in die so genannte Pressphase über. Durch das Drehen des Handrades wurde über das Feingewinde der Hubzylinder im Rezipienten nach unten bewegt und die Fügepartner unter dem Einfluss des Lösungsmitteldampfes miteinander verpresst. Die Messung des am Handrad aufgebracht Drehmomentes ermöglichte eine dosierte Krafteinleitung auf die Kunststoffbauteile (siehe Abb. 3-10).

Die Ventile zwischen der zuvor mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kühlfalle und dem Rezipienten wurden geöffnet, sobald der vorgesehene Anpressdruck erreicht wurde. Die starke Temperaturdifferenz zwischen diesen beiden Behältern führte zu einem Kondensieren des Lösungsmittels in der Kühlfalle, wodurch der Dampfdruck im Rezipienten schnell abfiel. Nach dem Absinken des Drucks im Rezipienten unter etwa 5 mbar, wurde der Rezipient mittels der Vakuumpumpe unterstützend über die Kühlfalle evakuiert. Schließlich wurde die Kühlfalle von der Anlage getrennt und der Rezipient wurde über die restliche Zeit des Verpressens in direkter Verbindung mit der Vakuumpumpe evakuiert. Die Dauer des Verpressens variierte hierbei zwischen einigen Minuten und einigen Stunden. Danach wurde die gesamte Anlage mit Stickstoff geflutet und die Presskraft wurde durch das Zurückdrehen des Handrades vorsichtig aufgehoben. Schließlich wurde der Rezipient durch das Lösen des Endflansches geöffnet und es konnte zunächst der obere Stempel mit dem verschweißten Teil und danach der untere Stempel entnommen werden. Der Ausbau des Bauteils aus dem oberen Stempel erfolgte außerhalb des Rezipienten entweder durch das Lösen der Blattfedern oder im Fall des Zellkulturträgers durch das Entfernen des Edelstahlrahmens, der die mikroperforierte Membran fixierte.

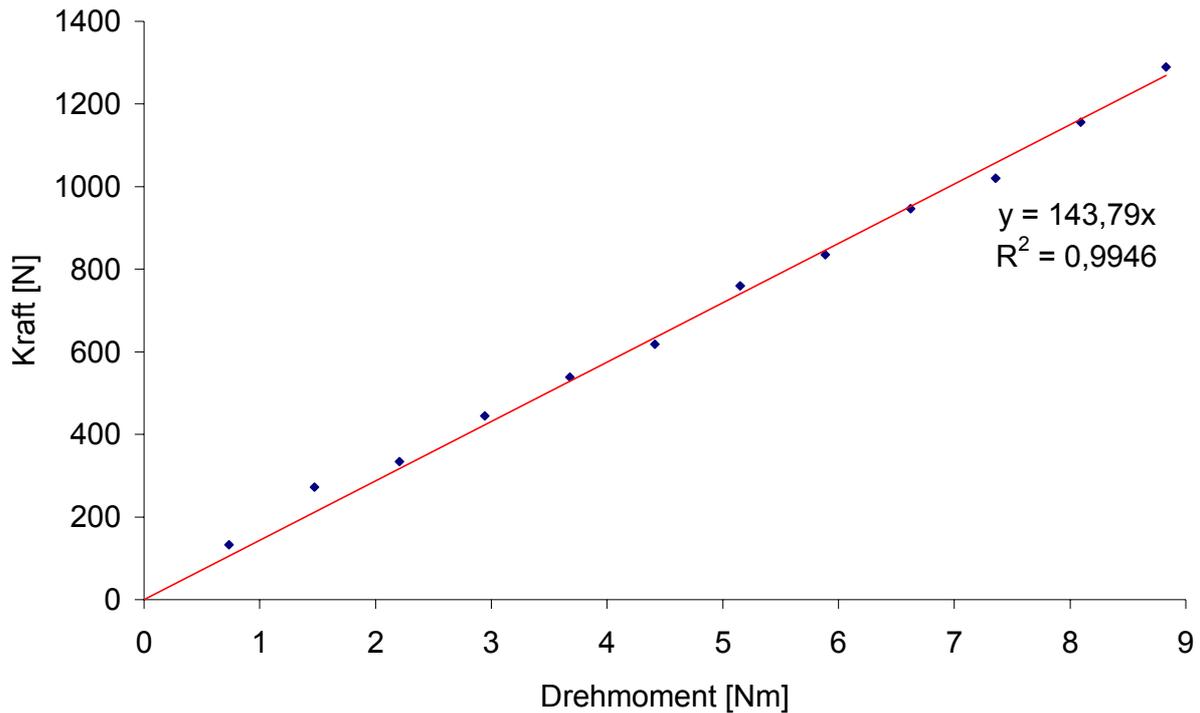


Abb. 3-10 Darstellung der mit einem piezoelektrischen Einkomponenten-Kraftsensor (Typ 9021, Ladungsverstärker Typ 5011, Kistler) ermittelten Referenzgerade für die auf die Fügefläche einwirkenden Kraft in Abhängigkeit des am Handrades aufgebrauchten Drehmomentes.

Dieser Prozessablauf wurde anhand von Vorversuchen an einfachen, 1 mm dicken und mit einfachen Kanälen (Breite 500 μm , Tiefe 500 μm) strukturierten Kunststoffplättchen entwickelt und schließlich in der beschriebenen Form für das Verschweißen des Zellkulturträgers mit einer mikroperforierten Membran verwendet. Während bei den Kunststoffplättchen eine dauerhafte, flächig-homogene und fehlerfreie Verbindung als Qualitätskriterium für die Prozessentwicklung im Vordergrund stand, wurde bei den Zellkulturträgern zusätzlich eine erhöhte Aufmerksamkeit auf den Erhalt der mikrostrukturierten Formen und Geometrien gelegt.

3.2.7 Verwendete polymere Materialien

Das Lösungsmittelschweißen stellt aufgrund der Vielfalt der verfügbaren Lösungsmittel ein geeignetes Fügeverfahren für ein breites Spektrum von Thermoplasten dar. Dadurch ergibt sich eine hohe Variabilität des Verfahrens hinsichtlich des Einsatzes verschiedenster Kunststoffe und ermöglicht sogar in einigen Fällen, unter der Voraussetzung der prinzipiellen Mischbarkeit, die Verbindung von ungleichen Polymeren.

Zunächst wurden mikrotechnisch gut verarbeitbare Polymere, wie z. B. das teilkristalline Polyoxymethylen (POM, Hostaform C27021, Höchst AG) und das erst seit einigen Jahren auf dem Markt verfügbare Cycloolefincopolymer (COC, Ticona), für das Verfahren herangezogen. Versuche mit Aceton, einem relativ ungefährlichen und kostengünstigen Lösungsmittel, bestätigten die in der Literatur angegebene gute Beständigkeit von Polyoxymethylen

gegenüber Aceton dadurch [106], dass sogar Lösungsmittelkontaktzeiten über 25 min weder zu einem merklichen Anlösen der POM-Plättchen noch zu einem Verschweißen zweier Plättchen führte. Besser geeignete Lösungsmittel für Polyoxymethylen sind u. a. die sehr giftigen Substanzen Chloroform und Phenol [106]. Im Hinblick auf die möglicherweise stark eingeschränkte Kompatibilität dieser Lösungsmittel für die spätere biologische Anwendung wurde auf entsprechende weiterführende Versuche verzichtet.

Aufgrund der besonders interessanten Eigenschaften für Zellkulturanwendungen konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf das COC. Dieses ist bekannt für seine gute Verarbeitbarkeit mit typischen Kunststoffformgebungsverfahren, für seine guten optischen Eigenschaften, seine geringe Eigenfluoreszenz und seine gute Biokompatibilität. Ein Nachteil dieses Materials ist laut Angabe des Herstellers, dass beim Kontakt mit Lösungsmitteln, z. B. Hautfett, sehr leicht Spannungsrisse auftreten können. In Lösungsversuchen mit verschiedenen organischen Flüssigkeiten erschien Toluol zunächst ein geeignetes Lösungsmittel für COC zu sein. Toluol besitzt zwar einen relativ geringen Sättigungsdampfdruck bei Raumtemperatur (Sättigungsdampfdruck bei 20 °C: 29 mbar), der Dampfdruck lässt sich aber immer noch ausreichend gut in der Dampfphase kontrollieren. Verschiedene Typen des Cycloolefincopolymers (6015, 8007, 5013; Ticona) konnten in der Versuchsanlage nach dem oben beschriebenen Verfahrensablauf in einer gesättigten Toluol-Dampfphase flächig und fehlerfrei verschweißt werden. Typische Lösungsmittelkontaktzeiten lagen in einem Bereich von 3–15 Minuten. Dabei trat jedoch mit zunehmender Lösungsmittelkontaktzeit eine zunehmende krater- und rissförmige Beschädigung der Oberfläche auf (siehe Abb. 3-11).



Abb. 3-11 Schäden an der Oberfläche einer COC-Platte, die bereits nach einer kurzzeitigen Einwirkung von Toluoldampf entstanden.

Die Schäden an der Oberfläche der COC-Plättchen sind sehr wahrscheinlich auf die so genannte Spannungsrisskorrosion zurückzuführen. Unter Spannungsrisskorrosion wird eine Rissneubildung sowie die Ausweitung bereits bestehender Risse eines unter Zug stehenden Festkörpers unter dem Einfluss einer niedermolekularen Verbindung verstanden [103]. Die Fremdmoleküle diffundieren dabei in bestehende Haarrisse an der Oberfläche und verändern dadurch die mechanischen Eigenschaften des Polymers, wie z. B. die Reißfestigkeit.

Bei ausreichend hohen Spannungen im Material können sich die feinen Risse zu makroskopisch sichtbaren Rissen ausweiten. Um das Auftreten der Spannungsrisse zu verhindern, musste schließlich die Lösungsmittelkontaktzeit des Toluols soweit reduziert werden, dass keine stabile Verbindung zwischen den Probekörpern mehr zu erzielen war.

Neben der Lösungsmittelkontaktzeit spielen jedoch noch weitere Faktoren für das Auftreten von Spannungsrissskorrosion eine entscheidende Rolle. Der Löslichkeitsparameter der niedermolekularen Komponente stellt hier ebenfalls einen entscheidenden Einfluss dar. So variiert bei einigen Kunststoffen beim Kontakt mit verschiedenen Lösungsmitteln die Mindestoberflächenarbeit, die zur Fortpflanzung eines Risses unter der Anwesenheit der niedermolekularen Substanz erforderlich ist [103]. Aus diesem Grund wurden Proben aus COC, neben Toluol, weiteren Lösungsmitteln, teils in Gasphase und teils in flüssiger Phase ausgesetzt. Dabei handelte es sich um die häufig verwendeten, organischen Lösungsmittel Ethylacetat, Diethylether, Tetrahydrofuran und Chloroform. In allen Fällen kam es zum Anlösen der Oberfläche nach nur relativ kurzen Kontaktzeiten (1–10 min), so dass ein Lösungsmittelverschweißprozess mit diesen Substanzen prinzipiell möglich wäre, jedoch konnte in allen Fällen ein deutliches Auftreten von Spannungsrissskorrosion beobachtet werden.

Eine weitere Methode, um einer Spannungsrissskorrosion vorzubeugen, stellt das Tempern der Kunststoffbauteile dar. Dabei werden inhärente Spannungen im Festkörper abgebaut. Innere Spannungen in einem Kunststoff können beispielsweise während der Verarbeitung eingefroren werden und überlagern sich schließlich mit auftretenden Quellspannungen. Hierzu wurden COC-Probekörper (Typ 6015 S04) bei etwa 95–100 °C über einen Zeitraum von 20 h in einen Wärmeschrank ausgelagert. Der nachfolgende Kontakt über 14 min mit Tetrahydrofuran als Lösungsmittel in einem Verschweißversuch führte zwar zu einer mäßigen, d. h. subjektiv leicht schälbaren Verbindung der beiden Teile, jedoch nicht zu einer Reduzierung der Spannungsrissskorrosion.

In vielen Fällen sind die Desorptionsprozesse an Thermoplasten hinsichtlich des Auftretens von Spannungsrissskorrosion kritischer zu beurteilen als die Absorptions- und Diffusionsvorgänge [107]. Bei einer schnellen Desorption kommt es zu einem schnellen Verarmen des Lösungsmittels in den oberflächennahen Schichten des Kunststoffes, während tiefere Schichten noch in einem gequollenen oder gelösten Zustand sind. Dadurch können im Festkörper hohe Zugspannungen auftreten, die wiederum eine Spannungsrissskorrosion verursachen. Im Hinblick auf diese Tatsache wurden verschiedene Versuche mit einem deutlich verlangsamten Evakuieren des Rezipienten am Ende der Lösungsmittelphase durchgeführt, teils mit nur einer Abnahme des Toluoldampfdruckes von etwa 5 mbar/min. Dennoch konnte auch mit dieser Maßnahme das Auftreten einer Spannungsrissskorrosion nicht vermieden werden.

Eine letzte Möglichkeit, die an dieser Stelle untersucht wurde, war der Einsatz eines binären Lösungsmittelsystems, bestehend aus einem für das COC gut solvatisierenden (Toluol) und einem schlechter solvatisierenden Lösungsmittel (Aceton). Es wurden zwei unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Aceton zu Toluol (2:1 und 4:1) für das Lösungsmittelschweißen untersucht. Die beiden Substanzen lassen sich in flüssiger Phase sehr gut in den genannten Verhältnissen mischen und können auf diese Weise sehr einfach in der Lösungsmittelschweißanlage in einen gemeinsamen evakuierten Vorratsbehälter gegeben werden. Zur

Ermittlung der Dampfdruckkinetik in einem solchen binären System wurden zunächst Versuche ohne Kunststoffproben in der Lösungsmittelschweißanlage durchgeführt. Die partielle Dampfdruckkinetik von Toluol wurde mit Hilfe des IR-Spektrometers gemessen. Die Auswertung erfolgte quantitativ anhand der IR-Spektren (Software Opus 3.0, quantitative Analyse 1, Bruker Optik GmbH) einer zuvor erstellten Eichgerade mit definierten Toluoldampfdrücken im Rezipienten. Der jeweilige Dampfdruck konnte so durch Integration eines charakteristischen Peaks des Toluols bei einer Wellenzahl von $1031,75 \text{ cm}^{-1}$ ermittelt werden, der nicht durch das Spektrum des Acetons verdeckt wird. Der Gesamtdruck im Rezipienten wurde über den integrierten Drucksensor gemessen. Zur Kontrolle wurde der Gesamtdruck bzw. die Partialdampfdrücke über das Raoult'sche Gesetz theoretisch approximiert, welches im strengen Sinn nur für ideale Mischungen flüchtiger Substanzen gilt. Dabei wurde folgender, theoretisch zu erwartender Dampfdruck ermittelt:

$$\begin{aligned}
 20\% \text{ Aceton} &\rightarrow x_{\text{Aceton}} = 0,2 \quad \text{und} \quad p_{\text{Aceton}}^0 = 245 \text{ mbar} \\
 80\% \text{ Toluol} &\rightarrow x_{\text{Toluol}} = 0,8 \quad \text{und} \quad p_{\text{Toluol}}^0 = 29 \text{ mbar} \\
 \text{mit:} & \\
 p_{\text{ges}} &= p_{\text{Aceton}} + p_{\text{Toluol}} = (x_{\text{Aceton}} \cdot p_{\text{Aceton}}^0) + (x_{\text{Toluol}} \cdot p_{\text{Toluol}}^0) \\
 &= (0,2 \cdot 245 \text{ mbar}) + (0,8 \cdot 29 \text{ mbar}) \approx 72,2 \text{ mbar}
 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Der im Rezipienten gemessene Dampfdruck bei vollständiger Öffnung des Ventils zum Vorratsbehälter bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug etwa 73 mbar (siehe Abb. 3-12).

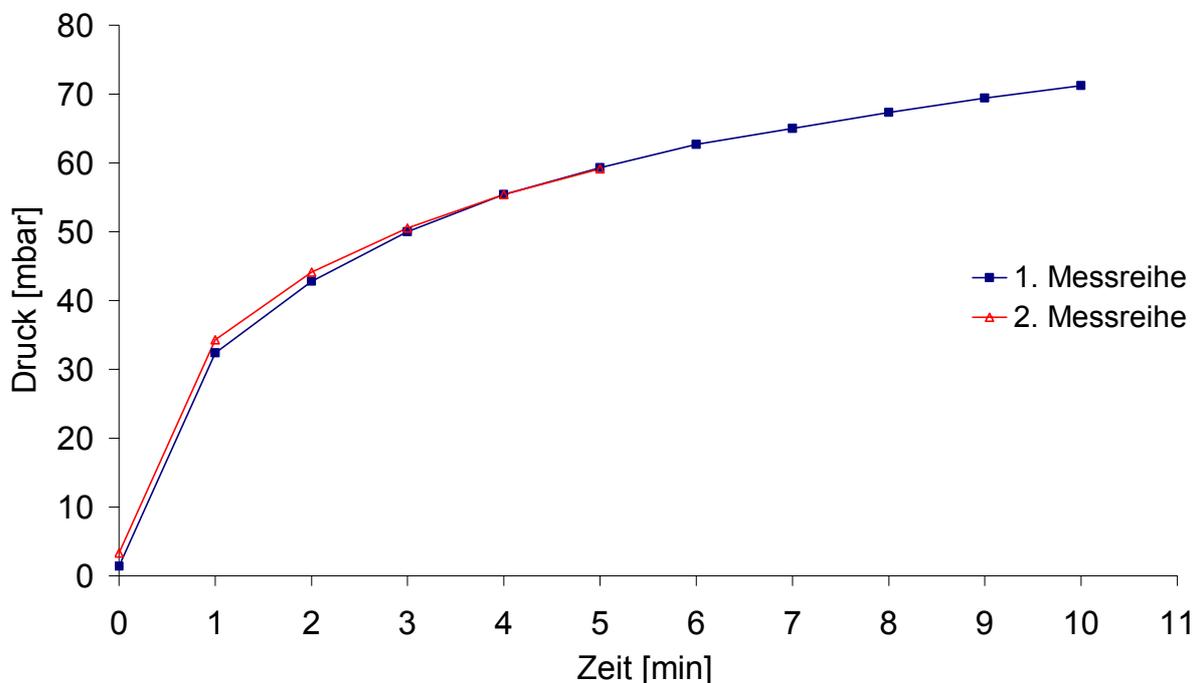


Abb. 3-12 Anstieg des Lösungsmitteldampfdrucks im Mischungsverhältnis 1:4 für Aceton und Toluol.

Für Verschweißversuche von COC-Plättchen wurden sowohl Mischungen im Verhältnis Aceton zu Toluol von 4:1 als auch 2:1 angesetzt. In beiden Fällen war eine schwache, flächig nicht homogene Verbindung der Probekörper möglich. Der maximale partielle Dampfdruck des Toluols wurde aufgrund der Anwesenheit des Acetons bei beiden Mischungsverhältnissen auf einen Wert von etwa 12–14 mbar gesenkt. Dies führte jedoch weder zu einer Verbesserung der Qualität der Verbindung, noch konnte dadurch eine verringerte Spannungsrisskorrosion erzielt werden. Für das COC konnten somit innerhalb eines adäquaten Zeitrahmens keine geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelsysteme gefunden werden, deren Penetrationswirksamkeit zwar einerseits für den Verschweißprozess ausreichend war und die andererseits nicht zu Quellspannungen bzw. zu einer Spannungsrisskorrosion führten.

Neben dem COC wurden weitere amorphe Polymere, Polymethylmethacrylat (PMMA, G77Q11) und Polycarbonat (PC, Makrolon 2405), getestet, die sich mikrotechnisch gut verarbeiten lassen und bereits für diese Zellkulturanwendung genutzt wurden [91]. Die Löslichkeitsparameter dieser beiden Thermoplaste zeigen eine mehr oder weniger gute Löslichkeit mit Aceton, einem relativ gering gesundheitsgefährdenden Lösungsmittel. In beiden Fällen konnten mit diesem Lösungsmittel gute Resultate hinsichtlich einer Verbindung zwischen einer unstrukturierten und einer mit 500 µm breiten und tiefen Kanälen versehenen Probe erzielt werden. Die Lösungsmittelkontaktzeit im Fall von PMMA musste dabei im Vergleich zu PC tendenziell länger gewählt werden (PMMA > 6 min, PC 3–6 min), um eine vergleichbar gute, homogene Verbindung zu erhalten. Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Literatur angegebenen größeren Differenz der Löslichkeitsparameter für die Paarung Aceton und PMMA [106]. Der ausgeübte Anpressdruck lag für diese Versuche etwa bei 0,5 N/mm² (aufgebrachtes Drehmoment ca. 60 cmKp bei einer Fügefläche von 27 x 67 mm²). Im Gegensatz zu der Kombination Toluol und COC traten sowohl beim PMMA als auch beim PC in Verbindung mit dem Lösungsmittel Aceton keine Probleme hinsichtlich einer Spannungsrisskorrosion auf.

Aufgrund der Überschneidung der Lösungsmittelkontaktzeiten für das Aceton und der grundsätzlichen Mischbarkeit beider Polymere [98,108,109] wurden nicht nur homogene Verbindungen, sondern auch heterogene Verbindungen zwischen PMMA und PC getestet. Dabei zeigte sich, dass eine Lösungsmittelkontaktzeit von etwa 6 min eine flächig homogene und langzeitstabile Verschweißung zwischen PMMA- und PC-Plättchen ermöglichte. Der Anpressdruck der Fügepartner in der Pressphase lag bei diesen Versuchen mit einem Drehmoment von etwa 75–90 cmKp und einer Fügefläche von 22 x 22 mm² bei ca. 2–3 N/mm².

3.2.8 Lösungsmittelschweißen von Zellkulturträgern

Diese Vorversuche anhand von Plattenmaterial zeigten, dass der entwickelte Lösungsmittelschweißprozess prinzipiell geeignet ist, um homogene, aber auch heterogene, flächige Verbindungen zwischen den thermoplastischen Kunststoffen PMMA und PC zu erzeugen. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden im Folgenden die spezifischen Anforderungen für das Verschweißen bzw. das Bonden von mikroperforierten PC-Membranen auf spritzgegossene und beidseitig geöffnete Zellkulturträger (PC und PMMA) ermittelt. Die sehr dünne und flexible PC-Membran (Dicke 10 µm) passt sich dabei den Unebenheiten des

massiven Fügepartners, dem Zellkulturträger, deutlich besser an, so dass eine gleichmäßige Verbindung zwischen diesen beiden Teilen einfacher zu realisieren war, als beispielsweise zwischen zwei biegesteifen Platten. Des Weiteren mussten im Vergleich zu den Vorversuchen deutlich geringere Kräfte bzw. Drücke auf die Fügepartner aufgebracht werden. Die Kräfte lagen hierbei im Bereich der Gewichtskraft des oberen Stempels und Hubzylinders (etwa 10 N auf einer Fügefläche von etwa 3 cm²), so dass sich daraus ein Anpressdruck von etwa 0,05 N/mm² ergab. Höhere Presskräfte führten zu einer Beeinträchtigung der Strukturen im Rahmenbereich. Während das Kriterium einer über der Fläche gleichmäßigen Verbindung relativ einfach zu erfüllen war, lag das Hauptaugenmerk bei dieser Prozessadaption auf der Maßhaltigkeit der Geometrie und Form der Mikrostrukturen. Im einfachsten Fall wurde der zentrale mikrostrukturierte Bereich durch die Stempelmatrize nicht unterstützt (siehe oben, Beschreibung Einzel-Presswerkzeug). Dieser Bereich stellte sich unter Lösungsmiteleinfluss als sehr sensibel gegenüber Druckkräfte dar, so dass ein Aufliegen in diesem Bereich zur Deformierung der Stege in Form eines im apikalen Bereichs nach innen gerichteten Grates führte. Dieser Grat könnte beispielsweise eine Behinderung beim Impfvorgang der Mikrocontainer mit Zellen zur Folge haben.

Ein Unterschied hinsichtlich der minimalen Dauer des Lösungsmittelkontaktes mit dem zu verfügenden Zellkulturträger und der PC-Membran ergaben sich für die verschiedenen Materialkombinationen nicht. Sowohl für PC/PC als auch für die Kombination PMMA/PC lag die Lösungsmittelkontaktzeit in einem Bereich von etwa 2–4 min, wobei die besten Ergebnisse mit Zeiten von etwa 3 min erzielt wurden. Bei Einwirkzeiten über 4 min fand ein deutliches Anlösen der Strukturen des Zellkulturträgers statt, welches sich vor allem durch ein Abrunden von Kanten und Ecken im Bereich der Containerwände bemerkbar machte. Weiterhin konnte bei einer zu großen Dauer der Lösungsmittelkontaktzeit eine erhöhte Sprödigkeit des Kunststoff festgestellt werden. Dies führte mitunter aufgrund innerer Spannungen zu Rissen in den Bereichen der Containerstegkreuzungen (siehe Abb. 3-13).

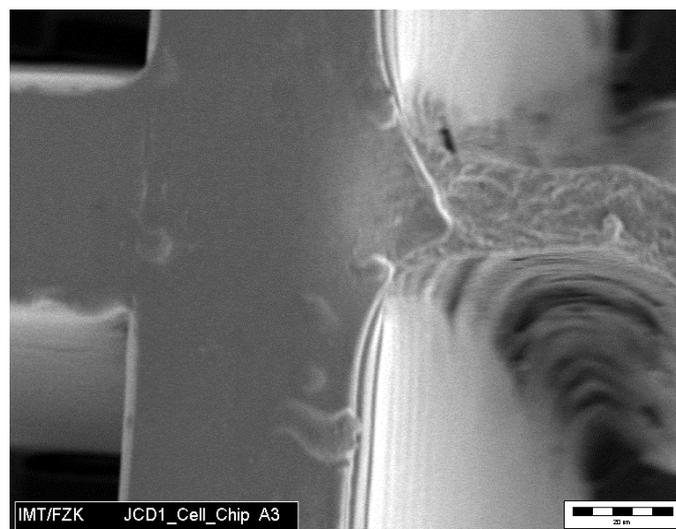


Abb. 3-13 REM-Aufnahme einer zerstörten Containerstegkreuzung (Messbalken entspricht 20 µm). Zu lange Lösungsmittelkontaktzeiten führten zu einer erhöhten Sprödigkeit und zu Spannungsrissen im Kunststoff.

Als besonders vorteilhaft erwies sich bei diesem Verfahren, dass die Folie auch mit den Containerstegen im mikrostrukturierten Bereich verschweißt wurde, obwohl hier die Folie im gequollenen bzw. angelösten Zustand nur lose auf dem Containerwandgitter auflag. Damit ermöglichte dieses Verfahren eine nahezu ideale Verbindung zwischen Membran und spritzgegossenem Grundkörper, die sogar eine dichte Abtrennung zwischen benachbarten Mikrocontainern durch das Anhaften der Folie an deren schmalen Stegen beinhaltete.

In der Versuchsanlage konnte bereits mit dem Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase eine kleine Stückzahl von gebondeten Zellkulturträgern aus PC und PMMA hergestellt werden. Die hierfür verwendete Lösungsmittelkontaktzeit von etwa 3 min ermöglichte eine im Rahmenbereich sehr homogene und irreversible Verbindung, ohne dass dabei eine sichtbare Kantenverrundung auftrat. Die gesamte Prozessdauer, inklusive den Vorbereitungszeiten, konnte für das Verschweißen eines Zellkulturträgers mit einer mikroperforierten Membran während der Entwicklung von Anfangs etwa 3 h deutlich reduziert werden. Die Probenvorbereitung, die die Reinigung, das Zuschneiden der Folie und den Einbau in die Stempel umfasste, benötigte letztendlich etwa 10 min. Der Einbau, das anschließende Evakuieren der Anlage und das Einkühlen der Kühlfalle dauerten ungefähr 15 min. Dieser lange Zeitraum ist im Wesentlichen auf das lange Evakuieren des großen Volumens des Rezipienten und der langen Schlauch- bzw. Rohrverbindungen zurückzuführen. Die benötigte Zeit bis zum Erreichen des Sättigungsdampfdruckes und die nachfolgende Lösungsmittelkontaktzeit bestimmten die Dauer der so genannten Lösungsmittelphase, die zwischen einer und zehn Minuten variierte. Um diesen Zeitraum zu minimieren, wurde bei einigen Versuchsreihen der Lösungsmittelvorratsbehälter in einem Warmwasserbad vorgeheizt. Dies führte zwar zu einem schnelleren Erreichen des Sättigungsdampfdruckes, jedoch bestand bei einem Überschreiten der Dampfsättigung eine gesteigerte Gefahr der Kondensation des Lösungsmittels an den vergleichsweise kühleren Kunststoffteilen. Diese Prozessvariante erforderte daher eine deutlich sorgsamere Kontrolle des Dampfdruckes. Die Pressphase wurde von Anfangs einer Stunde auf etwa 10 min gesenkt, ohne dass es zu einer sichtbaren Beeinträchtigung der Qualität der Verbindung kam. Die Belüftung der Anlage und der Ausbau der Proben dauerten maximal 10 min, so dass sich schließlich eine Gesamtzeit von Durchschnittlich etwa 40 min für den gesamten Prozess ergab.

Ein Ziel für die Herstellung des Zellkulturträgers war die Entwicklung eines Verfahrens, das eine Produktion in größeren Stückzahlen ermöglichen sollte. Zu diesem Zweck wurden Versuche durchgeführt, die die Möglichkeit einer Parallelisierung zeigen sollten. Hierzu wurden, wie oben bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.2.5), zwei verschiedene Mehrfach-Presswerkzeuge entwickelt. Das Konzept des ersten Mehrfach-Presswerkzeuges sah die Verschweißung von 9 Zellkulturträgern parallel in einer flächig angeordneten 3 x 3 Matrize vor, während das zweite die Verschweißung einer größeren Anzahl von Zellkulturträgern in Stapelform vorsah. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass eine Verschweißung von mehreren Zellkulturträgern mit einer Lösungsmittelkontaktzeit von etwa 5–8 min sowohl in der flächigen als auch in der stapelförmigen Anordnung möglich war. Für die Verschweißung von 9 Zellkulturträgern in der Fläche wurde ein etwa 9-fach höherer Wert für den Anpressdruck und in der Stapelform ein zur Einzelverschweißung vergleichbarer Anpressdruck benötigt.

Trotz der direkten Stapelung der Fügepartner übereinander und einer daraus resultierenden gegenseitigen Verdeckung der Fügeflächen war bei dem vertikalen Ansatz eine ausreichende Benetzung derselben mit Lösungsmittel möglich. Dieser Ansatz konnte auch genutzt werden, um erste komplett verschweißte Zellkulturträger-,stacks' aufzubauen. Durch die Stapelung von Zellkulturträgern und mikroperforierten Folien ohne die zwischengelagerten Trennfolien wurde bei unveränderten Prozessparametern (Lösungsmittelkontaktzeit 5–8 min, Anpresskraft ca. 10 N, Raumtemperatur) ein verschweißter ‚stack‘ aus 5 Zellkulturträgern hergestellt. Dagegen stellte das Entfernen des Lösungsmittels durch das Evakuieren bei beiden Konzepten ein Problem dar. Die hier vorgestellten Mehrfach-Presswerkzeuge waren beide im verpressten Zustand zu kompakt und zu geschlossen, so dass auch nach einer Stunde evakuieren ein merklicher Restgehalt an Lösungsmittel im Werkzeug und in den Kunststoffteilen vorhanden war. Dieser Restgehalt musste durch entsprechend lange Evakuierzeiten entfernt werden, um gleichmäßig gute und irreversible Verbindungen zwischen allen 9 Zellkulturträgern und den Folien zu erhalten. Ansonsten konnten die durch das Restlösungsmittel noch gequollenen Folien relativ einfach von den Zellkulturträgern abgeschält werden. Darüber hinaus waren die deutlich höheren Rüstzeiten sowohl des unteren als auch des oberen Stempels des Mehrfach-Presswerkzeuges bei dem flächigen Konzept von Nachteil, die eine zeitliche Einsparung an dieser Laboranlage durch die Parallelisierung zum großen Teil wieder zunichte machte.

3.2.9 Teilautomatisierte Lösungsmittelschweißanlage

Anhand der mit der Versuchsanlage gewonnen positiven Erkenntnisse und den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten biologischen Ergebnissen über die Verträglichkeit des Verfahrens für die Zellkulturanwendung (siehe Kapitel 4) wurde entschieden, dieses Verfahren weiter zu entwickeln und eine neue teilautomatisierte Lösungsmittelschweißanlage für die Herstellung größerer Stückzahlen von Zellkulturträgern aufzubauen. Die Entwicklung einer solchen teilautomatisierten Anlage wurde am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt. Die prinzipielle Prozessabfolge (siehe Abb. 3-9) und Aceton als Lösungsmittel wurden hierzu unverändert beibehalten, während ein Großteil der Anlage neu konzipiert wurde. Das vorrangige Ziel dieser Arbeiten war es, eine Anlage zu entwickeln, die

- eine zur Versuchsanlage vergleichbare Fügequalität zwischen Zellkulturträger und mikroperforierter Folie ermöglicht
- möglichst kurze Zykluszeiten bzw. einen hohen Durchsatz erreicht und
- einen kostengünstigen Betrieb sicherstellt.



Abb. 3-14 Teilautomatisierte Lösungsmittelschweißanlage für das parallele Verschweißen von 4 Zellkulturträgern: (1) PC für Prozesssteuerung, (2) Rezipient, (3) Kondensationsfalle und (4) Kühlaggregat.

Im Folgenden sollen die wesentlichen Änderungen der realisierten Anlage (siehe Abb. 3-14) kurz skizziert und erläutert werden. Der Austausch der mit Flüssigstickstoff gekühlten Kühlfalle in der Versuchsanlage durch eine mit einem Glycerin/Wasser-Gemisch gekühlten Kondensationsfalle (siehe Abb. 3-14) ermöglichte neben einer verbesserten Funktionalität auch wesentliche zeitliche und wirtschaftliche Einsparungen.

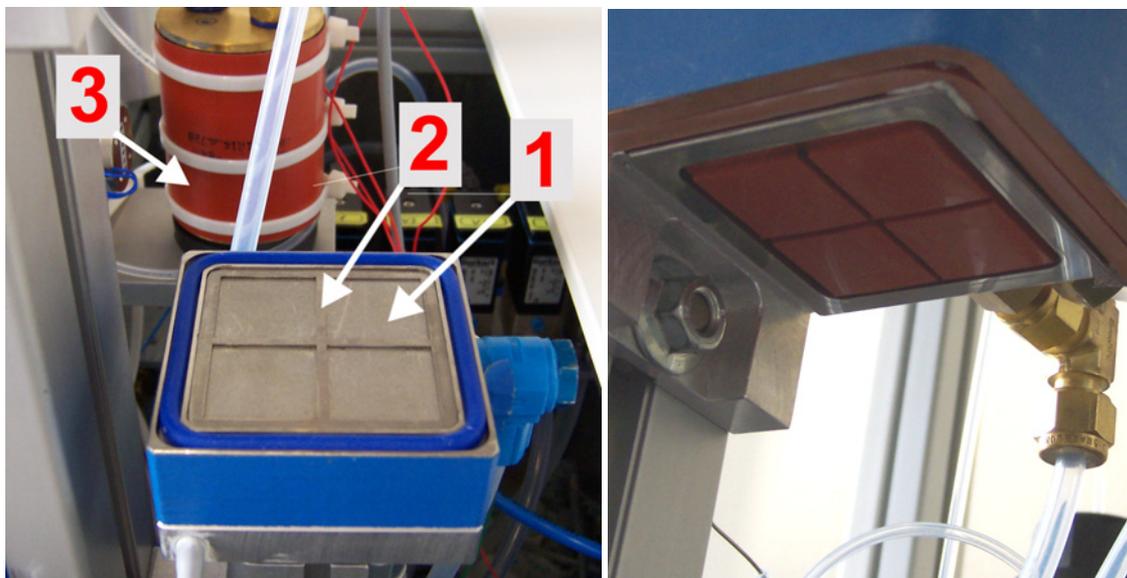


Abb. 3-15 Zweiteiliger Rezipient der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage. In der unteren beweglichen Hälfte befanden sich die Metallfritte (1) zum Spannen der Folien mittels Vakuum sowie die Kulisse (2) zur Positionierung der spritzgegossenen Mikrostrukturen (links). In der linken Abbildung im Hintergrund ist der temperierte Behälter (3) zur Vorverdampfung des Lösungsmittels zu sehen. Im oberen Stempel befand sich für die homogene Krafteinleitung eine strukturierte Silikonmatte (rechte Abbildung).

Der Rezipient (siehe Abb. 3-15) der neuen Anlage bestand aus zwei Hälften, die an einer Führungsschiene montiert und mittels eines O-Ringes an der gemeinsamen Kontaktfläche abgedichtet waren. Der untere Behälterteil war beweglich angeordnet, so dass ein schnelles Öffnen und Schließen über einen elektrisch gesteuerten Pneumatikzylinder ermöglicht wurde. Der Rezipient wurde über eine in die untere Hälfte eingesetzte Fritte aus Edelstahl mit einer Membran-Vakuumpumpe evakuiert. Diese Fritte diente zusätzlich als Vakuumspannplatte für die zu verschweißenden Membranen. Der Rezipient war für die gleichzeitige Verschweißung von vier Zellkulturträgern mit mikroperforierten Membranen in einer flächigen 2 x 2 Anordnung konzipiert. Auf die Metallfritte wurde zu diesem Zweck eine Kulissee aus Edelstahl aufgelegt, die die Position der Fügepartner exakt definierte. Der Rezipient besaß im geschlossenen Zustand ein im Vergleich zur ersten Versuchsanlage (ca. 6500 cm³) deutlich reduziertes Volumen (ca. 47 cm³), so dass ein deutlich schnelleres Evakuieren möglich war (< 1 min). Darüber hinaus begünstigte das geringere Rezipientenvolumen ein schnelleres Erreichen des Sättigungsdampfdruckes mit einer gleichzeitig geringeren Lösungsmittelmenge.

Der obere Teil des Rezipienten beinhaltete einen Pneumatikzylinder für die Verpressung der Fügepartner in der Dampfphase. Die obere Stempelfläche bestand aus einer Silikonmatte in die vier voneinander getrennte, ebene Silikonstempel mit der Fläche 21 x 21 mm² mechanisch eingefräst wurden (siehe Abb. 3-15, rechts). Diese Silikonmatte wurde reversibel über Stiftschrauben mit dem oberen Zylinder verbunden, so dass ein schnelles Austauschen dieser Matrize möglich war. Im oberen Teil des Rezipienten befanden sich ebenfalls gasdichte Anschlüsse zum Evakuieren. Der Rezipient wurde elektrisch mit einer Heizfolie auf etwa 30 °C temperiert. Die in den Rezipienten eingebrachte Lösungsmittelmenge konnte in dieser Anlage durch die Entnahme eines definierten Lösungsmittelvolumens (0,8 g) aus dem Lösungsmitteltank exakt gesteuert werden. Die definierte Menge an Lösungsmittel wurde in einem dem Rezipienten vorgeschalteten Behälter bei 45 °C vorgewärmt und verdampft. Nach dem Öffnen eines zwischengeschalteten elektromagnetischen Ventils konnte die bereits verdampfte Lösungsmittelmenge in den evakuierten Rezipienten strömen.

Die Steuerung der Anlage erfolgte über einen PC mit integrierter Mess- und Steuerungskarte (12 bit A/D-Schnittstelle, Meilhaus Electronic, ME 2000). Mit einer geeigneten Software (National Instruments[®], LabView 7.0) wurde eine eigene grafische Oberfläche zum Bedienen der Anlage entwickelt. Das Programm ermöglichte neben der manuellen Bedienung der Anlage auch einen automatisierten Prozess. Hierzu können über die Schnittstelle Steuersignale an die Ventile, die Vakuumpumpe und die pneumatischen Zylinder für die Öffnung des Rezipienten als auch für das Verpressen übertragen werden. Der kontinuierlich ermittelte Druck im Rezipienten wird im Gegenzug als Messsignal an den PC übermittelt.

In einem typischen Prozessablauf wurden die vier Platzhalter im unteren Teil des geöffneten Rezipienten mit jeweils vier zugeschnittenen, mikroperforierten Membranen bestückt. Die Fixierung der Folien erfolgte über das Ansaugen durch die Metallfritte mittels der Vakuumpumpe. Auf die Folien wurden die, zuvor in einem Ultraschallbad (dest. Wasser + Isopropanol) für mindestens 3 min gereinigten, abgefrästen Zellkulturträger aufgelegt. Im nächsten Schritt wurde der Rezipient verschlossen. Der obere Stempel wurde mit einem geringen Anpressdruck (0,4 bar ≈ ca. 8 N) auf die beiden Fügepartner aufgesetzt, um diese in ihrer Position zu fixieren. Über die obere und untere Zuleitung wurden der Rezipient und der

Behälter für die Vorverdampfung evakuiert. Nach dem Erreichen eines Drucks von ca. 6–8 mbar wurde dem Lösungsmittelvorrat ein definiertes Volumen an Lösungsmittel entnommen und vorgewärmt. Nach dem Verdampfen dieses Lösungsmittelvolumens im Vorwärmbehälter wurde das Ventil zum Rezipienten geöffnet. Über integrierte Drucksensoren konnte der Druckanstieg bis auf den, von der Temperatur des Rezipienten abhängigen, Sättigungsdampfdruck (ca. 360 mbar bei 30 °C) verfolgt werden. Die Lösungsmittelkontaktzeiten wurden hier aufgrund des sehr raschen Druckanstiegs ab dem Zeitpunkt des Erreichens des Sättigungsdampfdrucks gerechnet und betragen in etwa 10–15 s. Für die Verschweißung wurde ein Anpressdruck von ca. 3 bar (≈ 60 N) über den oberen Pneumatikzylinder auf die vier Fügepartner appliziert. Nach einer definierten Presszeit von etwa 5 s wurde der Rezipient erneut evakuiert bis ein Druck von etwa 10–14 mbar erreicht wurde. Nachdem der Rezipient mit Stickstoff belüftet und die Presskraft aufgehoben wurde, konnte der Rezipient geöffnet und die verschweißten Teile entnommen werden.

Die gesamte Prozesszeit wurde im Wesentlichen durch das stark reduzierte Rezipientenvolumen und durch die vom PC aus steuerbaren Ventile bei vergleichbarer Verbindungsqualität deutlich verkürzt. Die Dauer der Pressphase konnte ohne Qualitätseinbußen bei der Verbindung auf etwa 5 s vermindert werden. Die Probenvorbereitung erfolgte nach wie vor manuell, so dass hier keine wesentliche Zeitersparnis zu verzeichnen war. Jedoch war die Bestückung der Stempel an dieser teilautomatisierten Anlage aufgrund der Vakuumspanntechnik und durch die gute Zugänglichkeit im geöffneten Zustand des Rezipienten vereinfacht und erforderte daher einen deutlich geringeren Zeitaufwand (max. 1 min). Die gesamte Prozesszeit, inklusive der Probenvorbereitung und der Bestückung der Presswerkzeuge, belief sich somit auf einen deutlich kürzeren Zeitraum von etwa 10 min für vier und etwa 2,5 min für einen einzigen Zellkulturträger im Vergleich zu den oben angegebenen 40 min für einen in der Versuchsanlage verschweißten Zellkulturträger.

Abb. 3-16 zeigt einen in der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage gebondeten Zellkulturträger von dessen Vorderseite. Die Folie war im mikrostrukturierten Bereich mit den Stegen verschweißt. In der Regel war ein Trennen der Folien von den Kunststoffträgern nicht ohne ein Zerstören der Folie möglich.

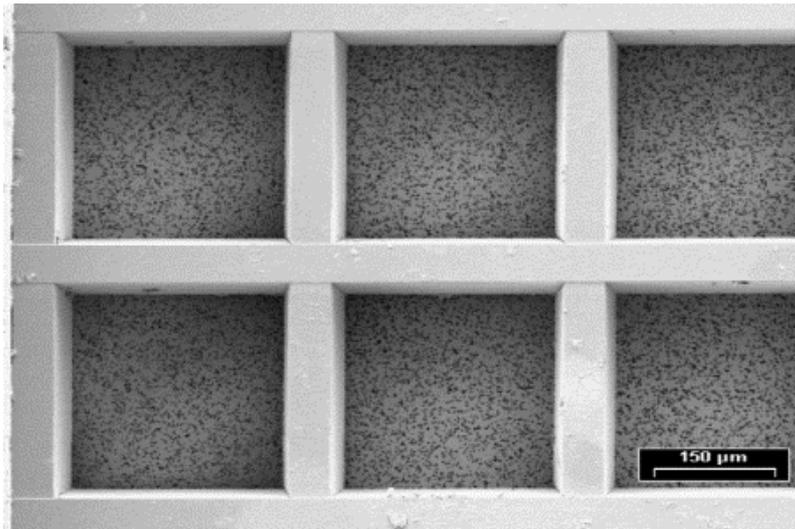


Abb. 3-16 REM-Aufnahme eines in der teilautomatisierten Anlage mit einer PC-Membran verschweißten Zellkulturträgers (Lösungsmittelschweißverfahren in der Gasphase).

3.2.10 Nachträgliche Lösungsmittelabgabe des verschweißten Zellkulturträgers

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass das Lösungsmittelschweißverfahren eine geeignete Methode ist, um mikrostrukturierte Teile mit einer Folie flächig zu verbinden. Dabei wurden ähnlich kurze Prozesszykluszeiten wie beispielsweise beim Ultraschall- oder Laserdurchstrahlschweißen erreicht. Trotz der nur sehr kurzen Lösungsmittelkontaktzeiten ist im Kunststoff der beiden Fügepartner Lösungsmittel zumindest oberflächlich gelöst. Der oberflächennahe Teil des Lösungsmittels sollte, durch das nach dem Verschweißprozess anschließende Evakuieren des Rezipienten, sehr zügig entfernbar sein. Während dessen wird besonders der Anteil im Bereich der Fügeflächen, durch die an dieser Fläche miteinander verschweißten Kunststoffkörper, an einem schnellen Ausgasen gehindert. Im speziellen für Zellkulturanwendungen sind jedoch der Aufbau und die Verbindung von Bauteilen ohne das zusätzliche Einbringen einer Fremdschubstanz, wie z. B. eines Klebstoffs oder einer verbleibenden Lösungsmittelmenge, wünschenswert bzw. erforderlich. Gravimetrische Messungen an verschweißten Probekörpern und Zellkulturträgern zeigten, dass durch das Ausgasen von inkorporiertem Lösungsmittel nach dem Lösungsmittelschweißprozess mit Aceton eine Gewichtsreduzierung mit annähernd exponentiellem Verlauf stattfindet. Die Gewichtsänderung der Prüfkörper und der mikrostrukturierten Zellkulturträger wurden jeweils im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht direkt nach der Verschweißung mit einer Mikrowaage gemessen (Sartorius, Analysenwaage Typ 1801). Einige dieser Gewichtszeitreihen sind in Abb. 3-17 bis Abb. 3-19 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass nach einer Zeit von etwa 200–600 min bei einer Auslagerung an Luft und bei Raumtemperatur nahezu keine mit der Waage messbare Gewichtsänderung mehr stattfand. Die gemessenen Gewichtsänderungen zwischen den einzelnen Versuchen sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Probengeometrien verwendet wurden und daher verschieden große Oberflächen vorlagen. Die über einen Zeitraum von mehr als 1000 min gemessene Gewichtsabnahme bezogen auf das Gewicht direkt nach der Verschweißung lagen für Zellkulturträger mit einer Lösungsmit-

telkontaktzeit von 3 bis 30 min und einer Evakuierungsdauer von 1 h in einem Bereich von etwa 1–25 mg (siehe Abb. 3-19).

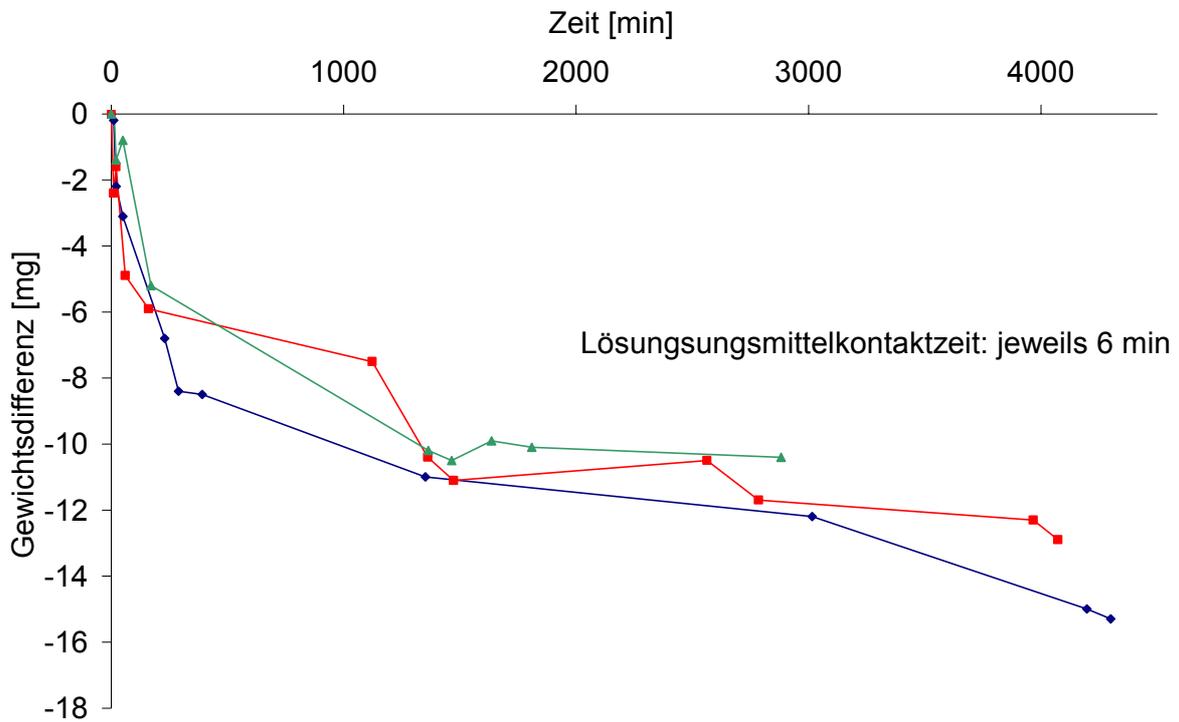


Abb. 3-17 Gewichtsunterschieden von drei in der Versuchsanlage mit Lösungsmitteldampf verschweißten PC-Proben (Probengeometrie: 35 x 80 mm² und 27 x 67 mm², Dicke 1 mm).

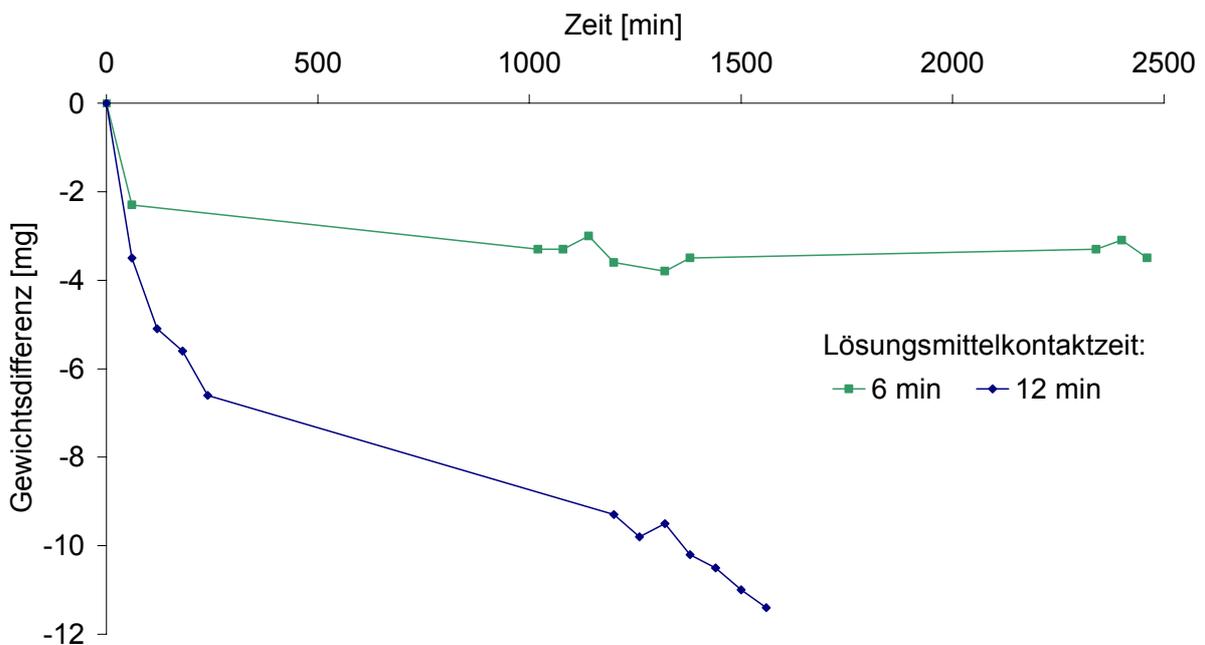


Abb. 3-18 Gewichtsunterschieden von zwei in der Versuchsanlage verschweißten PMMA-Proben (Probengeometrie: 35 x 80 mm² und 27 x 67 mm², Dicke 0,5 mm).

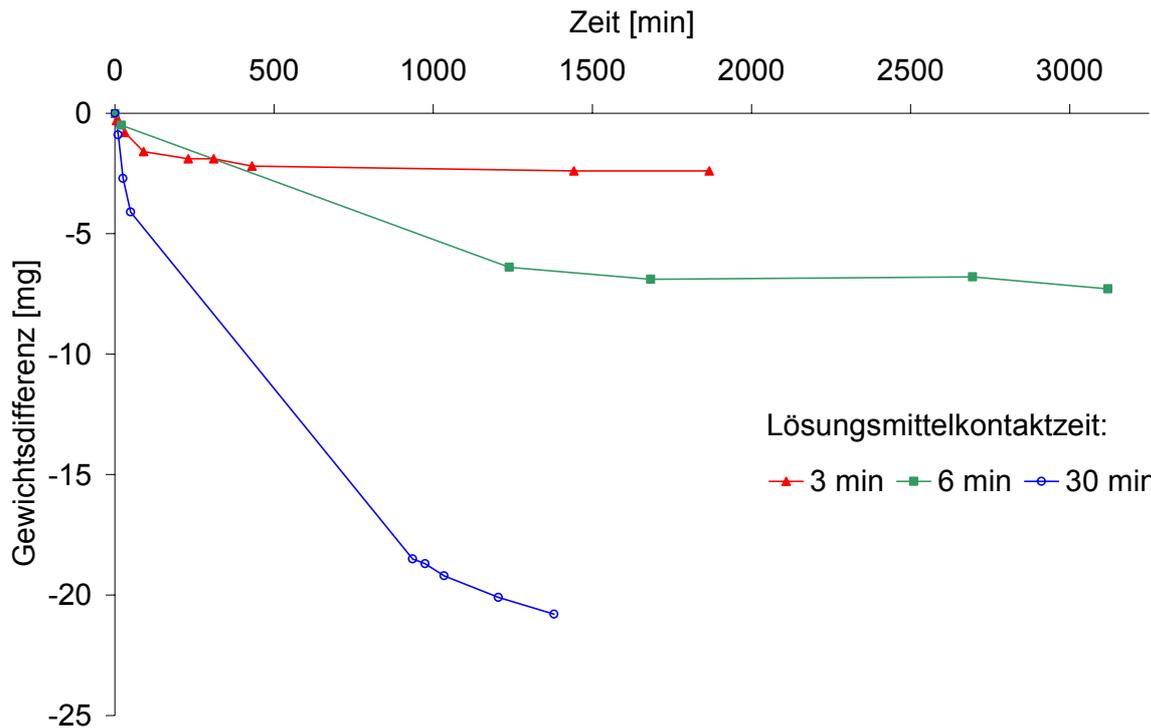


Abb. 3-19 Gewichtsänderungen von drei in der Versuchsanlage mit unterschiedlich langen Lösungsmittelkontaktzeiten verschweißten Zellkulturträgern.

An Zellkulturträgern, die in der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage mit Kontaktzeiten von ca. 60 s verschweißt und ca. 80 s im Rezipienten evakuiert wurden, konnten bereits keine Gewichtsänderungen mehr mit der Mikrowaage festgestellt werden. Anstelle der gravimetrischen Messungen wurden deswegen Messungen mit einem Gaschromatografen (Photovac 10S70, CPSil 5 CB) durchgeführt, um die sehr geringen Mengen des nachträglich austretenden Lösungsmittels messen zu können. Zunächst wurde eine Eichgerade erstellt, indem definierte Gasvolumina gesättigten Acetondampfes in einen abgedichteten Glaskolben (2,25 l) eingespritzt wurden. Die eingestellten Konzentrationen wurden mit den integrierten Flächen der jeweils detektierten Peaks korreliert (siehe Abb. 3-20).

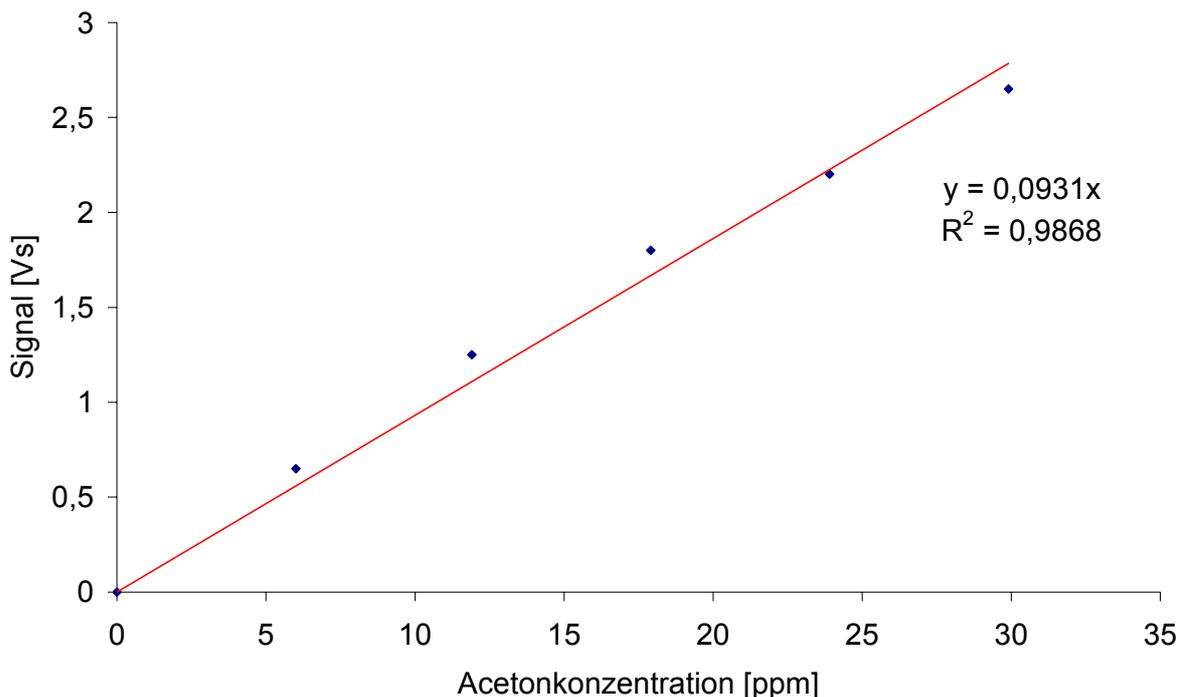


Abb. 3-20 Darstellung der Eichgerade für die Bestimmung der nach einem Verschweißprozess abgegebenen Lösungsmittelmenge aus einem Membran-gebondeten Zellkulturträger.

Im Versuch wurde ein Zellkulturträger direkt nach dem Verschweißprozess (60 s Lösungsmittelkontaktzeit, 80 s Evakuieren) in den abgedichteten Glaskolben eingebracht. Der Acetongehalt in der Atmosphäre des Glaskolbens wurde nach 10, 20, 40 und 70 min durch das Einführen einer Sonde gemessen. Nach der Messung wurde der Kolben mit Umgebungsluft mehrmals gespült. Dadurch wurde sichergestellt, dass es stets eine starke Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Desorption des Lösungsmittels gab. Folgende Abb. 3-21 zeigt die Messwerte dieser Versuchsreihe. Am Kurvenverlauf ist zu erkennen, dass trotz der vergleichsweise langen Lösungsmittelkontaktzeit für die teilautomatisierte Anlage bereits nach einer 20 min dauernden Auslagerung in einem volumenbegrenztem Behälter nahezu kein Lösungsmitteldampf mehr aus dem Kunststoff in die Gasphase übertritt. Über die Umrechnung anhand der Referenzgeraden und durch Summation der dadurch erhaltenen Einzelwerte wurde dabei eine Lösungsmittelmenge von etwa 100 µg Aceton ermittelt, die über den Zeitraum von 70 min aus dem Zellkulturträger ausgegast ist. Mit diesem Verfahren kann jedoch keine Bestimmung des verbleibenden Lösungsmittels im Kunststoff erfolgen, sondern es kann nur eine grobe Bestimmung des ausgasenden Anteils stattfinden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass auch ein hoher Prozentsatz an Lösungsmittel sehr lange Zeit in einem polymeren Festkörper fest eingeschlossen sein kann [103]. Der unter der Bezeichnung Inklusion bekannte Zusammenhang könnte unter Umständen in Zellkulturanwendungen eine Rolle spielen, falls toxische Mengen an Restlösungsmittel aus dem Kunststoff beispielsweise erst durch das erwärmte Medium herausgelöst würden. Daher wurden weiterführende Messungen in direktem Kontakt mit Zellen unter Zellkulturbedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.5).

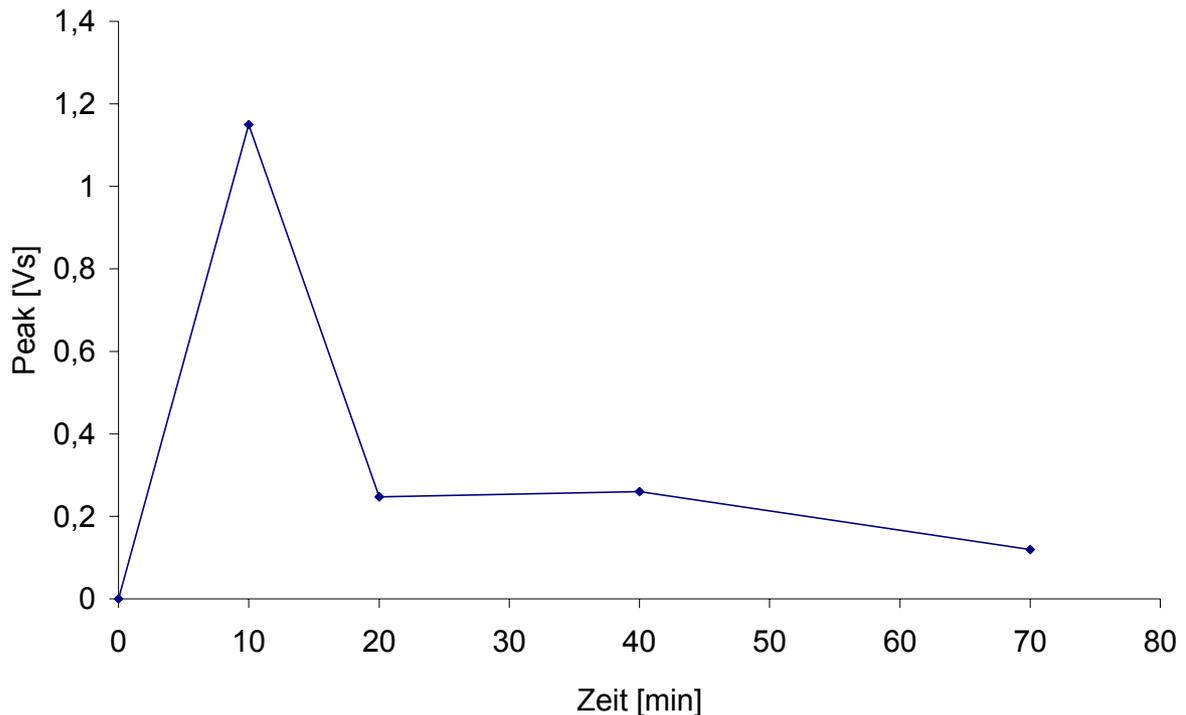


Abb. 3-21 Darstellung der mit einem Gaschromatografen gemessenen Lösungsmittelabgabe eines in der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage gebondeten Zellkulturträgers. Nach etwa 20 min Auslagerung des Zellkulturträgers in dem Glaskolben wurden nur noch geringe Mengen an Acetondampf freigesetzt.

3.2.11 UV-Modifizierung und Kompatibilität zum Verschweißprozess

Insbesondere für Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften werden mikrotechnische, formgebende Verfahren vielfach mit nachträglich durchgeführten Materialmodifikationsprozessen kombiniert, um Mikrostrukturen mit maßgeschneiderten Eigenschaften herstellen zu können. Isotrop wirkende Modifikationsverfahren, wie z. B. Plasmaprozesse und die Gasphasenfluorierung (siehe Kapitel 4.6.1), können in der Regel an dreidimensional mikrostrukturierten Kunststoffformkörpern ohne größere Probleme durchgeführt werden. Dagegen besteht bei Verfahren, die auf elektromagnetischer Strahlung oder Teilchenstrahlung beruhen, wie z. B. der Oberflächenmodifikation durch UV-Strahlung, häufig das Problem der Abschattung oder der Streuung bzw. Beugung der Strahlung an den Strukturen. Weiterhin sind insbesondere masken- und stempelbasierte Modifikationsverfahren in Mikrostrukturen nur eingeschränkt (an zugänglichen Flächen) oder gar nicht möglich. Die Einführung eines neuen mikrotechnischen Verfahrens für die Fertigung des am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelten Zellkulturträgers hatte daher nicht nur eine vereinfachte Herstellung zum Ziel, sondern es sollte auch eine vereinfachte Kombination mit verschiedenen Verfahren zur Materialmodifikation ermöglicht werden.

Ein am IBG entwickeltes Verfahren zur gezielten Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Zellen auf Kunststoffoberflächen [110,111] könnte möglicherweise genutzt werden, um die Ausbildung und/oder den Erhalt einer dreidimensionalen Zellkultur in einem Scaffold zu unterstützen. Ein geeignetes, zweidimensionales, chemisches Zelladhäsionsmusters in den

Mikrocontainern des Zellkulturträgers könnte somit die Funktion der bisher mikrostrukturierten Containerböden übernehmen. Bei diesem speziellen Modifikationsverfahren werden Polymeroberflächen, z. B. aus PS, PMMA oder PC, einer kurzwelligen UV-Strahlung in Luft über einen Zeitraum von wenigen Minuten bis zu einer Stunde ausgesetzt. Die für den Prozess entscheidende Wellenlänge liegt bei 185 nm. Der Einsatz einer strukturierten Chrommaske auf Quarzglas ermöglicht die selektive Bestrahlung definierter Bereiche der Kunststoffoberfläche, so dass in einem einzigen Schritt zweidimensionale Muster auf den Polymeroberflächen erzeugt werden können. Durch die Bestrahlung werden u. a. Carboxylgruppen erzeugt, die die Ausbildung des Proteinadsorbates bei Kontakt der Polymeroberfläche mit Zellkulturmedium beeinflussen [111]. Die unterschiedliche Zusammensetzung des adsorbierten Proteinfilms beeinflusst die zeitlich verzögerte Adhäsion von Zellen auf der belegten Oberfläche in der Weise, dass sich Zellen sehr selektiv auf den bestrahlten Bereichen mit dem veränderten Proteinfilm verankern. Um einen hohen Kontrast zwischen bestrahltem und nativem Kunststoff zu erreichen, ist entweder eine parallele Lichtquelle notwendig (z. B. ArF-Excimerlaser mit 193 nm), so dass der Abstand zwischen Maske und Oberfläche annähernd beliebig gewählt werden kann, oder es ist ein direkter Maskenkontakt im Fall einer divergierenden Strahlungsquelle erforderlich, wie z. B. im Fall einer Niederdruck-Quecksilberdampflampe. Der zweite Fall stellt die deutlich einfachere und kostengünstigere Vorgehensweise dar. Aufgrund des damit erforderlichen direkten Maskenkontaktes muss jedoch eine Bestrahlung der mikroperforierten Membran vor der Verbindung mit dem spritzgegossenen Modul erfolgen. Die Voraussetzung für eine solche Prozessabfolge ist deswegen die Beständigkeit der durch die Bestrahlung erzeugten Oberflächeneigenschaften gegenüber der gewählten Verbindungstechnik.

Die Beständigkeit der durch UV-Bestrahlung auf einer mikroperforierten PC-Membran (K30SH58050, Osmonics Inc.) erzeugten Oberflächenmodifikation gegenüber dem kurzzeitigen Einwirken einer gesättigten Acetondampf-atmosphäre wurde experimentell nachgewiesen. Die Tests wurden sowohl an der Versuchsanlage mit den deutlich längeren Lösungsmittelkontaktzeiten als auch an der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage durchgeführt. Für die Tests an der Versuchsanlage wurden gleichgroße Proben der zu verschweißenden, mikroperforierten PC-Membran unterschiedlich lang mit UV-Licht bestrahlt (10 min, 30 min, 60 min). Anschließend wurde im Rezipienten unter den typischen Prozessbedingungen (Raumtemperatur, 240 mbar Acetondampfdruck) ein Verschweißprozess simuliert, d. h. der Prozess wurde bis auf die Verpressung mit dem Zellkulturträger unverändert durchgeführt. Weiterhin wurde untersucht, ob eine umgekehrte Prozessabfolge, d. h. zuerst der Verschweißprozess und anschließend die UV-Modifikation, einen Einfluss auf die Modifizierbarkeit der PC-Membran hat. In diesem zweiten Fall wurden eine 6 min dauernde Lösungsmittelkontaktzeit und eine 30 min dauernde UV-Bestrahlung als Versuchsparameter gewählt. Als Maß für die Beständigkeit bzw. für die nachträgliche Modifizierbarkeit wurde die Oberflächenladungsdichte der negativ geladenen Carboxylgruppen untersucht. Die Proben wurden hierzu in eine wässrige Lösung eines kationischen Farbstoffes (Kristallviolett, 1 mmol in 1 l H₂O, Serva Feinbiochemika, Heidelberg) eingetaucht. Anschließend wurden die Folienproben mehrmals mit destilliertem Wasser gespült bis es zu keiner sichtbaren Färbung des Wassers mehr kam. Die verbleibende adsorbierte Menge an Farbstoff an der Oberfläche der PC-Membran wurde danach mit einer definierten Menge Desorptionslösung abgespült (2 x 0,75 ml, 80 Vol.% EtOH und 20 Vol.% 0,1 n HCl) und mittels eines UV/VIS-Spektrometers (Perkin Elmer, Lambda20) bei einer Wellenlänge von 591 nm gemessen [112].

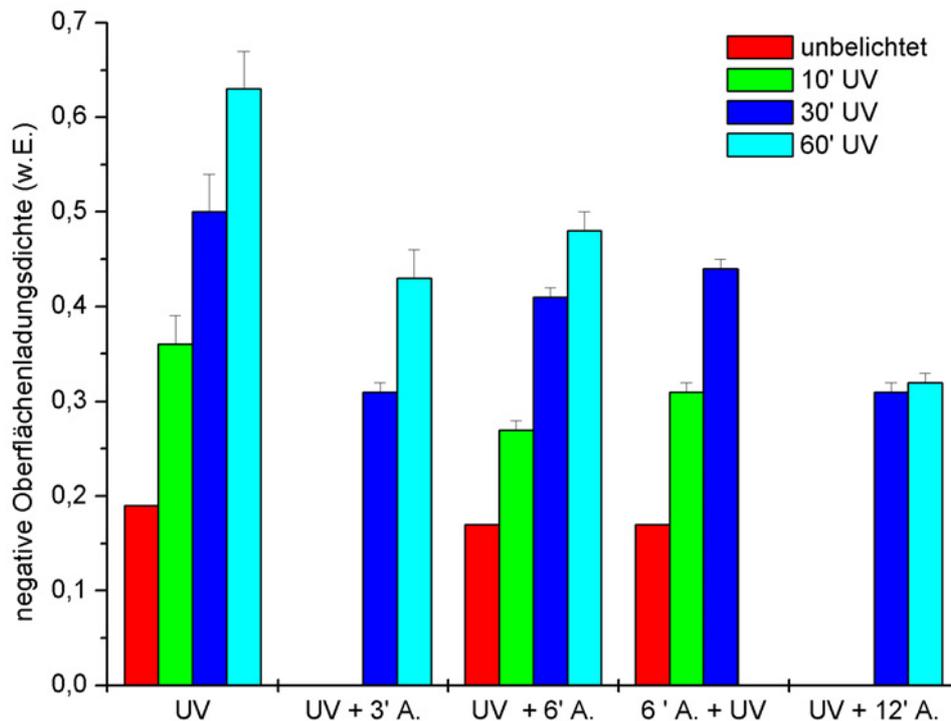


Abb. 3-22 Einfluss des Lösungsmittelschweißverfahrens in der Versuchsanlage auf die durch eine UV-Bestrahlung erzeugte bzw. erzeugbare negative Oberflächenladungsdichte auf einer PC-Membran (UV = Referenz; UV + A. bzw. A. + UV = UV-Bestrahlung + Aceton bzw. Aceton + UV-Bestrahlung).

Die Messwerte zeigen, dass bei allen drei Lösungsmittelkontaktzeiten, 3, 6 und 12 min, eine leichte, aber signifikante Verringerung der negativen Oberflächenladungsdichte gegenüber den Referenzmessungen stattfand (siehe Abb. 3-22). Der Kontakt über 3 und 6 min mit dem gasförmigen Aceton führte zu einer annähernd vergleichbaren Abnahme der Werte gegenüber der Referenz, während bei einer 12 min dauernden Aceton-Einwirkzeit eine starke Abnahme für die mit 60 min UV-bestrahlten Proben erkennbar ist. Die umgekehrte Reihenfolge der beiden Prozessschritte (A. + UV) scheint erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Ausbildung negativer Oberflächenladungen durch eine nach dem Lösungsmittelkontakt durchgeführte UV-Bestrahlung zu nehmen.

Ein ähnlicher Test wurde an der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage mit dessen typischen Verschweißparametern durchgeführt. Als Referenz wurden hier die Messwerte einer unbehandelten Folie und einer 30 min UV-bestrahlten PC-Membran herangezogen. Weiterhin wurden in einem simulierten Verschweißprozess unbelichtete, 30 und 60 min belichtete Membranen einer für die teilautomatisierte Lösungsmittelschweißanlage typischen Lösungsmittelkontaktzeit von 15 s ausgesetzt (siehe Abb. 3-23).

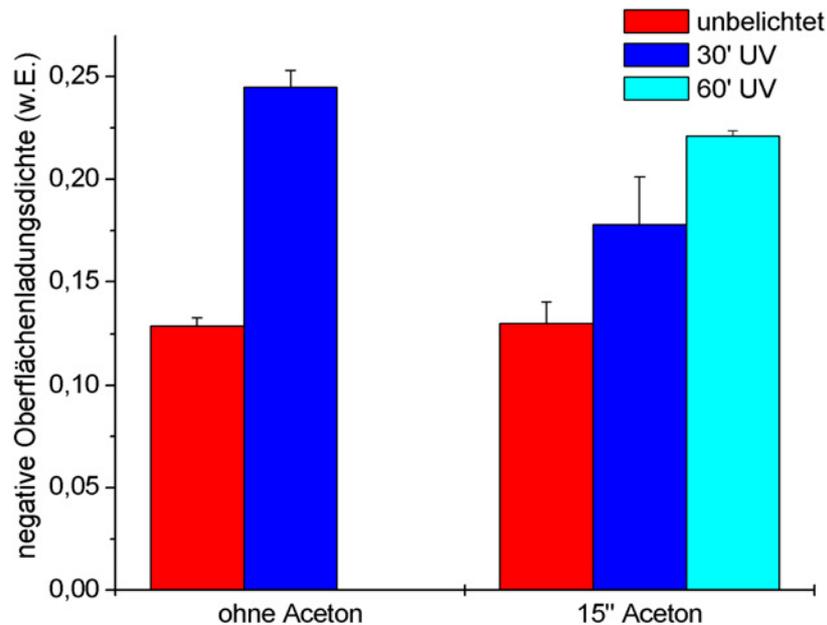


Abb. 3-23 Beeinflussung der durch eine UV-Bestrahlung erzeugten negativen Oberflächenladungsdichte auf einer PC-Membran (K30SH58050, Osmonics Inc.) durch einen Lösungsmittelschweißprozess in der teilautomatisierten Anlage.

Anhand des Diagramms ist zu erkennen, dass trotz der im Vergleich zur Versuchsanlage deutlich verkürzten Lösungsmittelkontaktzeiten in der teilautomatisierten Anlage eine ähnlich starke Abnahme der negativen Oberflächenladungsdichte stattfand. Bei beiden Versuchen erfolgte durch den Lösungsmittelkontakt ein Absinken der 30 min UV-Belichtungswerte auf etwa 70% des zugehörigen Referenzwertes. Dieser Zusammenhang ist insofern erwartungsgemäß, als stets ein ausreichendes Quellen und Anlösen der (modifizierten) Kunststoffoberfläche stattfinden muss, um eine irreversible, homogene Verschweißung zwischen Folie und spritzgegossener Gitterstruktur zu erhalten.

Die eingeschränkte Beständigkeit der UV-Oberflächenmodifikation nach Welle [111] wurde des Weiteren mit zellbiologischen Tests in der Zellkultur gezeigt (siehe hierzu Kapitel 4.6.2).

3.3 Strategie II: Kombination Mikrothermoformen – Ionenspurtechnologie

3.3.1 Stand der Technik Mikrothermoformen

Bereits vor über 100 Jahren wurde ein zum heutigen Thermoformen ähnliches Verfahren für die Umformung von halbsynthetischen Kunststoffen genutzt, um Formkörper wie z. B. Klaviertasten zu erzeugen [113]. Der Beginn des modernen Warmumformens wurde durch wichtige Entwicklungen im Bereich der Polymerchemie und durch die Erfindung von Schneckenextrudern und Rollenautomaten in der Zeit kurz vor dem zweiten Weltkrieg ermöglicht [113]. Die heutige Form des Thermoformens ist ein inzwischen langjährig genutztes und für die Industrie wichtiges Verfahren zur Herstellung großflächiger, dünnwandiger aber dennoch stabiler Formkörper, wie z. B. Becher, Schalen, Wannen oder Deckel. Für den Prozess werden sowohl Plattenmaschinen als auch Rollenautomaten verwendet. In-line-Anlagen mit

einem hohen Automatisierungsgrad dienen der Herstellung sehr großer Stückzahlen. Dieses Warmformverfahren ist daher beispielsweise prädestiniert für die Verpackungsindustrie, um mit nur geringen Kunststoffmengen, dünnwandige, stabile oder flexible Verpackungseinheiten in sehr großen Stückzahlen herstellen zu können.

Dieses von der Industrie heute viel genutzte Verfahren diente bis vor kurzem ausschließlich der Erzeugung makroskopischer Formkörper. Vor einigen Jahren wurde am IMT erstmalig gezeigt, dass dieses Warmformverfahren prinzipiell auch für die Herstellung polymerer, mikrostrukturierter Bauteile geeignet ist [114]. Das auf einem speziellen makroskopischen Thermoformprozess, dem so genannten Trapped-Sheet-Thermoformen (siehe unten), beruhende Verfahren wurde als Mikrothermoformen bezeichnet. Aufgrund der mikroskopischen Dimensionen wurde bei diesem adaptierten Verfahren auf typische Elemente des Thermoformens, wie z. B. Vorstreckeinrichtungen oder Spannrahmen, verzichtet. Die Erwärmung des Halbzeuges erfolgte nicht über spezielle Heizelemente, sondern über das vollständig temperierte Werkzeug mittels Konduktion.

Für die Herstellung mikrofluidischer Kapillarelektrophoresestrukturen, angeordnet in einem 4 x 4 Array im Raster von 10 mm x 10 mm, wurde ein kombiniertes zweistufiges bzw. sequentielles Verfahren angewendet, das auf den bekannten Prozessen des Trapped-Sheet-Thermoformens und des Heizelement-Wärmekontaktschweißens bzw. Heißsiegeln basiert [95]. Der nachträglich noch im Formwerkzeug durchgeführte Verbindungsschritt ermöglichte die Herstellung von fluidisch dichten, geschlossenen Hohlstrukturen in Form von Kanälen und Reservoirs aus unterschiedlichen Polymeren. Die Möglichkeit zur Durchführung eines simultanen Verfahrens auf mikrotechnischer Ebene, bestehend aus einem Simultanen Twin-Sheet-Thermoformprozess und dem bereits zuvor erwähnten Verbindungsschritt, wurde anhand mikrofluidischer Teststrukturen mit einem vereinfachten Design gezeigt.

Die Geometrie der Kapillarelektrophoresestrukturen ergab ein, im Vergleich zu den maximalen makroskopischen Verstreckverhältnissen von 4–12, gemäßigtes Oberflächenverstreckverhältnis R_a von maximal etwa 2 [95]. Dieses gemittelte Verstreckverhältnis ist definiert als der Quotient zwischen der Formteilfläche A_F und der Halbzeugfläche A_0 :

$$R_a = \frac{A_F}{A_0} \quad (3.2)$$

Eine ausreichende Formschärfe wurde mit einem Ausformdruck von 5 bar (4 bar Gasüberdruck (N_2) gegenüber etwa 1 bar Feinvakuum) erzielt, wenn amorphe, thermoplastische Kunststofffolien, vorzugsweise PS, mit einer Dicke von etwa 25 μm in das evakuierte Negativwerkzeug eingeformt wurden. Die dreiteiligen Thermoformwerkzeuge bestanden aus einem mikromechanisch gefertigten Formwerkzeug aus Messing, einer metallischen Gegenplatte mit integrierten Vakuum- und Druckgasleitungen bzw. -kanälen und einer in der Gegenplatte montierten elastomeren Dichtung (siehe Abb. 3-24)[95]. Die Auslegung des Werkzeuges ermöglichte einen einfachen Aufbau auf einer herkömmlichen Heißpräganlage.

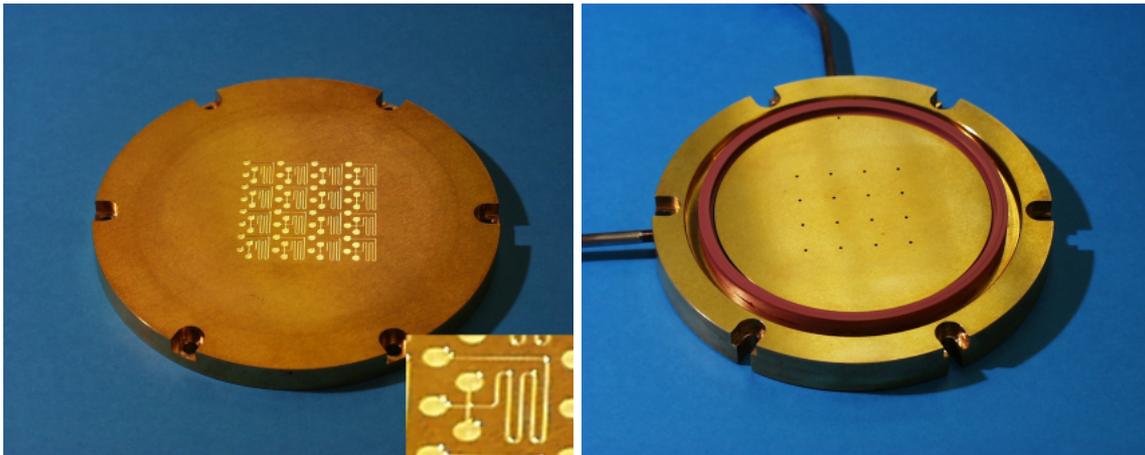


Abb. 3-24 Formwerkzeug für das Mikrothermoformen von 4 x 4 CE-Strukturen (links). Zugehöriges Gegenwerkzeug mit Silikondichtungsring und den integrierten Vakuum- und Druckgasleitungen (rechts)[95].

Das Heißsiegeln des thermogeformten Teiles erfolgte innerhalb des Werkzeuges auf eine Deckelungsplatte aus Polysulfon oder Polystyrol, die mit einer etwa 4,5–6 µm dicken, aufgeschleuderten Siegelschicht auf Polyester-Polyether-Polyurethan Basis versehen wurde. Das Siegeln wurde entweder in Anlehnung an das Twin-Sheet-Formen in einem einstufigen oder in einem sequentiellen, zweistufigen Prozess durchgeführt. Durch Befüllungsversuche mit eingefärbtem Wasser konnte die Dichtigkeit der gesiegelten, kapillaren Hohlstrukturen gezeigt werden.

3.3.2 Hintergrund Mikrothermoformen

Das Thermoformen ist nach der VDI-Richtlinie 2008 des VDI die Gestaltsänderung eines erwärmten, fest eingespannten thermoplastischen Halbzeugs durch Streckziehen unter Ausdünnung der Ausgangswanddicke zu einem dreidimensionalen Formteil [113]. Das thermoplastische Halbzeug liegt dabei in der Regel als Platte oder Folie vor. Es wird für die Fertigung makroskopischer Teile entweder innerhalb der Formstation oder in einer vorgeschalteten Heizstation auf Umformtemperatur erwärmt. Je nach Prozess und Anwendung werden Heizstrahler (IR-Strahlung), Heizplatten bzw. -walzen (Wärmeleitung) und Konvektionsheizungen mit Warmluft eingesetzt, um das Halbzeug auf ein geeignetes Temperaturniveau zu bringen. Amorphe Thermoplaste werden für die Umformung über ihre Glasübergangs- bzw. Erweichungstemperatur erwärmt und in einen entropieelastischen Zustand versetzt. Der Temperaturbereich für die Umformung teilkristalliner Thermoplaste liegt im Bereich ihrer Kristallitschmelztemperatur. Für einen amorphen Thermoplast gilt im Zustand der Entropieelastizität eine freie mikrobrownsche Molekülbeweglichkeit, die bei einer Beaufschlagung des erwärmten Polymeren mit einer Belastung zu einer gummielastischen Verformung führt. Die Aufhebung der Belastung bei dieser Temperatur führt zu einer sofortigen Verformungsrückstellung [98].

Prinzipiell werden beim Thermoformen zwei verschiedene Verfahrensvarianten hinsichtlich der Werkzeugausführung unterschieden. Das Einformen eines erwärmten Halbzeuges in eine Vertiefung bzw. Kavität des Formwerkzeuges wird als Negativformen und das Verstre-

cken des Halbzeuges über eine erhabene Struktur als Positivformen bezeichnet. Die thermogeformten Teile unterscheiden sich je nach Formprozess hinsichtlich ihrer Formgenauigkeit an Innen- und Außenseite, ihrer Wanddickenverteilung, ihrer Neigung zur Faltenbildung während des Formvorgangs und ihrer Entformbarkeit nach dem Formprozess [113].

Die Umformung des fest eingespannten und erwärmten Thermoplasten kann entweder über das Evakuieren der Form und der dadurch erzeugten Druckdifferenz zum Umgebungsdruck als so genanntes Vakuumformen oder durch die Beaufschlagung eines pneumatischen Druckes auf die dem Formwerkzeug entgegen gesetzte Seite des Halbzeuges als Druckluftformen erfolgen. Weiterhin sind Warmformprozesse bekannt, die auf der Applikation von Flüssigkeitsdrücken basieren, die mittels elastischer Membranen übertragen werden, oder die auf der Verwendung mechanischer, formstabiler Stempel beruhen. Damit keine Verformungsrückstellung bei der Entfernung der Belastung auftritt, wird der Thermoplast durch Abkühlung, in der Regel auf 20 K unter die Glasübergangs- oder Kristallitschmelztemperatur [113], vor seiner Entformung in seiner neuen Form eingefroren. Der umgeformte Thermoplast erstarrt beim Kontakt mit dem gekühlten Formwerkzeug. Ferner können Kühlgebläse zur Abkühlung eingesetzt werden, deren Luftstrom unter Umständen zusätzlich mit Wasserdampf angereichert ist.

Im mikrotechnischen Bereich wurde bereits gezeigt, dass die Druckluftumformung in temperierbaren Negativformwerkzeugen ein schnell und einfach zu realisierendes Konzept darstellt [95,114]. Negative Formwerkzeuge sind mikromechanisch vergleichsweise gut und schnell herstellbar, da nur geringe Mengen an Material aus einer plan gefrästen Werkzeugplatte formgenau herausgearbeitet werden müssen. Weiterhin kann das Halbzeug in diesem Fall durch die beiden plattenförmigen Werkzeugteile, Formwerkzeug und Gegenplatte, flächig auch in den Bereichen zwischen den Mikrostrukturen fest eingeklemmt werden und es entsteht eine für das konduktive Heizen wichtige große Kontaktfläche. Aufgrund der geringen Dicken der eingesetzten Folienhalbzeuge ist in diesem Größenmaßstab eine der Formstation vorangehende, separate Heizstation nicht praktikabel, da die sehr schnelle Abkühlung der dünnen Halbzeuge eine enorm rasche Zuführung des Halbzeuges in die Formstation erfordern würde. Dagegen ist die Erwärmung des Thermoplasten durch den flächigen Kontakt mit einem temperierbaren Negativformwerkzeug auf einer konventionellen Heißpräganlage einfach zu realisieren. Dies führt jedoch zu einer deutlichen Ausdehnung der für dieses Verfahren eigentlich typischen kurzen Zykluszeit, da die vergleichsweise geringen Heiz- und Kühlraten der massiven, metallischen Werkzeugplatten auf der Präganlage ausschlaggebend werden. Die Einführung mechanischer oder pneumatischer Verstreckhilfen, wie sie in der makroskopischen Welt für große Umformverhältnisse angewendet werden, ist aufgrund der begrenzten Positioniergenauigkeit der entsprechenden Hilfselemente zum Formwerkzeug nur dann sinnvoll, wenn eine nicht mehr ausreichende Formschärfe oder eine zu stark inhomogene Wanddickenverteilung dies erforderlich macht und die Größenverhältnisse der zu formenden Strukturen dies noch zulassen.

3.3.3 Alternative Werkzeug- und Verfahrenskonzepte für das Mikrothermoformen des polymeren Zellkulturträgers

Für die Herstellung des polymeren Zellkulturträgers des Forschungszentrums Karlsruhe wurden auf der Grundlage der am IMT gewonnenen Ergebnisse [95] neue Ideen und Konzepte

für die Gestaltung des Thermoformwerkzeuges entwickelt. Verschiedene Design- und Prozessvarianten sollen im Folgenden kurz erläutert werden, bevor das letztendlich realisierte Werkzeugdesign vorgestellt wird.

Das grundlegende Design des Zellkulturträgers mit einer Kavitätentiefe von etwa 300 μm bei gleichzeitig ähnlich großen lateralen Abmessungen sollte auch für die Herstellung durch Mikrothermoformen beibehalten werden, so dass sich ein größeres Aspekt- und Oberflächenverstreckverhältnis im Vergleich zu den bereits am IMT im Vorfeld gefertigten Kapillarelektrophoresestrukturen ergab. Eine simulative Abschätzung zeigte, basierend auf der am IMT entwickelten Routine in ANSYS [95], dass der für diese geometrische Auslegung erforderliche Druck bei einem typischen Halbzeug aus Polystyrol mit einer Dicke von 25 μm und einer Umformtemperatur von 115 $^{\circ}\text{C}$ in einem Bereich von etwa 40 bis 60 bar liegen müsste (siehe Abb. 3-25).

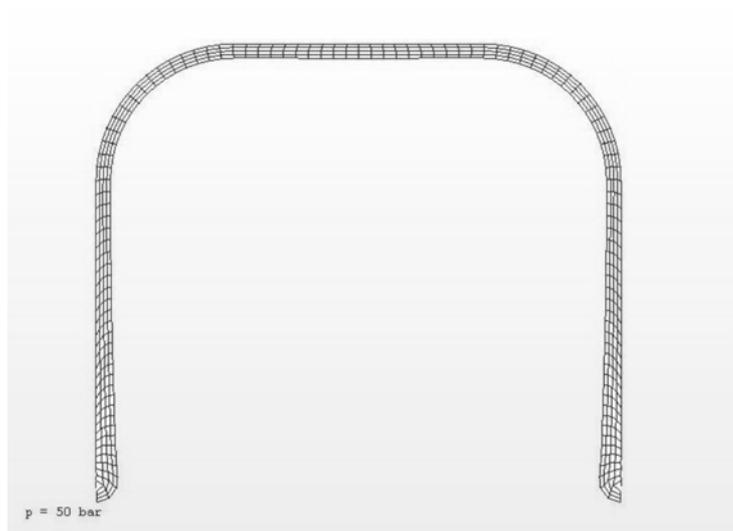


Abb. 3-25 Simulation des Mikrothermoformprozesses für die Umformung einer 25 μm dicken PS-Folie bei einer Temperatur von 115 $^{\circ}\text{C}$ und einem Druck von 50 bar (ANSYS).

Aufgrund des erforderlichen hohen Druckes, um eine ausreichende Formschärfe zu erzielen, bestand ein erstes Konzept darin, nicht mit pneumatischen, sondern mit hydraulischen Drücken zu arbeiten. Hierbei sollte nicht wie im makroskopischen Fall der hydraulische Druck indirekt über eine elastische Membran übertragen werden, sondern die unter Druck stehende, temperierte Flüssigkeit sollte in direktem Kontakt mit dem erwärmten Halbzeug für dessen Umformung genutzt werden. Die Vorteile eines solchen Vorgehens liegen einerseits in der Verfügbarkeit kleiner, kostengünstiger hydraulischer Pumpen, mit denen Drücke weit über 100 bar schnell und einfach erreichbar sind. Andererseits ist das Gefährdungspotenzial trotz des hohen Arbeitsdruckes aufgrund der sehr geringen Kompressibilität und der geringen notwendigen Volumina der Flüssigkeit sehr gering. Um eine Phasenumwandlung von flüssig zu gasförmig bei der vorliegenden Umformtemperatur und dem anliegenden Druck innerhalb des Werkzeuges während des Formvorgangs zu vermeiden, sind für einen solchen Prozess wahrscheinlich besonders hochmolekulare, inerte Flüssigkeiten geeignet, wie z. B. perchlorierte oder perfluorierte Kohlenwasserstoffe [95]. Eine Reaktion des Druckmediums

mit dem Polymeren oder den Werkzeug- und Dichtungsmaterialien darf unter den entsprechenden Formbedingungen nicht stattfinden. Das Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, da:

- ein direkter Flüssigkeitskontakt einen nachfolgenden Reinigungsschritt des Formkörpers erforderlich machen könnte (mögliche Ausnahmen: bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur flüchtige Medien, wie z. B. FKW's).
- eine durch Diffusionsprozesse der Flüssigkeitsmoleküle verursachte Kontamination des polymeren Werkstoffes nicht ausgeschlossen werden kann.
- eine mögliche Verschlechterung des Vakuums zu Beginn des Formschrittes innerhalb des Formwerkzeuges aufgrund des Verdampfens der Flüssigkeit auftreten kann.
- ein vergleichsweise höherer Wartungsaufwand hinsichtlich der Kontrolle der Qualität der Flüssigkeit und eines wahrscheinlich erforderlichen regelmäßigen Austausches der Flüssigkeit aus den zuführenden Leitungen zu erwarten ist.

Durch die Verwendung einer hybriden Technologie, bei der ein nur sehr kleines Gasvolumen für die Umformung des Polymeren über eine aktiv gepumpte Flüssigkeitssäule auf das erforderliche Druckniveau gebracht wird, könnten die oben genannten Nachteile möglicherweise umgangen werden.

Für die Ausformschärfe ist nicht der aufgebrauchte Absolutdruck entscheidend, sondern die erreichte Druckdifferenz zwischen den beiden Seiten des fest eingeklemmten Folienhalbzeuges. Im makroskopischen Bereich werden häufig so genannte Entlüftungsbohrungen oder –schlitze verwendet, um den Aufbau eines pneumatischen Gegendruckes besonders im Bereich von Ecken und Kanten während des Ausformens, aufgrund der steten Einengung des Restgases durch den einformenden Kunststoff zu verhindern. Spätestens beim Erreichen des Druckgleichgewichtes zwischen Vorder- und Rückseite des Halbzeuges ist der Prozess zumindest in diesem Bereich der Form beendet. Aufgrund der für die Fertigung des Zellkulturträgers benötigten Strukturgrößen sind Entlüftungsbohrungen in den einzelnen Mikrokavitäten nicht oder nur sehr aufwändig mikrotechnisch realisierbar. Folgende Abb. 3-26 zeigt einen möglichen Ansatz, um das Auftreten eines Gegendruckes beim Mikrothermoformen zu verhindern. Die Negativform wird hierbei nicht in die massive Werkzeugplatte eingearbeitet, sondern in eine so genannte Formkulissee. Dadurch, dass die Dicke der Kulissee so gewählt wird, dass sie der Tiefe der Mikrokavitäten entspricht (siehe oben: 300 µm), werden die Mikrokavitäten als Durchgangslöcher gefertigt.

Diese Formkulissee kann einerseits als Einsatz in das plattenförmige Werkzeug in eine dafür vorgesehene Vertiefung gelagert werden, wobei entweder die Rückseite der Kulissee oder der Boden der Vertiefung eine aufgeraute Oberfläche aufweist, damit ein flächiges und abdichtendes Aufliegen der Kulissee verhindert wird. Andererseits kann die Kulissee auch direkt auf einer mikroporösen Grundplatte, die z. B. aus einer Metall- oder Keramikfritte besteht, aufgebaut werden. In beiden Fällen kann über abführende Bohrungen die Luft aus den Kavitäten beim Einformen der Folie entweder seitlich am Boden durch die durch die Rauigkeit erzeugten Mikrospalte oder durch die poröse Grundplatte entweichen. Um diesen Vorgang aktiv zu unterstützen kann zusätzlich über diese Zuleitungen die Form mit Hilfe von Pumpen evakuiert werden. Die Formkulissee kann dabei mit verschiedenen mikrotechnischen Verfahren und aus unterschiedlichsten Materialien getrennt vom restlichen Werkzeug

gefertigt werden, z. B. mikrozerspanend in Metall oder UV-lithografisch in SU8. Dieses Konzept ermöglicht weiterhin ein einfaches und schnelles Austauschen von verschiedenen Formkulisen innerhalb des gleichen Werkzeuges.

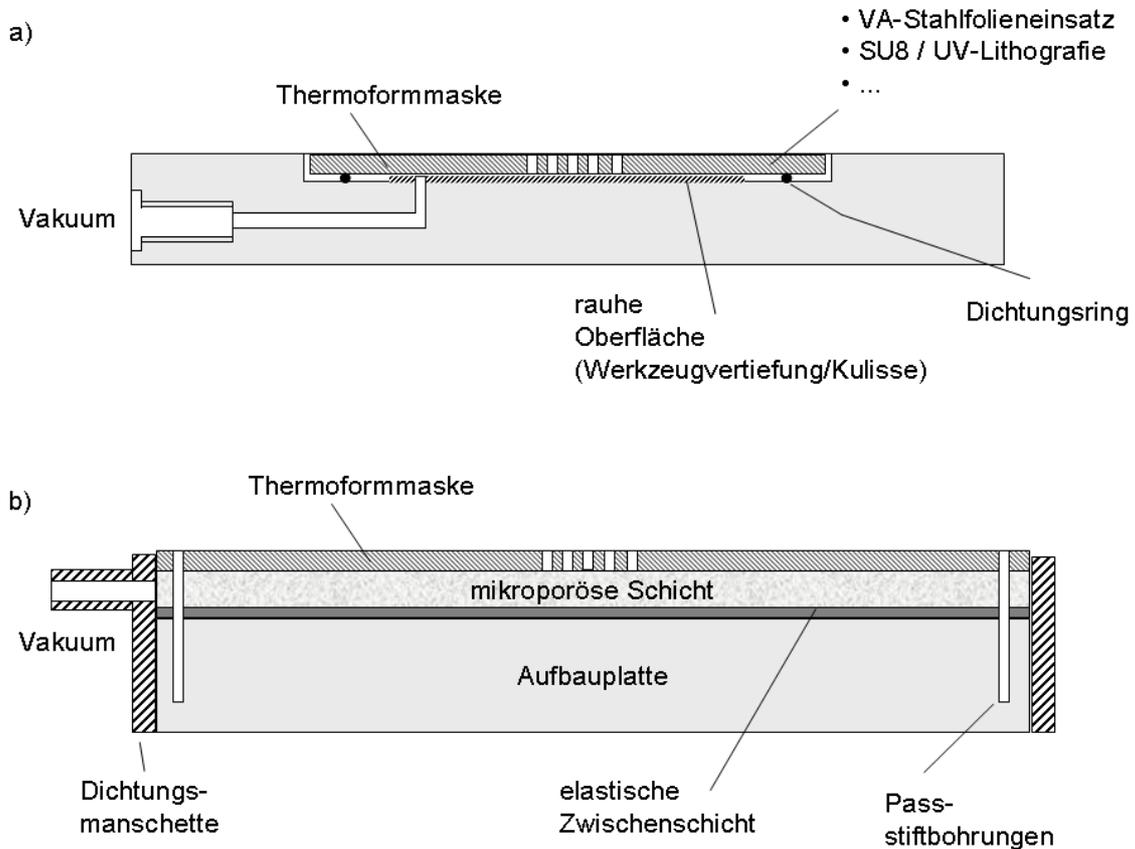


Abb. 3-26 Schematische Darstellung von möglichen, alternativen Werkzeugkonzepten im Querschnitt für das Mikrothermoformen. (a) Lagerung einer Kulis in einer Vertiefung des eigentlichen Formwerkzeuges. (b) Lagerung einer Kulis auf einer porösen Zwischenschicht.

Trotz dieser Vorteile wurde auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, da neben dem deutlich größeren Herstellungsaufwand des mehrteiligen Werkzeuges unklar war, in wie weit sich z. B. ein solcher mikroporöser Boden im Fall der frittenartigen Grundplatte in die Oberfläche der erwärmten Folie einprägt und möglicherweise ein vorzeitiges Reißen der Folie oder sehr hohe Haftkräfte beim Entformen verursacht. Es ist auch nicht auszuschließen, dass es aufgrund einer unzureichenden mechanischen Festigkeit der Oberflächenstrukturen bzw. des Frittenmaterials durch die regelmäßige Beaufschlagung eines hohen mechanischen Druckes für die Fixierung des Folienhalbzeuges zu einem zunehmenden Setzen der Strukturen und damit zu einem allmählichen Verschließen der offenen Spalten bzw. Poren kommt. Dies würde eine regelmäßige Nachbearbeitung dieser Elemente erforderlich machen.

3.3.4 Mikrothermoformwerkzeug – Geometrie und Herstellung

Das letztendlich realisierte Konzept der Mikro-Thermoformwerkzeuge für die Fertigung von polymeren Zellkulturträgern auf Folienbasis beinhaltete einen möglichst einfachen Aufbau eines dreiteiligen Werkzeuges in Anlehnung an die bereits am IMT vorhandenen Werkzeuge [95]. Das Werkzeug bestand aus einem Formwerkzeug mit einem zentralen Mikrostrukturfeld, einer Gegenplatte mit integrierten Leitungen für das Druckgas und für die Evakuierung und einer in die Gegenplatte eingesetzten elastischen Dichtung. Die Geometrie der kreisrunden, plattenförmigen Werkzeuge aus Messing (Ms58), mit einem Außendurchmesser von 116 mm und einer Dicke von 9 bzw. 12 mm, basierten auf dem Design gängiger Heißprägewerkzeuge bestehend aus Formplatte und Substratplatte, so dass ein einfacher Aufbau auf die temperierbaren Montageplatten einer gewöhnlichen Heißpräganlage möglich war. Die Platten wurden vor der mikrozerspanenden Bearbeitung planparallel gefräst und die Oberfläche besonders sorgfältig geschliffen, so dass eine Parallelität und Ebenheit von max. 3 μm bezogen auf den Plattendurchmesser und ein Mittenrauwert R_A von etwa 0,2 μm erreicht wurde.

In die Mitte der Formplatte wurden danach innerhalb eines 1 cm^2 großen quadratischen Feldes 25 x 25 in Reihen und Spalten angeordnete, zylindrische Mikrokavitäten (Durchmesser 350 μm , Tiefe 300 μm , senkrechte Seitenwand) mikromechanisch gefräst (siehe Abb. 3-27).

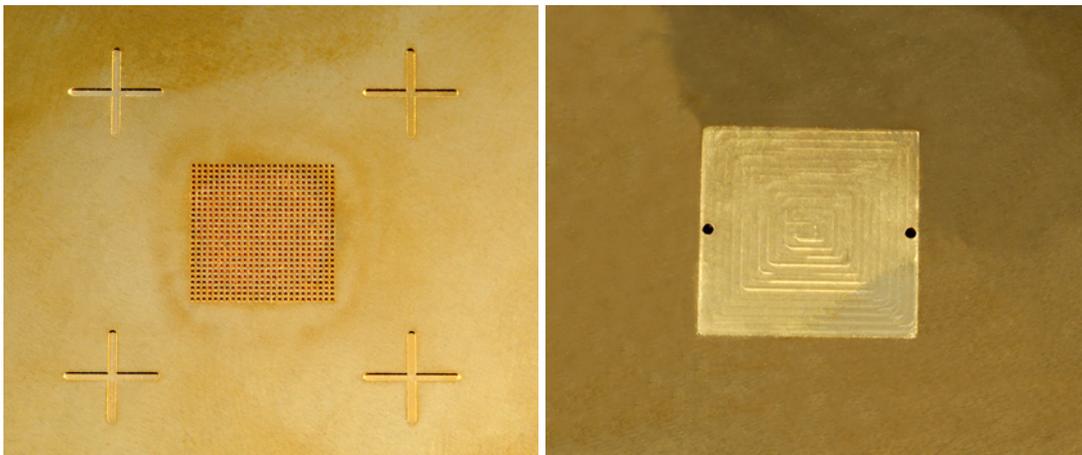


Abb. 3-27 Zentral auf der kreisrunden Formwerkzeugplatte angeordnetes Array von 25 x 25 zylindrischen Mikrokavitäten (links). In den Ecken eines 2 x 2 cm^2 großen Quadrates befand sich jeweils eine Kreuzstruktur, die als Markierung zur Ver- einzelung diente. Im Gegenwerkzeug wurde eine quadratisch geformte Vertiefung mit der Fläche von 15 x 15 mm^2 und einer Tiefe von 10 μm gefräst (rechts). In dieser Tasche sind die beiden Bohrungen für das Evakuieren und die Druckbeaufschlagung zu erkennen.

Aufgrund dieser vordefinierten zylindrischen Geometrie der Mikrokavitäten ergibt sich mit Gleichung 3.2 für den Mikrothermoformprozess folgendes mittleres Oberflächenverstreck- verhältnis R_a :

$$R_a = \frac{A_F}{A_0} = \frac{A_{\text{Seitenwand}} + A_{\text{Boden}}}{A_0} = \frac{4 \cdot s}{d} + 1 = \frac{4 \cdot 300 \mu\text{m}}{350 \mu\text{m}} + 1 = 4,4$$

mit

A : Fläche

d : Durchmesser

s : Tiefe der Kavität

(3.3)

Dieses Verstreckverhältnis liegt etwa im Bereich der für makroskopische Anwendungen angegebenen erreichbaren Oberflächenverstreckverhältnisse thermoplastischer Folien (PMMA \approx 3,4, ABS \approx 5,5, PE-LD \approx 6,0 [113]).

Die Fertigung der Mikrostrukturen erfolgte mit einem monokristallinen Diamantwerkzeug auf einem CNC-Bearbeitungszentrum (Fa. Kern) und wurde von der Arbeitsgruppe Mikrozerspannung des Instituts für Mikroverfahrenstechnik (IMVT, Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt (siehe Abb. 3-28 links). In einem zweiten Design wurden die Seitenwände mit einer Schräge von 5° und die obere Kante der Mikrokavitäten mit einer etwa $20 \mu\text{m}$ breiten 45° Fase versehen (siehe Abb. 3-28 rechts). In die vier Ecken eines $2 \times 2 \text{ cm}^2$ großen, den mikrostrukturierten Bereich umgebenden Quadrates wurden zusätzlich vier, etwa $300 \mu\text{m}$ tiefe Kreuzstrukturen für die spätere Vereinzelung der thermogeformten Zellkulturträger eingebracht.

Die beiden Formwerkzeuge wurden sorgfältig nach der mikromechanischen Bearbeitung im Ultraschallbad gereinigt, bevor sie für den Thermoformprozess benutzt wurden. Eine zusätzliche Oberflächenbearbeitung, beispielsweise durch Elektropolieren, wurde nicht durchgeführt. Restliche Grate an den Rändern der Mikrokavitäten wurden während der ersten Formprozesse mit der Kunststoffolie aus der Form entfernt.

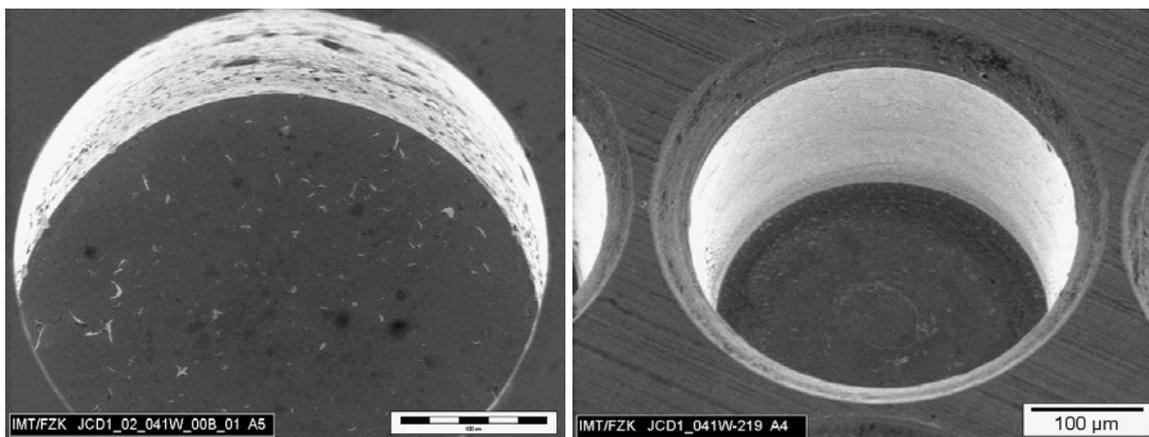


Abb. 3-28 Auf der linken Seite ist eine einzelne Mikrokavität des ersten Mikrothermoformwerkzeuges mit senkrechten Seitenwänden und einem Durchmesser von $350 \mu\text{m}$ dargestellt (Messbalken $100 \mu\text{m}$). Rechts ist eine einzelne Mikrokavität des zweiten Formwerkzeuges mit gleichem Durchmesser und einer Seitenwandschräge von etwa 5° und einer 45° Fase am oberen Rand zu sehen.

In die Gegenplatte wurde eine umlaufende Nut auf einem Radius von 44,5 mm mit einer Tiefe von 3 mm gefertigt, in die eine deutlich über die Oberfläche der Gegenplatte erhabene elastische Dichtung aus Silikon (Elastosil RT 604, Wacker) eingelegt wurde. Dem mikrostrukturierten Bereich der Formplatte gegenüberliegend wurde im zentralen Bereich der Gegenplatte eine quadratisch geformte Vertiefung mit der Fläche von 15 x 15 mm² und einer Tiefe von 10 µm gefräst (siehe Abb. 3-27). Auf diese Weise wurde nicht, wie bei den bisherigen Arbeiten [95], jede einzelne Kavität mit einer eigenen zuführenden Druckleitung versorgt, sondern die Folie wurde durch eine gemeinsame Druckfront in die Mikrokavitäten eingeformt. In diese Vertiefung mündeten zwei senkrechte Bohrungen (Durchmesser 0,8 mm), die wiederum in zwei entgegengesetzt, radial nach außen verlaufende Kanäle endeten. Diese Kanäle wurden jeweils am Plattenrand über ein Gewinde (M6) mit der Druck- bzw. Vakuumentleitung verschraubt. Um eine dichte Verbindung auch bei hohen pneumatischen Drücken zu gewährleisten, wurden die Hochdruckschläuche nicht nur mit der Gegenplatte verschraubt, sondern zusätzlich mit einem hochtemperaturstabilen Epoxidharz (EPO-TEK 377, Epoxy Technology, Inc.) im Gewinde verklebt. In einer dritten parallel zur Oberfläche der Formwerkzeugplatte verlaufenden Bohrung wurde ein Ni-Cr-Ni Thermoelement (Durchmesser 1 mm, Fa. Rössel) zur strukturnahen Temperaturüberwachung und -regelung eingeschoben.

3.3.5 Aufbau einer hochdrucksicheren Thermoformanlage im Labormaßstab

Um ein sicheres Arbeiten bei einem erforderlichen Druckniveau von mehreren 10 bar zu gewährleisten, wurde eine bis maximal 100 bar hochdrucksichere Peripherie aufgebaut. Diese bestand einerseits aus den passiven Elementen fest verlegter Edelstahlleitungen, flexibler Hochdruckschläuche (Hydra) und Hochdruckventile (DruVa). Eine pneumatische Handpumpe (Mecotec GmbH, Typ 8145) und eine 2-stufige Drehschieber-Vakuumpumpe (Leybold), die je durch ein Schutzventil vom Hochdrucksystem entkoppelbar waren, bildeten die aktiven Elemente der Peripherie. Die leckagefreie Verbindung der genannten Elemente erfolgte über Schneidringverschraubungen.

Der benötigte Druck für den Umformprozess wurde entweder aktiv über die Handpumpe erzeugt oder passiv aus einer 200 bar Gasflasche mittels eines Druckminderers (Kayser, Arbeitsdruck max. 100 bar) bezogen. Als Druckgas wurde im aktiven Fall Luft und im passiven Fall Stickstoff verwendet. Stickstoff wurde einerseits wegen dessen Ungefährlichkeit und geringen Kosten gewählt. Andererseits weist es in der Regel in Bezug auf amorphe Thermoplaste einen geringeren Permeationskoeffizienten im Vergleich zu Sauerstoff und Kohlendioxid auf [98]. Weiterhin wird durch die Verwendung eines solchen inerten Gases eine beschleunigte Korrosion der Werkzeugmaterialien verhindert. Der Druck des Arbeitsgases wurde mittels eines geeichten Druckkalibrators (Mecotec GmbH, DP205) innerhalb des Hochdruckbereichs des Systems gemessen. Das Erreichen des benötigten Feinvakuums in der Evakuierungsphase des Prozesses wurde über ein Wärmeleitungsvakuummeter (Thermovac, Leybold) im Niederdruckbereich der Anlage kontrolliert.

Folgende Abb. 3-29 zeigt schematisch die Verknüpfung der einzelnen Elemente untereinander und die Verbindung mit dem auf der Heißpräganlage montierten Thermoformwerkzeug.

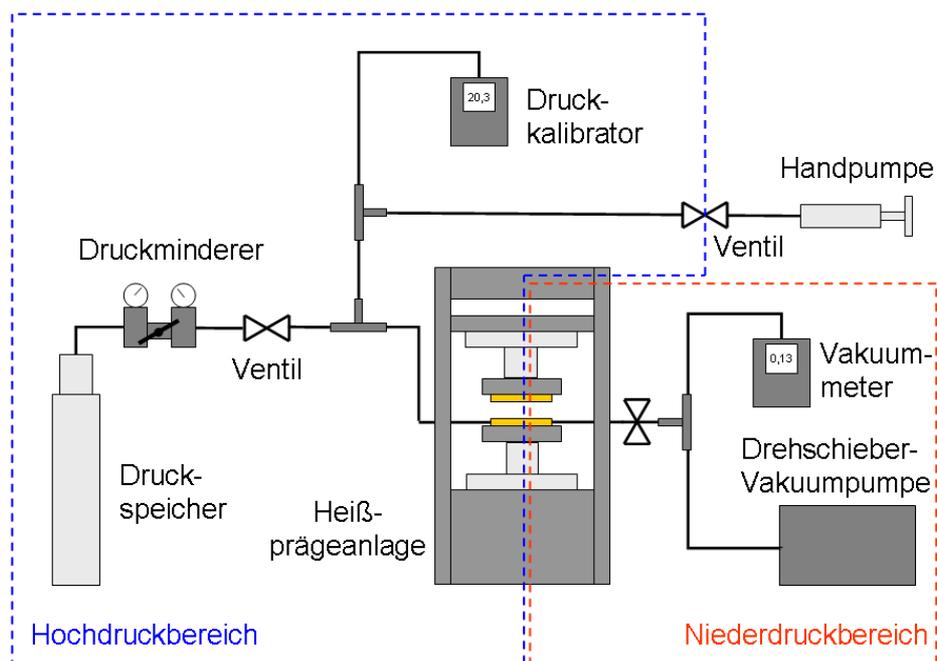


Abb. 3-29 Schematisches Schaltbild der Mikrothermoformanlage. Die Anlage gliederte sich in einen Hochdruck- und einen Niederdruckbereich.

3.3.6 Prozessablauf Mikrothermoformen

Im Folgenden soll der prinzipielle Verfahrensablauf anhand schematischer Abbildungen kurz erläutert werden. Abb. 3-30 zeigt das auf die Heißpräganlage montierte Thermoformwerkzeug in einem geöffneten Zustand. Im schematischen Querschnitt sind im Formwerkzeug die mikromechanisch gefertigten Kavitäten angedeutet. Im Gegenwerkzeug sind die integrierten Vakuum- und Druckkanäle, die gefräste 10 µm tiefe Tasche, sowie die ringförmige elastische Dichtung zu erkennen. Das runde, plattenförmige Formwerkzeug hatte in diesem Ausgangszustand weder Kontakt zum korrespondierenden Gegenwerkzeug noch zum elastischen Dichtungsring.



Abb. 3-30 Schematische Darstellung des geöffneten Werkzeugs im Querschnitt. In diesem ersten Schritt wurde das Folienhalbzeug eingelegt.

In einem ersten Schritt wurde das auf etwa 4 x 4 cm² zugeschnittene Folienhalbzeug auf die Oberfläche des Gegenwerkzeuges zentral aufgelegt, so dass einerseits die vertiefte Tasche vollständig verdeckt und andererseits die Bohrung am Rand des Werkzeuges nicht durch die Folie verschlossen wurde. Anschließend wurde mittels der Drehschieber-Vakuumpumpe die Folie flächig und faltenfrei auf das Gegenwerkzeug angesaugt, ähnlich einer Vakuumspannplatte.

Der zweite Schritt, dargestellt in Abb. 3-31, wurde eingeleitet durch das Schließen des Werkzeuges bis die Formwerkzeugoberfläche mit geringer Kraft auf den Dichtungsring aufsaß. Das Formwerkzeug, der Dichtungsring und das Gegenwerkzeug bildeten so eine geschlossene Kavität, die über die lateral gelegene Bohrung bis in den Bereich eines Feinvakuums evakuiert werden konnte.

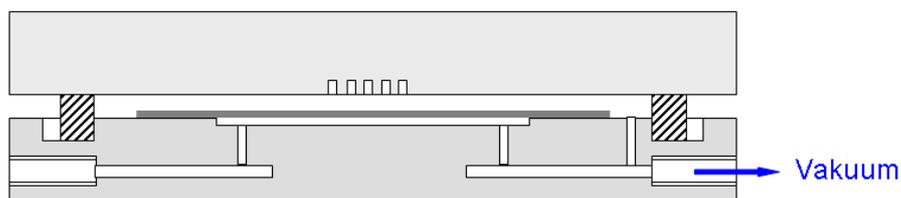


Abb. 3-31 Der zweite Schritt in einer schematischen Darstellung. Das Formwerkzeug und das Gegenwerkzeug bildeten mit Hilfe des Dichtungsringes eine geschlossene Kavität, so dass die Mikrokavitäten evakuiert werden konnten.

In dieser Phase war innerhalb des Werkzeuges eine Trocknung insbesondere der hygroskopischen Halbzeuge möglich. Dazu wurde bei erhöhter Temperatur des Formwerkzeuges und des Gegenwerkzeuges (unterhalb der Erweichungstemperatur des Polymeren) über einen entsprechend langen Zeitraum evakuiert. Die Dauer dieser Vorkonditionierung lag in einem Bereich von etwa 5 bis 60 min, je nach Höhe der Trocknungstemperatur und je nach der relativen Luftfeuchtigkeit der Lagerungsstätte der Halbzeuge.

Die beiden plattenförmigen Werkzeugteile wurden im folgenden Schritt (siehe Abb. 3-32) vollständig geschlossen, so dass die Folie mit hoher Kraft (ca. 60000–80000 N) zwischen den Platten fixiert wurde.

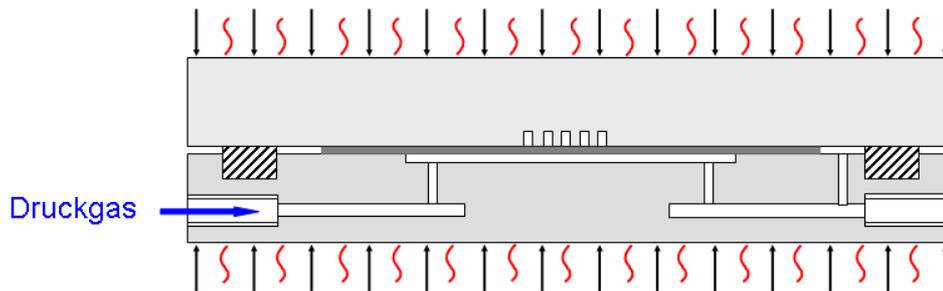


Abb. 3-32 Im dritten Schritt wurden die beiden Platten aufeinander gepresst, so dass die Folie fixiert wurde und gleichzeitig auf Umformtemperatur geheizt werden konnte. Durch das Anlegen eines Druckgases wurde die erwärmte Folie umgeformt.

Das gesamte Werkzeug wurde danach auf Umformtemperatur erwärmt. Anschließend wurde die Verbindung zur Vakuumpumpe durch das Schließen eines werkzeughenen Ventils unterbrochen und das druckseitige Ventil geöffnet. Dadurch wurden sowohl die Leitungen als auch die Tasche im Gegenwerkzeug mit einem Druckgas beaufschlagt. Die Druckdifferenz zwischen den auf der einen Seite der Folie befindlichen evakuierten Mikrokavitäten des Formwerkzeuges und dem Gasdruck auf der Seite des Gegenwerkzeuges führten zu einer Verstreckung der am Rand fixierten Folie in diese Kavitäten unter Ausdünnung dessen Ausgangswanddicke.

Im letzten Schritt des Mikrothermoformprozesses erfolgte die Kühlung des Werkzeuges und damit auch der verstreckten Folie mindestens 20 K unter die Glasübergangstemperatur bei amorphen und 20 K unter die Kristallitschmelztemperatur bei teilkristallinen Thermoplasten. Bei dieser Temperatur ist die Folie in ihrer Form bereits ‚eingefroren‘, so dass der Gasdruck über ein Belüftungsventil abgebaut werden konnte (siehe Abb. 3-33).

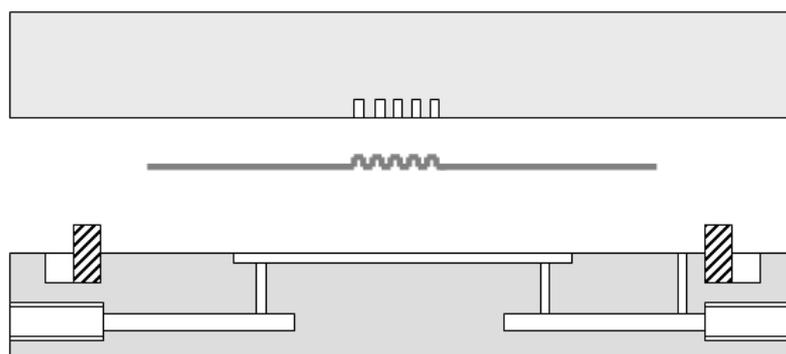


Abb. 3-33 Im letzten Schritt erfolgte das Kühlen des Aufbaus, der Abbau des Druckgases und schließlich die Entformung des mikrostrukturierten Folienkörpers.

Schließlich wurde bei Erreichen des Atmosphärendruckes das Werkzeug wieder geöffnet und die dünnwandige, mikrostrukturierte Folie konnte entformt werden.

3.3.7 Charakterisierung der Folienhalbzeuge

Eine Auswahl der verwendeten amorphen Polymere wurde durch eine Differential-Kalorimetrie (DSC) charakterisiert. Diese Methode dient im Wesentlichen der Bestimmung der Glasübergangstemperatur. Ist die Lage dieser Temperatur eines amorphen Thermoplasten bekannt, so kann dessen Verarbeitungsfenster für das Thermoformen, das häufig nur einen schmalen Temperaturbereich in der Nähe der Glasübergangstemperatur darstellt, deutlich schneller bestimmt werden.

Mittels der DSC wurden folgende thermoplastische Folien untersucht:

- Polystyrol PS (NSW, Norflex, Dicke 50 μm , biaxial orientiert)
- Polycarbonat PC (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI, Dicke 50 μm , isotrope Gießfolie)
- Cycloolefinpolymer COP (Zeonor, ZF 14-50, Dicke 50 μm , nicht orientiert)

Die thermoplastischen Folien wurden in Anlehnung an ISO 11357-3 (NETZSCH DSC 204 Phoenix[®]) thermoanalytisch charakterisiert. Dabei wurden jeweils zwei Heizzyklen mit einer Heizrate von 10 K/min in einem Temperaturbereich von 50 °C bis 150 °C für PS, 110 °C bis 210 °C für PC und 85 °C bis 185 °C für COP durchgeführt (siehe Abb. 3-34 – Abb. 3-36).

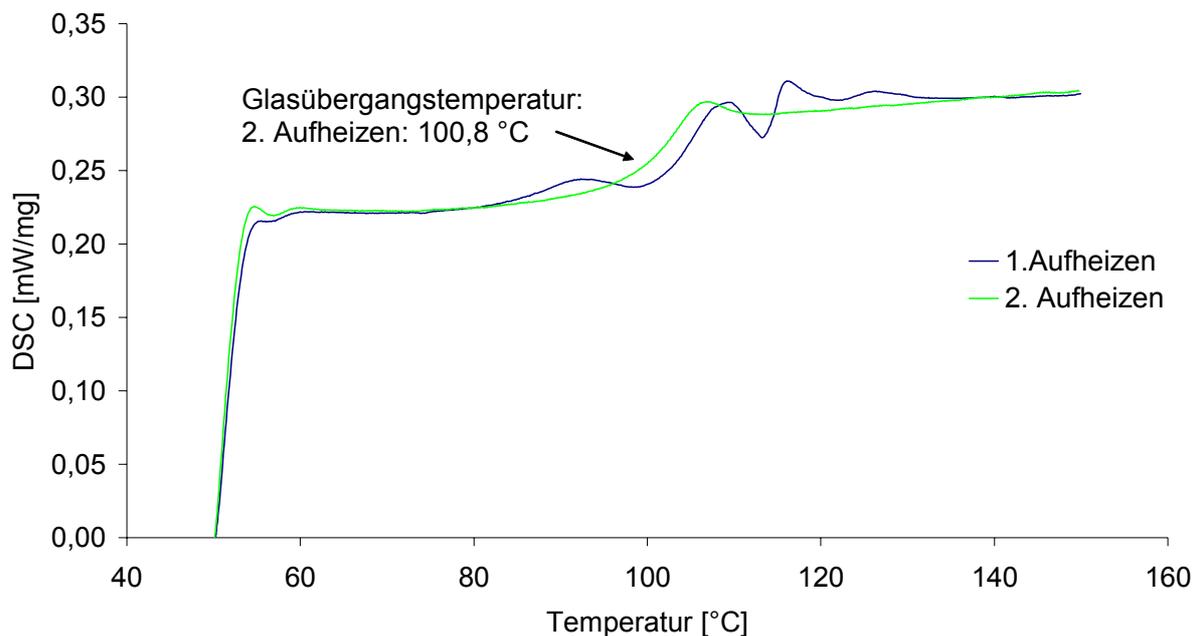


Abb. 3-34 DSC der 50 μm dicken Polystyrolfolie (NSW, Norflex, biaxial orientiert).

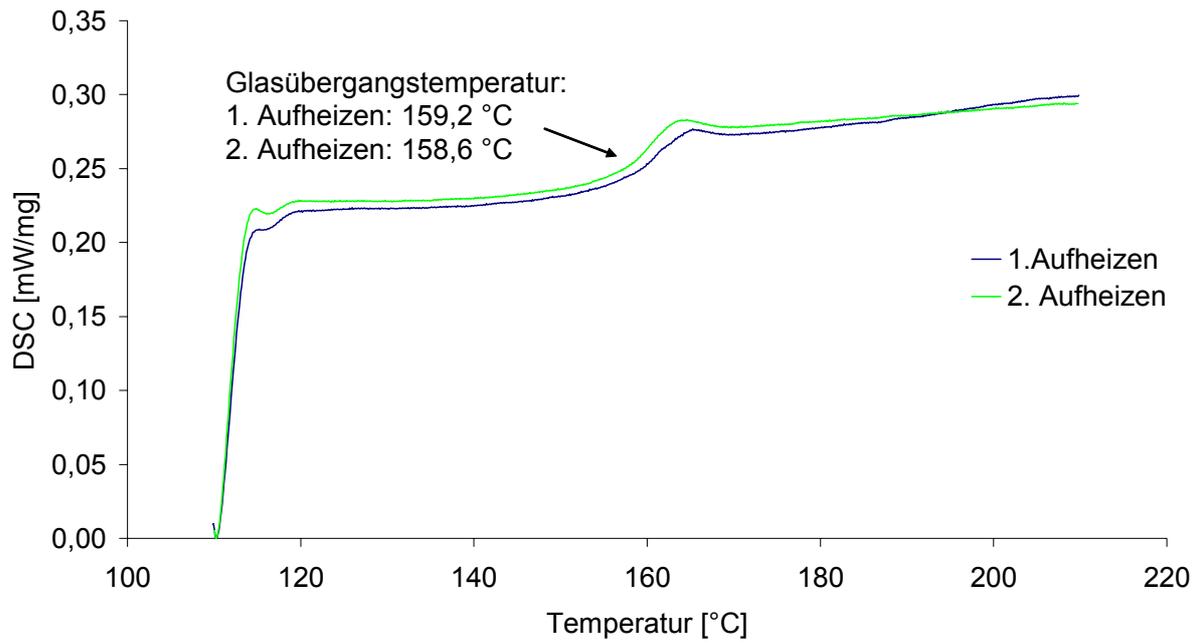


Abb. 3-35 DSC der 50 µm dicken Polycarbonatfolie (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI, isotrope Gießfolie).

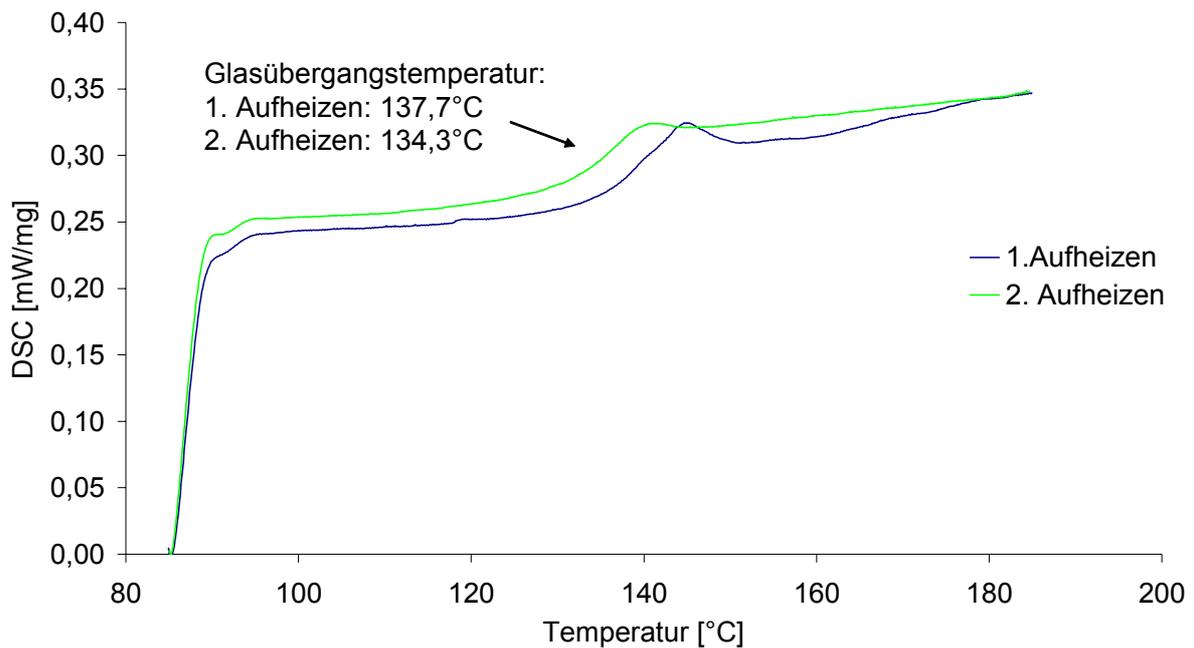


Abb. 3-36 DSC der 50 µm dicken Cycloolefinpolymerfolie (Zeonor, ZF 14-50, nicht orientiert).

Im Fall des PS treten im ersten Heizzyklus größere Schwankungen im Temperaturbereich von etwa 110 °C bis 130 °C auf. Diese sind sehr wahrscheinlich auf Desorientierungsvorgänge des ursprünglich biaxial orientierten Materials zurückzuführen [98], da sie im zweiten Heizzyklus nicht mehr auftreten. Mit einer geeigneten Software (Netzsch Proteus Thermal

Analysis; Version: 4.1.2) wurden für die drei Folientypen die in Tab. 3-1 dargestellten Glasübergangstemperaturen bestimmt.

Tab. 3-1 Mittels DSC bestimmte Glasübergangstemperaturen ausgewählter Kunststofffolien für das Mikrothermoformen

Material	Hersteller	Dicke	Orientierung	Glasübergangstemperatur Mittelwert (1. Zykl./2. Zykl.)
PS (Norflex)	NSW	50 µm	biaxial	101 °C (-/100,8 °C)
PC (Pokalon OG 461 GI)	LoFo High Tech Film GmbH	50 µm	keine	159 °C (159,2 °C/158,6 °C)
COP (ZF 14-50)	Zeonor	50 µm	keine	136 °C (137,7 °C/134,3 °C)

3.3.8 Mikrothermogeformte Zellkulturträger

In mehreren Versuchsreihen wurden für verschiedene Folienhalbzeuge die Parameter, des in Kapitel 3.3.6 beschriebenen Prozessablaufs, ermittelt. Die Folien wurden vor dem Prozess keiner speziellen Reinigungsprozedur unterzogen, da die Folien innerhalb eines Reinraumzettes nahezu staubfrei gelagert wurden. Dennoch wurden sie nach dem Zuschneiden zu Folienstücken mit einer Fläche von etwa 4 x 4 cm² und unmittelbar vor dem Einbau ins Werkzeug beidseitig mit Stickstoff abgeblasen. Im halbgeschlossen Werkzeug wurden die Folienhalbzeuge in einem Temperaturbereich von etwa 20–80 K unterhalb ihrer jeweiligen Glasübergangstemperatur bei gleichzeitigem Evakuieren vorgetrocknet. Die Dauer dieser Vorkonditionierung variierte dabei von einigen wenigen Minuten bis etwa eine Stunde.

Folgende Abb. 3-37 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mikrothermogeformten Zellkulturträgers im Querschnitt aus PS (NSW, Dicke 25 µm), der mit einem Thermoformwerkzeug, dessen Formkavitäten mit senkrechten Seitenwänden ausgestattet waren, gefertigt wurde. Die Ausformtiefe der bei 114 °C und mit 42 bar geformten Kavitäten betrug etwa 240–260 µm. Die Grate und Verunreinigungen resultierten aus der Schnittbearbeitung.

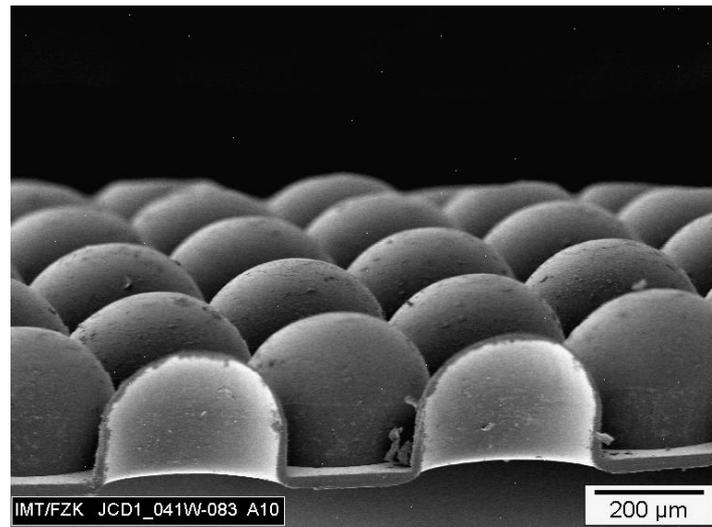


Abb. 3-37 REM-Aufnahme eines Querschnitts durch einen, bei 114 °C und mit 42 bar, mikrothermogeformten Zellkulturträger aus PS (Foliendicke 25 µm). Der Zellkulturträger ist kopfüber abgebildet, so dass die Kavitäten nach unten geöffnet sind.

Eine höhere Ausformtiefe konnte zwar durch eine Steigerung des pneumatischen Druckes erreicht werden, jedoch konnte mit zunehmender Ziehtiefe eine zunehmende Anzahl an Kavitäten beobachtet werden, deren Böden eingebault waren (siehe Abb. 3-38).

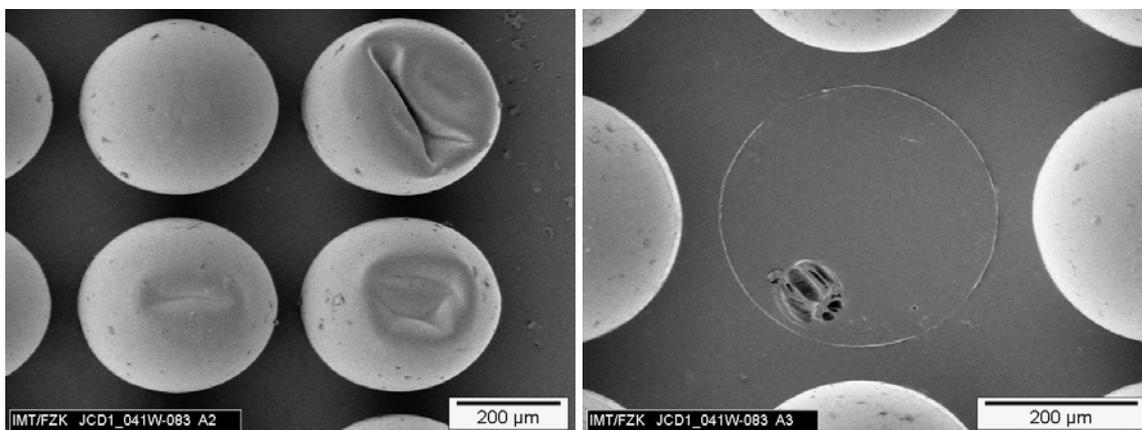


Abb. 3-38 REM-Aufnahmen von aufgetretenen Schäden an mikrothermogeformten Zellkulturträgern (PS, Foliendicke 25 µm). Mit zunehmender Einförmtiefe traten gehäuft eingebaulte Mikrokavitäten (links) oder Mikrorisse auf (rechts).

Des Weiteren konnte bei Drücken oberhalb 40 bar ein zunehmendes Auftreten von Mikrorissen beobachtet werden, die zu einem völligen Prozessversagen für die betroffenen Kavitäten führte (siehe Abb. 3-38). Hierbei war bemerkenswert, dass die einzelnen Kavitäten durch die mittels des pneumatischen Druckes an das Formwerkzeug angepresste Folie zueinander abgedichtet waren, so dass trotz eines Auftretens von Rissen der Umformprozess in direkt benachbarten Kavitäten nur geringfügig beeinträchtigt wurde. Eine Steigerung der Prozesstemperatur, um eine höhere Ausformtiefe zu erzielen, führte zu einer zu starken Haftung des

Polymers am Werkzeug, so dass eine zerstörungsfreie Entformung des Zellkulturträgers nicht mehr möglich war.

Sowohl das Einbeulen als auch das Reißen der Folie im Bereich der Kavitäten stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer durch die Ausdünnung während des Verstreckvorgangs erzeugten zu geringen Foliendicke. Die Risse sind höchstwahrscheinlich auf ein strukturelles Versagen, aufgrund zu großer Verstreckverhältnisse, zurückzuführen. Das Einbeulen der Kavitäten könnte möglicherweise eine Folge auftretender Kräfte während des manuellen Entformvorgangs sein. Eine weitere mögliche Erklärung dafür könnte auch das Entstehen eines pneumatischen Druckes sein, der durch die Einengung eines durch die erwärmte Folie permeierten Gasvolumens in der Kavität des Formwerkzeuges erzeugt wird. Eine Druckentlastung könnte so zu einer Umkehrung der Druckverhältnisse über der Folie und somit insbesondere bei sehr dünn verstreckten Folien zu einem Einbeulen der Formkörper führen.

Eine inhomogene Wanddickenverteilung resultiert im Allgemeinen daraus, dass eine (biaxiale) Verstreckung im Wesentlichen nur in den Bereichen der Folie stattfindet, die keinen Kontakt zur Werkzeugoberfläche haben. Als Gegenmaßnahme werden beim makroskopischen Thermoformprozess vorzugsweise Verstreckhilfen verwendet, wie z. B. das pneumatische oder mechanische Vorstrecken. Durch die Ausbildung einer homogeneren Wanddickenverteilung werden extrem dünn verstreckte und damit mechanisch instabile Bereiche vermieden. Eine Übergangslösung und einfacher zu realisierende Maßnahme für das Mikrothermoformen stellt jedoch die Verwendung dickerer Folienhalbzeuge dar, um eine im Verhältnis größere Wanddicke bei gleichen lokalen Verstreckverhältnissen zu erzielen. Die Verwendung dickerer Folienhalbzeugen führte zu einer deutlichen Reduzierung der Anzahl beschädigter Kavitäten. Abb. 3-39 zeigt eine einzelne Mikrokavität eines aus einer 50 µm dicken COP-Folie gefertigten Zellkulturträgers von der Rückseite. Anhand von Transmissionsmessungen an einem IR-Spektrometer (FT IR-Spektrometer Bruker IFS 88) wurde die Foliendicke im Bodenbereich auf etwa 5–10 µm abgeschätzt.

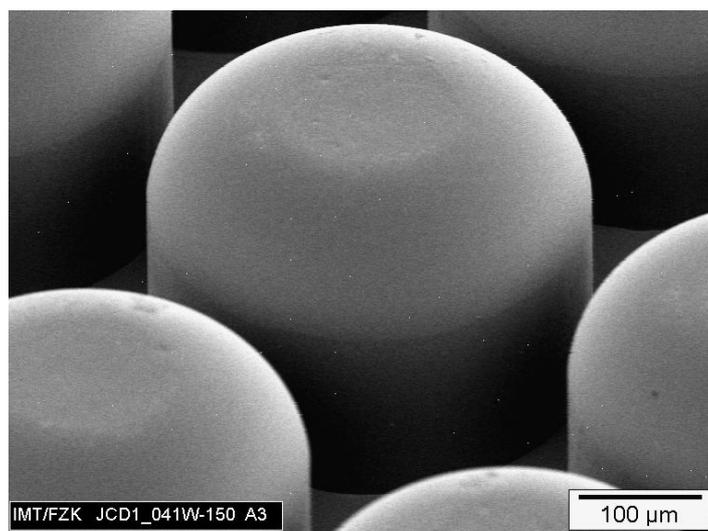


Abb. 3-39 REM-Aufnahme der Rückseite einer Mikrokavität eines mikrothermogeformten Zellkulturträgers aus COP (Foliendicke 50 µm).

Um jedoch das Einbeulen von Kavitäten vollständig zu vermeiden, wurde ein zweites Thermoformwerkzeug mit einer 5° Entformschräge über die gesamte Höhe der Seitenwand und einer 20 µm breiten 45° Fase am oberen Rand der Kavitäten verwendet (siehe Kapitel 3.3.4). Dadurch konnte nach subjektivem Empfinden eine deutliche Reduzierung der auftretenden Kräfte während des Entformens erzielt werden und ein schadfrees Entformen wurde ermöglicht. Eine reproduzierbare Methode zur Quantifizierung der Entformkräfte wurde nicht entwickelt, da sich dies aufgrund des sehr dünnen und flexiblen Folienmaterials als sehr komplexes Problem darstellte. Die Verwendung eines Folien-Spannrahmens könnte hier eventuell einen Ansatz zur Messung der Entformkräfte bieten.

Die Seitenwandschräge und die Fase führten zu keiner sichtbaren Beeinflussung der Wanddickenverteilung. Die minimale Foliendicke eines mit einer 50 µm dicken PC-Folie mikrothermogeformten Zellkulturträgers, dessen Kavitäten 300 µm tief eingeformt wurden, lag ebenfalls in einem Bereich von etwa 5–10 µm (siehe Abb. 3-40). Aufgrund der stark inhomogenen Wanddickenverteilung ist im Querschnitt sogar ein kleiner Hinterschnitt im Inneren der Kavitäten zu sehen (Ω-Struktur [95]). Durch die Verwendung entsprechend dickerer Folienhalbzeuge könnte diese Eigenschaft noch verstärkt werden und für verschiedene Anwendungen genutzt werden. Eine mögliche Anwendung könnte die hier vorgestellte Zellimmobilisierung sein. Dabei könnten einzelne Zellen durch eine englumige Öffnung in die Mikrokavitäten gesät werden, während die aggregierten Zellen die Kavitäten nicht mehr auf diesem Wege verlassen können.

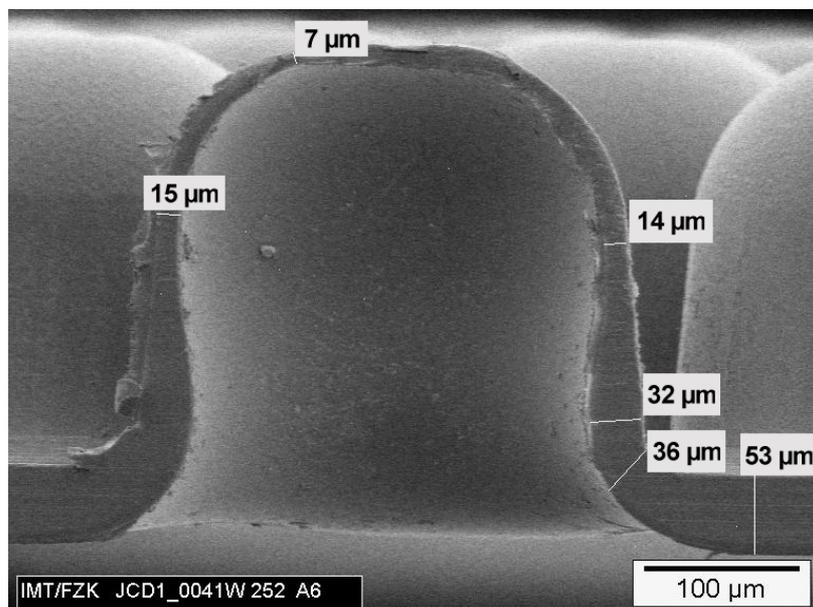


Abb. 3-40 Querschnitt eines, mit einer 50 µm dicken PC-Folie, mikrothermogeformten Zellkulturträgers (REM). Die Kavitäten wurden bei 171 °C Umformtemperatur und 53 bar etwa 300 µm tief eingeformt. Die gemessene Wanddicke variiert in einem Bereich von etwa 7–50 µm.

Folgende Tab. 3-2 zeigt das letztendlich ermittelte Verarbeitungsfenster hinsichtlich der Umformtemperatur für die drei Folienhalbzeuge PS, PC und COP. Der Bereich der Umformtemperatur lag für alle drei Thermoplaste etwa 5–10 °C über den ermittelten und in Tabelle 3-2 angegebenen Glasübergangstemperaturen.

Tab. 3-2 Umformtemperaturen für die drei verwendeten Thermoform-Halbzeuge

Material	Hersteller	Dicke	Orientierung	Umformtemperatur
PS (Norflex)	NSW	50 μm	biaxial	110–114 °C
PC (Pokalon OG 461 GI)	LoFo High Tech Film GmbH	50 μm	keine	165–170 °C
COP (ZF 14-50)	Zeonor	50 μm	keine	140–143 °C

3.3.9 Mikroperforation

3.3.9.1 Mikroperforationsverfahren für mikrothermogeformte Zellkulturträger

Die Geometrie und die Ausgestaltung der mikrothermogeformten Zellkulturträger, wie sie im vorigen Kapitel 3.3.8 zu sehen waren, erfordern analog zum herkömmlichen Herstellungsprozess eine Mikroperforation der Mikrocontainer, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Medium und Gasen zu gewährleisten. Die Porengröße muss dabei je nach Zellkulturanwendung in einem Bereich von etwa 1–10 μm einstellbar sein.

Mikrothermogeformte Zellkulturträger besitzen den Vorteil, dass es sich bei diesen Mikrokapazitäten nicht um vergrabene Strukturen handelt, d. h. die Kavitäten werden von sehr dünnen Wänden gebildet und sind nicht, wie dies bei spritzgegossenen oder heißgeprägten Zellkulturträgern der Fall ist, in Vollmaterial eingepreßt. Aufgrund des Verstreckens der thermoplastischen Folien in eine Negativform ist besonders der Bodenbereich der thermogeformten Kavitäten sehr dünnwandig, so dass dies den meisten gängigen Mikroperforationsmethoden entgegenkommen sollte.

Die in Tab. 3-3 aufgeführten Verfahren werden derzeit auch industriell genutzt, um perforierte Membranen mit einer Porengröße im Bereich von einigen 100 nm und bis zu 10 μm herzustellen. Nur zwei dieser Verfahren nutzen wie das Mikrothermoformen dünne Kunststofffolien als Halbzeugformat. Die Erzeugung mikroperforierter Membranen durch die Verstreckung extrudierter Polymerfilme könnte insofern mit dem Mikrothermoformen kombiniert werden, als durch den formgebenden Verstreckprozess gleichzeitig die Poren in der Membran erzeugt werden. Ein solcher Prozess wäre einerseits hinsichtlich der Porengröße wahrscheinlich schwer zu kontrollieren und andererseits müsste ein vorzeitiges Stoppen bzw. Zurückschnappen der erwärmten Folie durch das Fluten der evakuierten Mikrokapazitäten des Formwerkzeuges durch das Aufreißen der Folie verhindert werden. Eine Methode, die deutlich einfacher mit dem Mikrothermoformen kombiniert werden kann, ist die Ionenspurtechnologie. Dieses Verfahren wird seit vielen Jahren industriell genutzt, um beispielsweise flache Mikrofiltrationsmembranen für die unterschiedlichsten Anwendungen in großer Menge bzw. Stückzahl zu produzieren. Kommerziell nutzbare Anlagen stehen für diese Zwecke weltweit zur Verfügung [115]. Andererseits können mit dieser Methode Poren mit einem

definierten Durchmesser in einem Bereich von einigen wenigen Nanometern bis zu einigen wenigen Mikrometern bei gleichzeitig sehr hohen Porendichten erzeugt werden.

Tab. 3-3 Industriell genutzte Verfahren zur Herstellung mikroperforierter Membranen (verändert nach [116])

Herstellungsverfahren	Porengröße	Ausgangsmaterial	Anwendung
Press- und Sinterverfahren	0,1–20 µm	Pulver (Keramik, Metall, Polymer)	Mikrofiltration
Ionenspurtechnologie	0,02–10 µm	Kunststofffolien (z. B. PC, PET)	Mikrofiltration
Verstreckung extrudierter Polymerfilme	0,5–10 µm	Kunststofffolien (z. B. PE, PTFE)	Mikrofiltration
Phaseninversion	2 nm–5 µm	Polymerlösung	Mikrofiltration, Ultrafiltration, Sterilisation

3.3.9.2 Ionenspurtechnologie

Die Ionenspurtechnologie basiert auf der Erzeugung irreversibler struktureller Veränderungen eines Materials entlang der Trajektorie eines das Material durchdringenden einzelnen schweren, energiereichen Ions [115,117]. Der erzeugte modifizierte Bereich umfasst dabei eine zylinderförmige Kernzone mit einem Durchmesser in der Größenordnung von etwa 10 nm und eine periphere Randzone mit einem Durchmesser bis zu 1 µm. Der Durchmesser ist bestimmt durch die Reichweite ausgelöster atomarer und elektronischer Kollisionskaskaden, die beispielsweise zu Bindungsbrüchen oder zu Veränderungen von Kristallstrukturen führen können. Die strahleninduzierte Modifikation im Material wird als latente Spur bezeichnet. Je nach Materialdicke des Targets und je nach Energie des beschleunigten Ions (keV–GeV) können diese latenten Spuren das Material entweder vollständig durchziehen oder die Ionen werden in das Material in einer ihrer Reichweite entsprechenden Tiefe implantiert. In Polymeren liegt die Eindringtiefe von Ionen mit hohen Energien (MeV bis GeV) in einem Bereich von etwa 100 µm bis zu einigen Zentimetern. Der Bereich, der im Material angelegten Defekte, besitzt im Vergleich zu den unbestrahlten Bereichen abweichende Materialeigenschaften, wie z. B. eine reduzierte physikalische und chemische Beständigkeit. Diese modifizierten Zonen können daher mit geeigneten Medien selektiv chemisch zu Poren mit einem Aspektverhältnis von bis zu 1:500 bzw. 1:1000 geätzt bzw. entwickelt werden. Die Porendichte wird dabei über die Ionen-Fluenz eingestellt und kann in einem Bereich von etwa 1 bis 10¹⁰ Poren/cm² liegen. Die Poren sind im Allgemeinen statistisch über der eingestrahelten Fläche verteilt, können aber auch unter Umständen an definierten Positionen erzeugt werden. Die Einstellung unterschiedlicher bzw. zeitlich variierender Ätzbedingungen (Zeit, Temperatur, Konzentration etc.) und geeigneter Ionenparameter ermöglicht weiterhin

die Erzeugung sehr verschiedenartiger Porengeometrien. Als polymere Materialien werden in der Regel Polyethylenterephthalat (PET), Polycarbonat (PC) und Polyimid (PI) verwendet [115].

Ausgehend von den verschiedenen Mikroperforationsmethoden, die in Tab. 3-3 genannt werden ist eine Kombination der Ionenspurtechnologie, die industriell seit vielen Jahren zur Herstellung mikroperforierter Folien genutzt wird, und eines folienbasierten Umformprozesses, wie das Mikrothermoformen, zur Fertigung dreidimensionaler, mikroperforierter und dünnwandiger Zellkulturträger besonders nahe liegend, wenn eine kostengünstige Massenfertigung dieser Strukturen angestrebt wird. Weiterhin ermöglicht eine solche Kombination eine größtmögliche Variabilität des Systems hinsichtlich der Porendichte und Porenverteilung bei gleichzeitig sehr exakt einstellbaren Porendurchmessern in einem für die hier vorgesehene Anwendung des Zellkulturträgers sinnvollen Bereich.

Für die Herstellung mikroperforierter Zellkulturträger mittels Ionenspurtechnologie und Mikrothermoformen wurde in ersten Versuchserien die prinzipielle Machbarkeit sowie verschiedene Abläufe der einzelnen Prozessschritte untersucht. Zunächst wurde die Ätzrate für das bestrahlte Material PC (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI, Dicke 50 μm) getestet, um eine exakte Einstellung der Porengrößen an den Zellkulturträgern zu ermöglichen. Eine bekannte mittlere Ätzrate für PC (Makrofol) liegt nach Angaben der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI, Darmstadt) in einer 5 Mol/l NaOH + 10 Vol.% MeOH und bei einer Temperatur von 30 °C etwa bei 12 nm/min. Folgende Abb. 3-41 zeigt eine lineare Annäherung der Ätzrate bei gleichen Ätzbedingungen für die hier verwendete isotrope Gießfolie aus PC, die deutlich unterhalb des Richtwertes für PC (Makrofol) lag. Die Porengrößen wurden in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt.

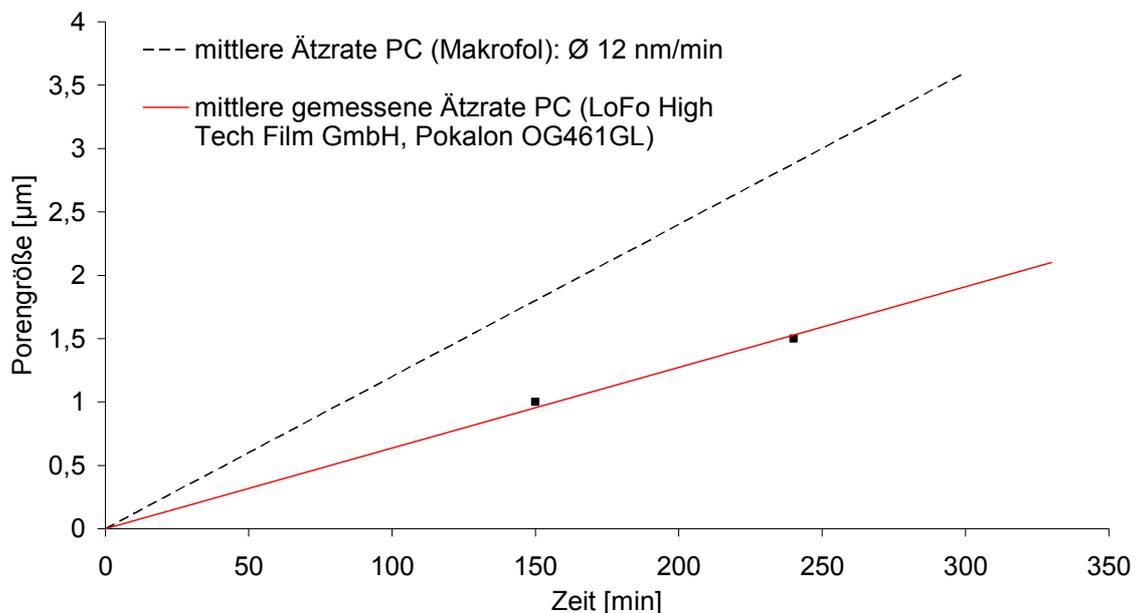


Abb. 3-41 Mittlere gemessene Ätzrate mit 5 Mol/l NaOH + 10 Vol.% MeOH bei 30 °C an, mit Schwerionen bestrahlten, 50 μm dicken PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI). Im Vergleich ist die mittlere Ätzrate von Makrofol angegeben.

In einem ersten Konzept wurden vorgeformte Zellkulturträger aus PC (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI, Dicke 50 μm) mit energiereichen Ionen ($^{132}\text{Xe}^{21+}$, 1460 MeV, Fluenz: 10^6 Ionen/ cm^2) am Beschleuniger UNILAC der GSI bestrahlt und anschließend in der oben beschriebenen Ätzlösung über einen Zeitraum von 6 h und bei einer Temperatur von 30 $^\circ\text{C}$ entwickelt [104]. Der erzielte Porendurchmesser lag etwa bei 2 μm . Abb. 3-42 zeigt einen Ausschnitt der mikroperforierten Kavitäten des entwickelten PC-Zellkulturträgers in einer rasterelektronischen Aufnahme von dessen Rückseite.

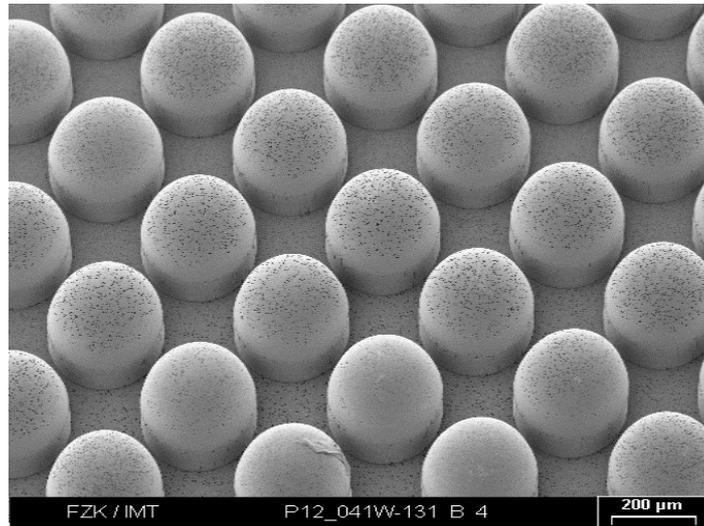


Abb. 3-42 Ansicht der Rückseite eines mikrothermogeformten Zellkulturträgers aus PC (REM). Die Mikroperforation wurde durch einen nachträglichen Ionenbeschuss ($^{132}\text{Xe}^{21+}$, 1460 MeV, Fluenz: 10^6 Ionen/ cm^2) und ein Ätzen der latenten Spuren erzielt (5 Mol/l NaOH + 10 Vol.% MeOH, 6h, 30 $^\circ\text{C}$, Porengröße ca. 2 μm).

In einem vergrößerten Ausschnitt dieses Zellkulturträgers (siehe Abb. 3-43) ist deutlich zu erkennen, dass die Mikrostruktur von ihrer Vorderseite bestrahlt worden ist. Dies ist insofern ungünstig, als bei einer solchen Orientierung die in der gekrümmten bzw. senkrechten Wand auftretenden Streifspuren zu einer ungewollten Oberflächenstrukturierung auf der Innenseite der Kavitäten entwickelt werden und dadurch möglicherweise einen unerwünschten Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen. Durch eine Bestrahlung von der Rückseite könnte ein solcher Effekt vermieden werden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass auch die Bereiche zwischen den Mikrokavitäten perforiert wurden. Eine entsprechende Reduzierung der verwendeten Ionenenergien würde eine selektive Perforation der sehr dünnwandigen, verstreckten Bereiche ermöglichen. Die Ionenspuren in den dickeren nicht- bzw. kaum verstreckten Bereichen wären dadurch nicht durchgehend und würden auf der Rückseite der Folie zu Sacklöchern geätzt werden.

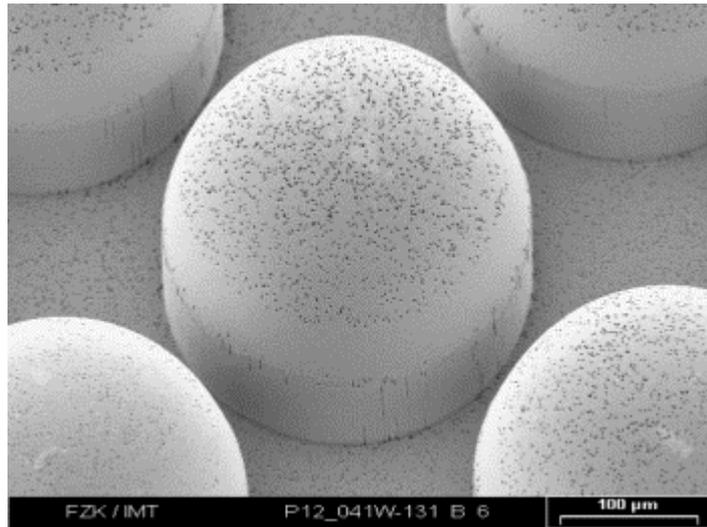


Abb. 3-43 Vergrößerter Ausschnitt einer einzelnen Mikrokavität aus Abb. 3-42 (REM). Im Bereich der nahezu senkrechten Kavitätswände führte der Ionenbeschuss und das anschließende Ätzen zu längs geöffneten ‚Porenkanälen‘.

Ein zweites Konzept verfolgte das Mikrothermoformen von bereits mikroperforierten Membranen. Auf diese Weise wäre eine vollständige Entkopplung der beiden Technologien möglich, so dass der Mikroperforationsschritt unabhängig von einem spezialisierten Industriepartner kostengünstig vor dem formgebenden Schritt durchgeführt werden könnte. Ein solches Konzept war jedoch auf der bestehenden Mikrothermoformanlage nicht auf Anhieb zu realisieren, da für den Umformvorgang mit Gasdruck eine gasdichte Membran benötigt wird. Eine gasdurchlässige, mikroperforierte Membran führt zu einer Flutung der zuvor evakuierten Mikrokavitäten des Formwerkzeuges, so dass sich keine Druckdifferenz ausbilden kann und eine Verstreckung unmöglich wird. Ein Lösungsansatz bestand in einem reversiblen Verschließen der Poren in der Membran beispielsweise durch eine zweite dichte Folie, einer so genannten Druckfolie, die zwischen die Membran und das Gegenwerkzeug eingelegt wird. Dabei wird die Verformung der Druckfolie genutzt, um die perforierte Membran in die Kavitäten zu verstrecken. Nach dem Formvorgang erfolgt die Trennung der Druckfolie von der eigentlich zu strukturierenden Membran.

Aufgrund der teils sehr engen Verarbeitungsfenster der verschiedenen Thermoplaste beim Mikrothermoformen ist es jedoch fast unumgänglich für die Druckfolie das gleiche Material wie für die Membran zu verwenden, um eine ausreichende Verformung dieser ‚Sandwich‘-Struktur zu erreichen. Dies birgt jedoch den Nachteil, dass es im Bereich der Glasübergangstemperatur bzw. Kristallitschmelztemperatur zu einem starken Haften oder sogar zu einem thermischen Verschweißen der beiden Folien kommt. Daher wurde auf die Druckfolie eine dünne Trennschicht aufgebracht, die ein Verbinden der beiden Folien beim Formprozess verhindern sollte. Als Trennmittel können prinzipiell verschiedene Materialien eingesetzt werden. In der Folienindustrie werden beispielsweise Kreide, Siliziumdioxide, Fettsäureamide und mit dem Folienpolymer schlecht mischbare Fremdpolymere bereits beim Folien-Herstellungsprozess eingearbeitet, die als so genannte Antiblockmittel z. B. das Zusammenbacken von zwei übereinander liegenden Folienbahnen verhindern sollen [101]. In der Mikrostrukturtechnik werden beispielsweise Dünnschichten aus Gold als Trennschichten

gegen Si, SiO₂ oder Gläser oder Dünnschichten aus amorphem Kohlenstoff (Ruß) als Trennschicht gegen Si verwendet [16]. Für das Mikrothermoformen eines aus zwei gleichen Folien aufgebauten Stapels wurde an dieser Stelle eine etwa nur wenige 100 nm dicke metallische Trennschicht aus Silber auf die Druckfolie gesputtert (Balzers, Med 010). Danach wurde in einer ersten Versuchsreihe die prinzipielle Machbarkeit eines solchen ‚Sandwichformens‘ im mikroskopischen Maßstab anhand von zwei dichten, lose aufeinander gelegten, gleich dicken Folien gezeigt. Abb. 3-44 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Kavität von dessen Rückseite. Die zu strukturierende Folie wurde bei einer Temperatur von 162 °C und etwa 49 bar bis auf eine Tiefe von etwa 300 µm ausgeformt und die Silbertrennschicht ist aufgrund des Verstreckprozesses inselartig aufgerissen. Die beiden Folien ließen sich somit bei einer etwas niedriger gewählten Temperatur ähnlich gut thermoformen wie eine einzelne PC-Folie bei etwa 167 °C.

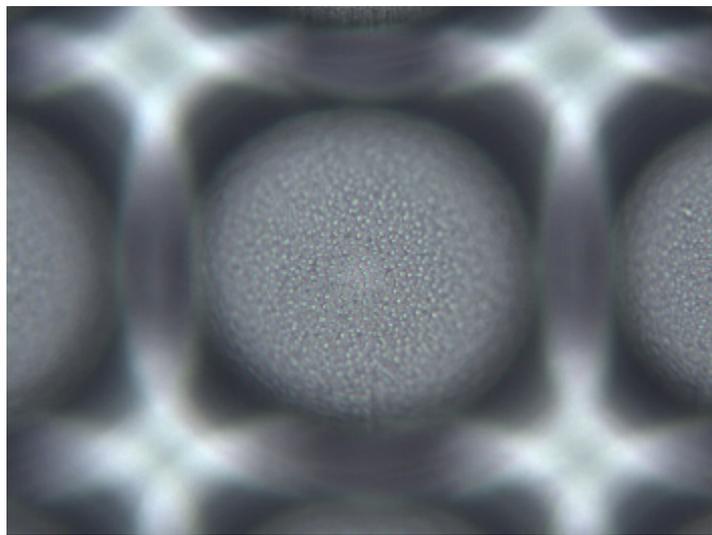


Abb. 3-44 Aufnahme einer einzelnen Mikrokavität eines ‚sandwichthermogeformten‘ Zellkulturträgers von dessen Rückseite vor der Trennung der beiden Folien. Deutlich ist das inselartige Aufreißen der Silbertrennschicht zu erkennen.

Die Druckfolie konnte nach dem Entformprozess mit deutlichem Kraftaufwand per Hand von der zweiten Folie getrennt werden. Der Trennvorgang selbst ist aufgrund der ausgeprägten Wanddickenverteilung der äußeren Folie vergleichbar mit dem Öffnen eines Druckknopfverschlusses. Die Kavitäten der Druckfolie wurden bei diesem Vorgang leicht deformiert, jedoch nicht eingebault (siehe Abb. 3-45).



Abb. 3-45 Seitenansicht einer einzelnen Mikrokavität der Druckfolie nach der Trennung der ‚Sandwich‘-Struktur. Aufgrund des leicht an der Kontur zu erkennenden Hinterschnittes der Strukturen kommt es zu einer Deformation beim Trennvorgang.

Die Kavitäten des Folien-Zellkulturträgers waren nach dem Trennvorgang unbeschädigt, allerdings lassen lichtmikroskopische Aufnahmen darauf schließen, dass sich einerseits die inselartig zerrissene Struktur der Silberschicht in die Innenseite der Kavität eingepreßt hat und andererseits geringe Reste des Silbers am Zellkulturträger haften blieben (siehe Abb. 3-46).

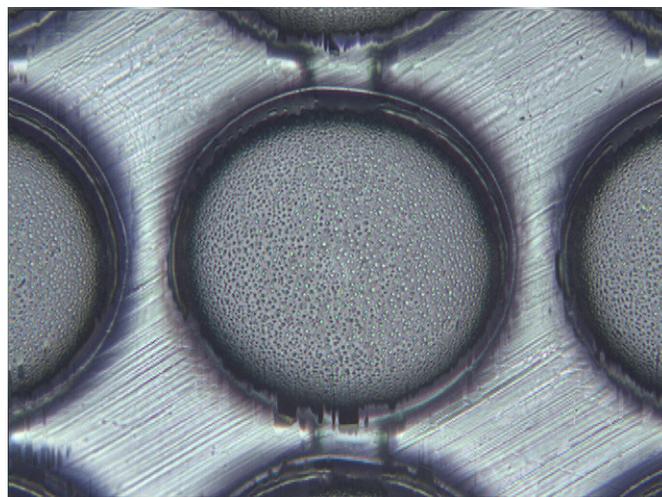


Abb. 3-46 Abbildung einer einzelnen Mikrokavität eines ‚sandwichthermogeformten‘ Zellkulturträgers von der Rückseite nach der Trennung von der Druckfolie.

Auf der Basis dieser Vorversuche, wurden im Anschluss mit Ionenspurtechnik mikroperforierte Membranen in einem solchen ‚Sandwichverfahren‘ mikrothermogeformt. Unstrukturierte, flache PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI, Dicke 50 μm) wurden hierzu senkrecht zu ihrer Oberfläche mit energiereichen Ionen ($^{132}\text{Xe}^{21+}$, 1460 MeV, Fluenz: 10^6 Ionen/ cm^2) am Beschleuniger UNILAC der GSI bestrahlt. Anschließend wurden die Folien in der bereits beschriebenen Ätzlösung (5 Mol/l NaOH / 10 Vol.% MeOH) über einen Zeitraum von 6 h und bei einer Temperatur von 30 $^\circ\text{C}$ entwickelt, so dass sich ein Poren-

durchmesser von etwa $1,5 \mu\text{m}$ einstellte. Diese mikroperforierten Folien wurden zusammen mit einer $50 \mu\text{m}$ dicken silberbeschichteten Druckfolie (siehe oben) in das Thermoformwerkzeug mit Seitenwandschräge und Fase eingeformt. Abb. 3-47 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer solchen mikroperforierten und ‚sandwichthermogeformten‘ PC-Folie von deren Rückseite. Die Poren in der Membran verursachen offensichtlich eine zu starke strukturelle Schwächung der Folie, so dass es durch den Verstreckungsprozess zu einer Aufweitung bzw. zu einem Aufreißen der Poren kommt.

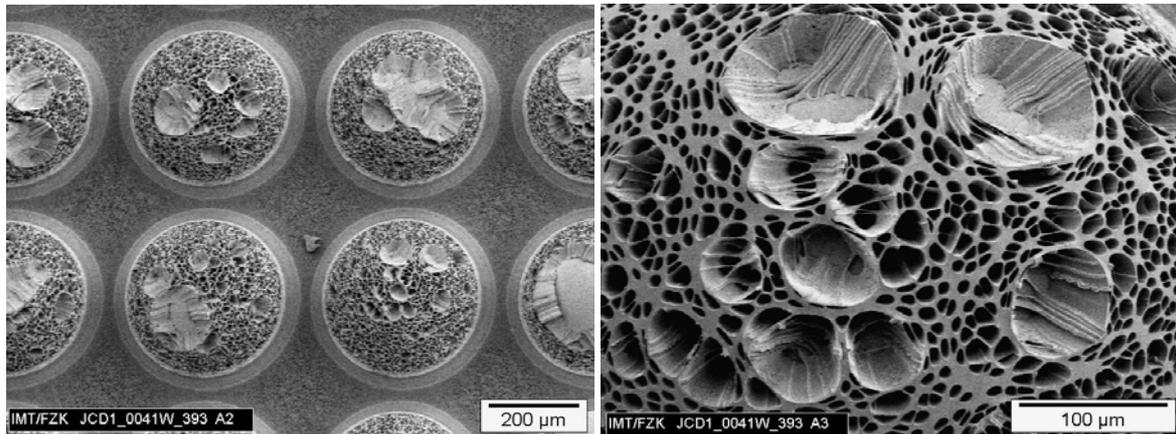


Abb. 3-47 REM-Aufnahmen von der Rückseite einer ‚sandwichthermogeformten‘, mikroperforierten Folie vor der Trennung (Umformtemperatur $162 \text{ }^\circ\text{C}$; Druck: 50 bar; Tiefe: ca. $250 \mu\text{m}$). Das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von der Spitze einer einzelnen Mikrokavität.

Möglicherweise könnte die Gefahr des Versagens der Membran durch die Verwendung von Folien mit geringerer Porendichte und kleinerem Porendurchmesser reduziert werden. Entsprechende Versuche wurden hierzu jedoch nicht durchgeführt, da sich anhand der oben gezeigten Versuchsobjekte zeigte, dass mit einer solchen Bauteilgeometrie mit Hinterschnitt ein nachfolgendes schadfreies Trennen der perforierten von der unperforierten Folie trotz sehr geringer Haftung im Gegensatz zu zwei unperforierten Folien wahrscheinlich nicht möglich ist.

Eine mögliche Alternative für die Verwendung einer Druckfolie könnte das Verschließen der Poren durch eine Substanz darstellen, die selektiv nach dem Formvorgang in einem geeigneten Medium aufgelöst werden kann. Hier könnten eventuell verschiedene Materialien aus der stets wachsenden Gruppe der wasserlöslichen Polymere, wie z. B. Polyvinylalkohole (PVAL), Polyethylenoxide (PEOX), Methylcellulose (MC) oder Polysaccharide (PSAC) Anwendung finden [98], die selbst bei einem nicht vollständigen Auflösen keine Gefährdung für die Zellkultur darstellen würden. Des Weiteren könnte man sich für eine zellbiologische Anwendung auch biologisch abbaubare Polymere als ‚Opfer-Druckfolie‘ vorstellen, so dass eine Porenöffnung erst direkt in der Zellkultur durch Abbau erfolgt. Prinzipiell muss jedoch bei einer solchen Materialkombination ein sich überschneidendes Arbeitsfenster hinsichtlich des Mikrothermoformens gefunden werden, ansonsten muss der Prozess im günstigsten Fall mit deutlich erhöhten Gasdrücken durchgeführt werden. Im ungünstigsten Fall kommt es zu einem vorzeitigen Versagen der Hilfsfolie aufgrund zu niedriger oder zu hoher Verarbeitungstemperaturen.

Ein drittes Konzept umfasst eine vollständig neue Anordnung der einzelnen Prozessschritte der Ionenspurtechnik und des mikrostrukturierenden Verfahrens. Dabei wird eine flache, unstrukturierte Folie aus einem geeigneten, polymeren Material mit energiereichen Ionen bestrahlt, so dass lokal begrenzte Modifikationen in der Tiefe des Materials erzeugt werden. Bevor diese latenten Spuren jedoch zu Poren entwickelt werden, wird die modifizierte Folie im Mikrothermoformprozess zu einer dreidimensionalen Mikrostruktur umgeformt. Erst in einem abschließenden Prozessschritt werden die Poren nasschemisch innerhalb des dreidimensionalen Konstruktes freigeätzt [118]. Diese Verfahrensweise ist nur mit wenigen Materialien zu bewerkstelligen, da in vielen Fällen ein Ausheilen der latenten Spuren im Bereich der Glasübergangs- bzw. Kristallitschmelztemperaturen stattfindet. Eine in der Literatur bekannte Ausnahme stellt das Polycarbonat dar [117], bei dem ein Ausheilen der Spuren erst erfolgt, wenn das Polymer in den Zustand einer viskosen Flüssigkeit übergeht. Da aber das Mikrothermoformen auf einer Umformung des Polymers in seiner viskoelastischen Phase beruht, in der ein materieller Zusammenhalt stets gewährleistet ist, kann in diesem Fall eine Umkehrung der Reihenfolge der Prozessschritte prinzipiell durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass der Schritt der Mikrostrukturierung zeitlich zwischen dem Bestrahlungs- und dem Entwicklungsschritt stattfinden kann. Eine solche Umkehrung ist in Kombination mit anderen typischen Mikroreplikationsverfahren, wie z. B. dem Spritzgießen oder Heißprägen, nicht möglich, da das Polymer hierbei in seine Schmelzphase überführt wird.

Auf dieser Grundlage wurden flache, 50 µm dicke PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI) mit energiereichen Ionen ($^{132}\text{Xe}^{21+}$, 1460 MeV, Fluenz: 10^6 Ionen/cm²) an der Bestrahlungsanlage UNILAC der GSI bestrahlt. Anschließend wurden diese Folien bei einer Temperatur von 80 °C und einem Vakuum von $5,6 \times 10^{-2}$ mbar über einen Zeitraum von 45 min getrocknet, bevor sie mit einer Temperatur von 164 °C und einem Druck von 50 bar mikrothermogeformt wurden. Die Tiefe der Kavitäten betrug etwa 250 µm und es ließ sich kein Unterschied hinsichtlich der Formbarkeit zwischen einer bestrahlten und unbestrahlten Folie feststellen (Abb. 3-48).

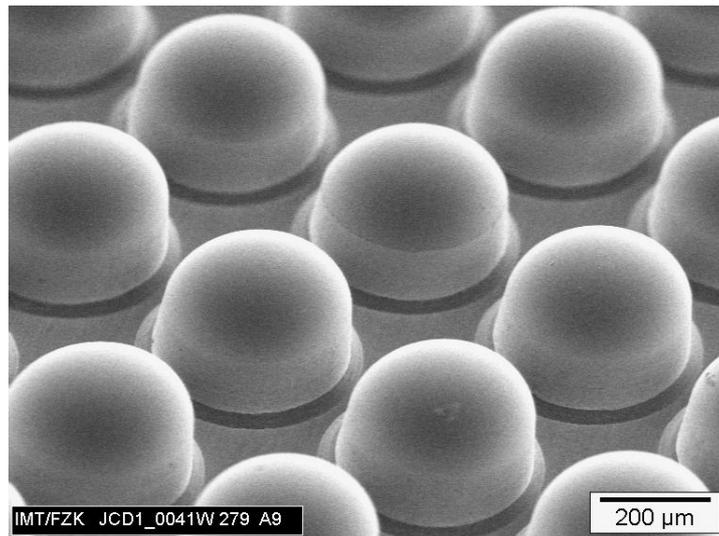


Abb. 3-48 Rückseitige Ansicht (REM) eines mikrothermogeformten Zellkulturträgers (Umformtemperatur 164 °C; Druck 50 bar; Tiefe ca. 250 µm), dessen Folie zuvor mit beschleunigten Ionen bestrahlt wurde ($^{132}\text{Xe}^{21+}$, 1460 MeV, Fluenz: 10^6 Ionen/cm²).

Diese modifizierten und dreidimensional strukturierten PC-Folien wurden nach dem Thermofomprozess nasschemisch in einer Lösung bestehend aus 5 Mol/l NaOH und 10 Vol.% MeOH entwickelt. Abb. 3-49 zeigt einen über 6 h und bei 50 °C geätzten folienbasierten Zellkulturträger von dessen Rückseite. Auf ihr ist deutlich die Beeinflussung der Porendichte durch den Verstreckprozess zu erkennen. Der Bereich der stärksten Verstreckung des Zellkulturträgers weist die geringste Porendichte auf.

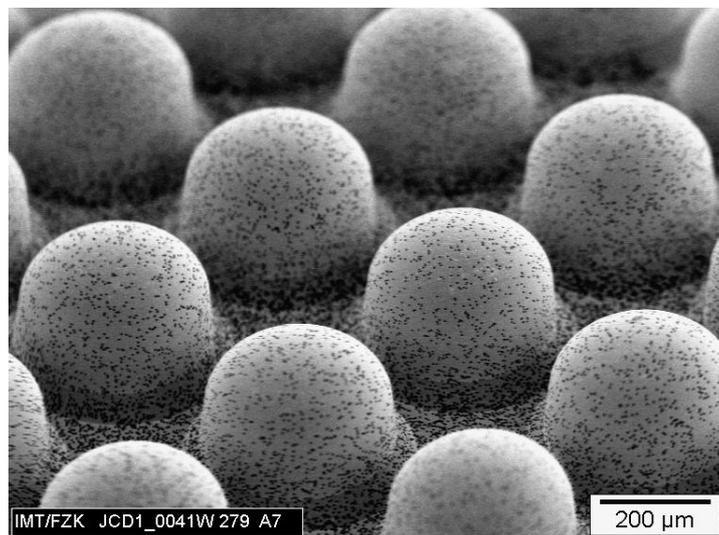


Abb. 3-49 REM-Aufnahme des in Abb. 3-48 dargestellten Zellkulturträgers nach der Entwicklung der Poren (5 Mol/l NaOH + 10 Vol.% MeOH; 6h; 50 °C).

Neben der Porendichte wird auch die Porengröße durch den Verstreckprozess beeinflusst. So wurde bei einem Probenkörper, der über einen Zeitraum von 2 h bei einer Temperatur von 40 °C entwickelt wurde, in den unverstreckten Bereichen zwischen den Kavitäten ein

Porendurchmesser von etwa 400 nm gemessen, während in den stark verstreckten Bereichen der Mikrokavitätenböden mit einem Oberflächenverstreckfaktor von etwa 4 ein Porendurchmesser von etwa 1600 nm ermittelt wurde. Das Verhältnis der beiden Durchmesser zueinander lässt anhand dieser Einzelmessung vermuten, dass sich der lokale Verstreckfaktor direkt proportional in der Änderung des Durchmessers widerspiegelt. Die Bestätigung dieses Zusammenhangs durch statistisch verwertbare Messreihen wurde jedoch nicht durchgeführt.

Der Vorteil einer solchen umgekehrten Anordnung der Prozessschritte ist anhand der nachstehenden Abb. 3-50 eines über 6 h und bei einer Temperatur von 50 °C geätzten Querschnittes eines PC-Zellkulturträgers deutlich zu erkennen.

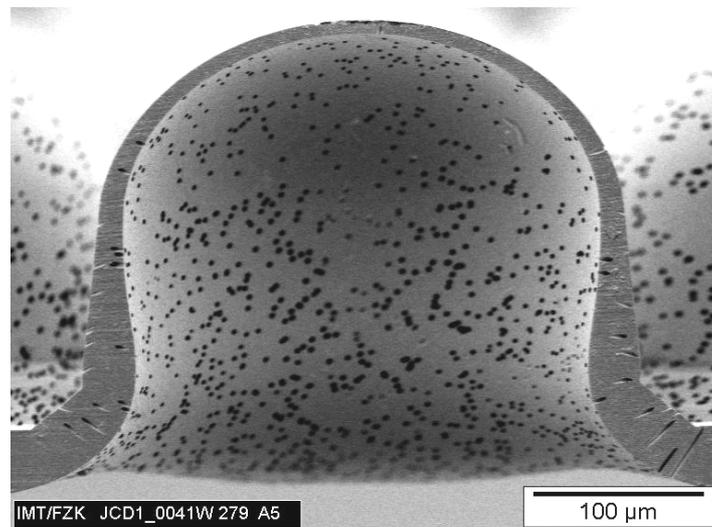


Abb. 3-50 Querschnitt (REM) durch den in Abb. 3-49 bereits gezeigten mikrothermoformierten Zellkulturträger, dessen flache Folie **vor** dem Umformprozess mit beschleunigten Ionen bestrahlt wurde. Die Entwicklung der Poren des Zellkulturträgers erfolgte erst **nach** dem Mikrothermoformen und nach der Erstellung des Querschnittes.

Während bei einer nachträglich durchgeführten Mikroperforation im Wesentlichen der Boden der Mikrokavitäten mit Poren versehen werden kann (vergleiche Abb. 3-42), können bei einer dem Formprozess vorgezogenen Bestrahlung Poren auch in den Seitenwänden der Kavitäten erzeugt werden. Eine solche dreidimensionale, filterartige Mikrostruktur weist somit bei einer ursprünglich vergleichbaren, mittleren Porendichte eine deutlich größere Anzahl von Poren pro Kavität auf. Darüber hinaus ermöglicht die allseitige Mikroperforation eine dreidimensionale Versorgung der immobilisierten Zellen mit Medium, so dass insgesamt wahrscheinlich eine verbesserte Versorgungssituation realisiert werden kann.

Um eine homogene Versorgung der Zellen in solchen Mikrokavitäten erzielen zu können, ist es notwendig, den Einfluss des Verstreckvorgangs beim Mikrothermoformen auf die lokale hydraulische Permeabilität zu kennen. Allgemein kann der mittels eines Druckgradienten getriebene Fluss durch eine poröse Membran nach Hagen-Poiseuille folgendermaßen beschrieben werden [119]:

$$J_V = \frac{r^2 \cdot \varepsilon}{8 \cdot \eta \cdot d} \cdot \Delta p = L_p \cdot \Delta p$$

mit

$$\begin{array}{ll} J_V & : \text{Volumenfluss} \\ r & : \text{Porenradius} \\ \varepsilon & : \text{Porosität} \\ \eta & : \text{Viskosität} \end{array} \quad \begin{array}{ll} L_p & : \text{hydraulische Permeabilität} \\ \Delta p & : \text{Druckdifferenz} \\ d & : \text{Membrandicke} \end{array} \quad (3.4)$$

Die mittlere hydraulische Permeabilität einer Membran setzt sich somit aus folgenden Kenngrößen zusammen:

$$L_p = \frac{r^2 \cdot \varepsilon}{8 \cdot \eta \cdot d} \quad (3.5)$$

In diesem Fall sind jedoch der Porenradius r , die Membrandicke d und die Porosität ε keine konstanten Größen, sondern stellen jeweils eine Funktion in Abhängigkeit des lokalen Oberflächenverstreckverhältnisses R_a dar (siehe Gleichung (3.6)). Unter der vereinfachenden Annahme, dass sich der Porenradius etwa direkt proportional und sich die Dicke der Membran und die Porosität etwa umgekehrt proportional zum lokalen Oberflächenverstreckverhältnis verhalten, ergibt sich für die lokale hydraulische Permeabilität folgende Abhängigkeit von R_a :

$$\begin{aligned} L_p(R_a) &= \frac{r(R_a)^2 \cdot \varepsilon(R_a)}{8 \cdot \eta \cdot d(R_a)} \\ \Rightarrow L_p &\sim R_a^2 \\ \text{mit} & \\ r &\sim R_a \\ d, \varepsilon &\sim \frac{1}{R_a} \end{aligned} \quad (3.6)$$

Dieser Zusammenhang kann unter Umständen zukünftig genutzt werden, um die lokale hydraulische Permeabilität in einer solchen Mikrokavität über den lokalen Verstreckfaktor definiert einzustellen. In den bisher stark ungleichmäßig verstreckten, mikrothermogeformten Kavitäten (siehe Abb. 3-50) sollte aufgrund der Gleichung (3.6) die hydraulische Permeabilität ausgehend vom nahezu unverstreckten Rand bis zu den stärker verstreckten Bereichen am Boden deutlich ansteigen. Diese Verteilung der hydraulischen Permeabilität kommt jedoch vermutlich einer homogenen Versorgungssituation entgegen, da die über der Membran zu durchströmende Zellschichtdicke in diesen Bereichen am größten ist.

3.3.10 Variabilität und Anpassungsfähigkeit mikrothermogeformter Zellkulturträger

Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines vielseitig einsetzbaren Zell- bzw. Gewebekultivierungssystems ist eine hohe Variabilität des Gesamtsystems hinsichtlich verschiedenster Kultivierungsbedingungen und -formen. Dies erfordert Zellkulturträger, die in

hohem Maße an die speziellen Anforderungen der Kultivierung adaptierbar sein müssen. Im Fokus dieser Anpassungsfähigkeit steht insbesondere die topologische und physikochemische Gestaltung der Oberfläche des künstlichen Substrates, die einen wesentlichen Einfluss auf die Adhäsion, die Morphologie und das Verhalten der Zellen nimmt.

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die dreidimensional strukturierten Böden der Zellcontainer die Ausbildung dreidimensionaler Zellaggregate fördert [78]. Daher wurde getestet in wie weit das Mikrothermoformverfahren befähigt ist, Zellkulturträger mit einer auf der Innenseite der Mikrokavitäten ausgestatteten Oberflächentextur bzw. -topologie herzustellen. Hierzu wurden kommerziell erhältliche PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon N49 EM) mit einer einseitigen, statistischen Oberflächenrauigkeit mikrothermoformt, um einen möglicherweise wechselseitigen Einfluss von Oberflächenstruktur und Formprozess zu überprüfen. Die Folie in ihrer ursprünglichen Form ist in einer lichtmikroskopischen Aufnahme in Abb. 3-51 zu sehen.

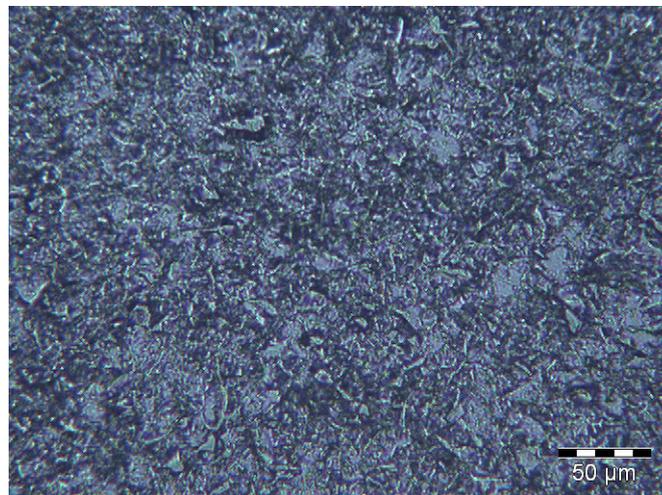


Abb. 3-51 Aufsicht auf eine oberflächenraue PC-Folie (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon N49 EM).

Die Folie wurde 15 Minuten bei etwa 140 °C und einem Druck von ca. 3×10^{-2} mbar im halbgeschlossenen Werkzeug vorgetrocknet. Anschließend wurde sie im geschlossenen Werkzeug bei einer Temperatur von 165 °C und 51 bar Gasdruck in die Negativform verstreckt. Die Mikrokavitäten waren alle bis auf eine Tiefe von etwa 260 µm ausgeformt und die Oberflächenrauigkeit war auch nach dem Formprozess sowohl im Bodenbereich als auch auf den Seitenwänden der Mikrokavitäten zu finden (Abb. 3-52).

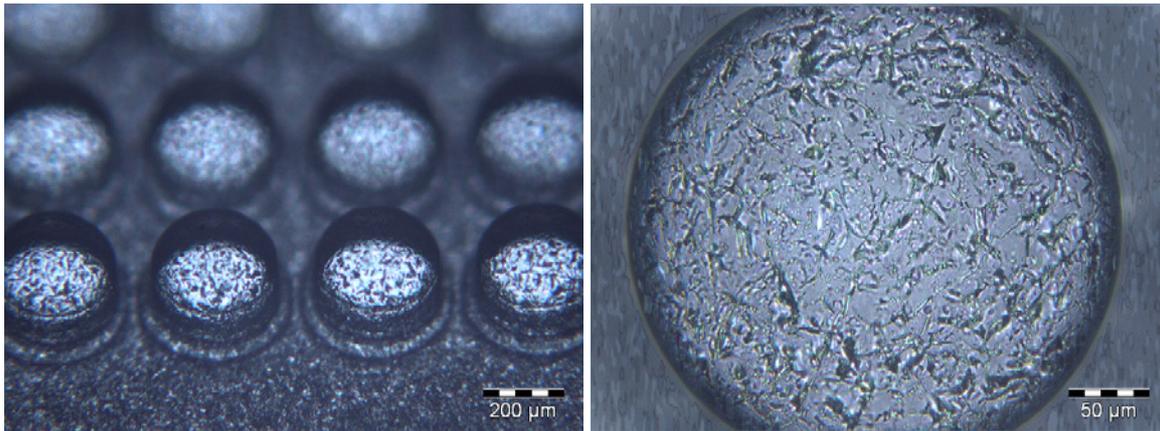


Abb. 3-52 Ein mit der in Abb. 3-51 gezeigten Folie mikrothermogeformter Zellkulturträger (Rückseite). Die Oberflächenrauigkeit wird durch die Verstreckung beeinflusst, bleibt jedoch in allen Bereichen der Wandungen der Mikrokavitäten erhalten (links). Das rechte Bild zeigt eine senkrechte Ansicht einer einzelnen Kavität.

Damit konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Verformung des Thermoplasten im viskoelastischen Bereich eine ursprüngliche Oberflächentextur bzw. -topologie prinzipiell erhalten bleibt. Anhand der Abb. 3-52 (rechts), die einen Ausschnitt aus dem am stärksten verreckten Bereich einer Kavität zeigt, wird jedoch ersichtlich, dass es durch den Verreckprozess erwartungsgemäß zu einer Verzerrung der geometrischen Eigenschaften kommt. Diese kann eventuell durch eine Vorverzerrung kompensiert werden, um eine definierte Oberflächentopologie nach dem Formprozess zu erhalten. Hierzu muss jedoch der Grad der Verzerrung entweder quantitativ in Vorversuchen erfasst oder der Formprozess mit entsprechenden Randbedingungen simuliert werden.

Um einen ersten Anhaltspunkt über die Verteilung der lokalen Verreckfaktoren zu erhalten wurden in einem ersten Ansatz PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI) mikrothermogeformt, die mit einer gemusterten Hilfsstruktur versehen waren. Die Muster wurden vor dem Thermoformprozess durch eine Maske auf die flachen, unstrukturierten Folien gesputtert (Balzers, Med 010). Als Maske diente ein dünnes Nickel-Netzchen (Plano, G248N, 1000 nickel mesh) mit einer Maschenweite von $25 \times 25 \mu\text{m}^2$, das direkt auf die Folie aufgelegt wurde. In einer Dicke von etwa 100 nm wurden auf diese Weise quadratisch geformte Silberflächen mit der Abmessung von etwa $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ erzeugt. Anschließend wurde diese gemusterte Folie im Werkzeug vorgetrocknet (Temperatur: $80 \text{ }^\circ\text{C}$, Dauer: 1 h , Druck: $4,5 \times 10^{-2} \text{ mbar}$) und bei $170 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 50 bar auf eine Kavitätentiefe von $300 \mu\text{m}$ thermogeformt. Im Vordergrund der schräg von der Rückseite aufgenommenen Mikrokavitäten in Abb. 3-53 ist das ursprüngliche Muster der Folie zu sehen. Weiterhin ist die proportionale Zunahme der Verzerrung des Musters mit zunehmendem Verreckfaktor von der Öffnung bis zum Boden der Kavität zu erkennen.

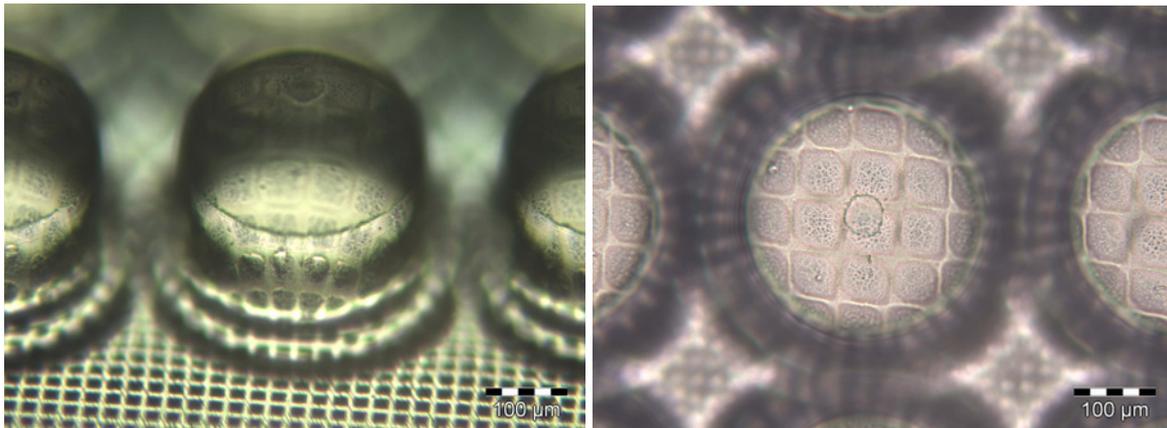


Abb. 3-53 Abbildungen eines PC-Zellkulturträgers mit einer strukturierten Oberflächenbeschichtung (quadrat. Silberflächen $25 \times 25 \mu\text{m}^2$), der bei $170 \text{ }^\circ\text{C}$ und 50 bar mikrothermogeformt wurde. Das Muster der Beschichtung wurde entsprechend der jeweils lokal vorliegenden Verstreckung verzerrt (links). In den Bereichen hoher Verstreckung werden die beschichteten Flächen zusätzlich zur Verzerrung ihrer Geometrie inselartig aufgerissen (rechts).

Besonders im Bereich der hohen Verstreckung wurden die anfangs in sich geschlossenen metallbeschichteten Flächen inselartig aufgerissen, wie in Abb. 3-53 zu sehen ist. Die Abmessungen dieser verstreckten Silberflächen im Bereich der maximalen Verstreckung der Kavitäten betrug etwa $60 \times 60 \mu\text{m}^2$, so dass daraus ein maximales Oberflächenverstreckverhältnis für den Bodenbereich der Kavität von ca. 6 abgeschätzt werden kann.

Mit diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass ein zuvor auf der flachen Folie durch Beschichtung erzeugtes, regelmäßiges Muster auch nach dem Formprozess in der dreidimensionalen Struktur auf allen Wänden wieder zu finden ist und prinzipiell einen Mikrothermoformprozess übersteht. Dünne metallische Schichten, vorzugsweise aus Gold, werden im Bereich des Tissue Engineerings häufig als Startschichten für thiol-gekoppelte selbstorganisierende Monoschichten (SAM, Self-Assembling Monolayer) benutzt [28], um beispielsweise definierte Bereiche eines Substrates zelladhäsionsfördernd oder zellabweisend einzustellen. Verschiedene organische SAM's sind jedoch bei erhöhten Temperaturen nicht stabil [120-123], so dass sie selbst einen Mikrothermoformprozess mit einer vergleichsweise geringen Prozesstemperatur nicht überstehen. In diesem Fall könnte jedoch eine, z. B. mit einer dünnen Goldschicht, strukturierte Folie zunächst zu einer dreidimensionalen Mikrostruktur thermogeformt werden, deren Oberfläche nach dem Formprozess als eine gemusterte Startschicht für die nasschemische, selektive Kopplung der funktionalen Moleküle zur Verfügung steht. Dadurch könnte trotz der thermischen Unbeständigkeit mancher organischer SAM's dieses Verfahren genutzt werden, um beispielsweise die Zelladhäsion in einer dreidimensionalen Gerüststruktur lokal zu kontrollieren.

Das Verfahren des Mikrothermoformens ermöglicht jedoch nicht nur eine Kombination mit strukturierenden Beschichtungstechniken, sondern auch mit Modifikationstechniken die eine Änderung physikochemischer Oberflächeneigenschaften des Polymers bewirken. Das am IBG entwickelte Verfahren zur gezielten Beeinflussung der Zelladhäsion auf Kunststoffoberflächen durch UV-Bestrahlung kann daher ebenfalls in Verbindung mit dem Mikrothermoform-

men genutzt werden, um in einem dreidimensional mikrostrukturierten Scaffold ein definiertes Zelladhäsionsmuster zu erzeugen (siehe Kapitel 4.6). Dabei wurde durch das selektive Anhaften verschiedener Zelltypen auf den bestrahlten Bereichen in einem mikrothermogeformten Zellkulturträger nachgewiesen, dass die auf der flachen Folie lokal durch UV-Bestrahlung erzeugten neuen Oberflächeneigenschaften den Mikrothermoformprozess bei entsprechenden Temperaturen und Gasdrücken überstehen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Kapitel 4.6.2 dargestellt.

Mikrothermoformen eröffnet aufgrund des materiellen Zusammenhaltes der Folie während des Formvorgangs zahlreiche neue Kombinationsmöglichkeiten mit Modifikationsverfahren, um spezifische Materialeigenschaften in einer dreidimensionalen, dünnwandigen Mikrostruktur einzustellen. Dies gilt insbesondere für die Kombination mit Verfahren, die bisher auf planare Substrate angewiesen waren (z. B. Nanoimprint, maskenbasierte Plasma- und UV-Modifikationsverfahren etc.). Folienbasierte Scaffolds, die auf der Grundlage des Mikrothermoformprozesses hergestellt werden, können aufgrund dieser vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten sehr variabel gestaltet werden.

3.3.11 Verbindungstechniken für mikrothermogeformte Zellkulturträger

Die Herstellung der folienbasierten Zellkulturträger mittels Mikrothermoformen erfolgte ohne eine explizite Strukturierung des 5 mm breiten Rahmenbereichs um die zentrale 1 cm² große mikrostrukturierte Fläche des Mikrocontainerarrays. Um die bestehende fluidische Peripherie des Bioreaktors (siehe Kapitel 2.3) für die biologische Validierung der thermogeformten Zellkulturträger nutzen zu können, wurde ein spritzgegossener Rahmen aus PMMA mit den Außenabmessungen 2 x 2 cm² und einer zentralen Aussparung von 1 x 1 cm² auf dessen unstrukturierte Oberseite im Randbereich gebondet (Abb. 3-54). Der Rahmen wurde aus spritzgegossenen Zellkulturträgern durch das nachträgliche Entfernen des zentralen mikrostrukturierten Bereichs gefertigt und der thermogeformte Zellkulturträger wurde entlang der Vereinzelungsstrukturen auf die Außenabmessungen 2 x 2 cm² zugeschnitten.

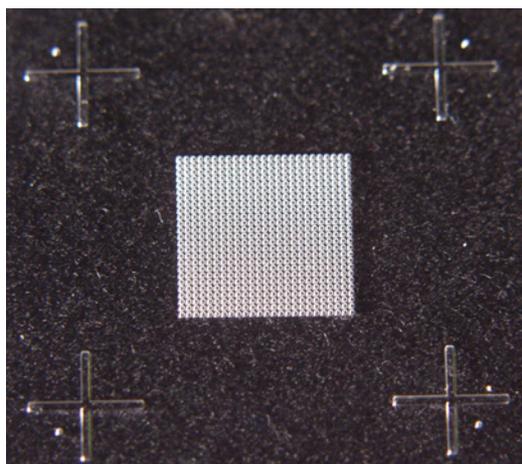


Abb. 3-54 Abbildung eines mikrothermogeformter Zellkulturträgers nach der Entformung. Die mit ausgeformten Kreuzstrukturen begrenzen eine Fläche von 2 x 2 cm². Aufgrund der optischen Klarheit der Folie im Randbereich scheint die Faserstruktur des Bildhintergrundes (Filz) durch.

Für die Verbindung der thermogeformten Zellkulturträger aus PC mit den spritzgegossenen Rahmen wurden zwei verschiedene Verfahren getestet. Zum einen wurde das Ultraschallschweißen als ein von der Industrie häufig genutztes und gängiges Fügeverfahren für Thermoplaste eingesetzt, das seit kurzem erstmalig auch für die Verbindung mikrotechnischer Bauteile am Forschungszentrum Karlsruhe verwendet wird. Zum anderen wurde das bereits beschriebene Lösungsmittelschweißverfahren in der Gasphase (siehe oben) angewendet. Beide Verfahren zeichnen sich gleichermaßen durch sehr kurze Prozesszeiten im Sekundenbereich aus.

Die für das Ultraschallschweißen benötigte Wärme wird durch die Umwandlung der Energie der Ultraschallschwingungen erzeugt [98]. Ultraschallschwingungen in einem Frequenzbereich von etwa 20–50 kHz werden von einer angepressten Sonotrode über eines der zu verfügbaren Kunststoffbauteile auf die Fügeflächen übertragen. Die durch die Grenzflächen- und Molekularreibung erzeugte Wärme führt zu einem oberflächennahen Aufschmelzen des thermoplastischen Materials. Der Vorgang wird beim Erreichen einer ausreichenden Schweißtemperatur beendet und die Bauteile werden an ihren Fügeflächen mit erhöhtem Druck verpresst. Einen bedeutenden Einfluss auf die Nahtqualität hat die Ausgestaltung der Fügezonen. Durch so genannte Energierichtungsgeber kann die Schwingungsenergie gezielt in den Fugebereich eingeleitet werden. Ohne einen solchen Energierichtungsgeber kommt es zu keiner Ausbildung einer Schweißnaht, sondern es bildet sich eine in der Regel mangelhafte Flächenverschweißung mit geringer Festigkeit. Der Energierichtungsgeber kann sowohl auf der Fügefläche der Kunststoffbauteile als auch auf dem Amboss oder der Sonotrode vorgesehen sein. Letzteres wird vorwiegend für das Verschweißen von dünnen Folien angewendet. Zur Verbindung des folienbasierten Zellkulturträgers mit dem Kunststoffrahmen wurde für die Energiefokussierung ein Energierichtungsgeber in einem speziell dafür gefertigten Werkzeug verwendet. Dies ermöglichte die Verwendung der spritzgegossenen Rahmen, ohne dass zusätzlich durch nachträgliches Bearbeiten der Fügefläche Energierichtungsgeber eingearbeitet werden mussten. Folgende Abb. 3-55 zeigt das aus Messing spanend gefertigte Werkzeug für das Ultraschallschweißen (äußere Abmessung 21 x 21 mm²) mit einem auf der Oberfläche positionierten Energierichtungsgeber. Der Energierichtungsgeber bestand dabei aus einer an der Basis etwa 0,5 mm breiten und ca. 0,25 mm hohen, quadratisch umlaufenden und erhabenen Leiste, die nach oben in einem Winkel von 45° zulief. Die zentrale Aussparung im Werkzeug mit der Abmessung von 10 x 10 mm² ermöglichte die direkte Auflage des folienbasierten Zellkulturträgers ohne die dadurch freigelagerten und nach unten ragenden Mikrokavitäten beim Verpressen der Fügepartner zu beschädigen.

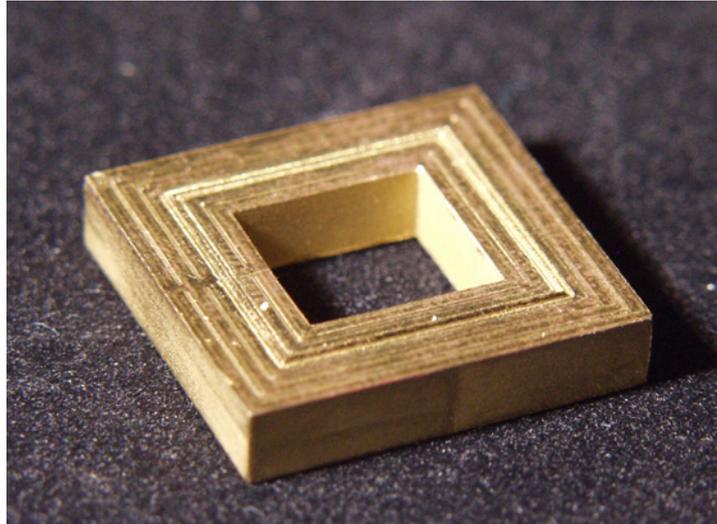


Abb. 3-55 Ultraschallschweißwerkzeug aus Messing (Außen $21 \times 21 \text{ mm}^2$, Innen $10 \times 10 \text{ mm}^2$, Dicke: 5 mm). Auf der Oberfläche ist der umlaufende Energierichtungsgeber zu erkennen (Breite 0,5 mm, Höhe 0,25 mm, Winkel ca. 45°).

Das Ultraschallschweißwerkzeug wurde in eine Silikonmatte eingepasst, so dass das Werkzeug gegen ein Verrutschen auf dem Amboss des Ultraschallschweißgerätes (Herrmann Ultraschalltechnik GmbH, PS Dialog Digital Control) einfach zu sichern war. Für den Verschweißprozess wurde der thermogeformte Zellkulturträger aus PC auf dem fixierten Messingwerkzeug positioniert. Darüber wurde der spritzgegossene Rahmen aus PMMA lose aufgelegt und am Zellkulturträger bzw. Werkzeug ausgerichtet. Im Vorlauf des Prozesses wurde durch das kraftfreie Aufsetzen der Sonotrode auf die Oberfläche des Stapels ein Referenzwert für die Wegmessung während des Verschweißens ermittelt.

Mit einer vorgegebenen Schweißkraft von 120 N wurden mikrothermogeformte und zum Teil auch durch Ionenspurtechnik mikroperforierte Zellkulturträger mit Spritzgussrahmen in Form einer dünnen umlaufenden und nahezu geschlossenen Naht verbunden. Die Naht war in der Regel nicht im gesamten Umfang geschlossen, da aufgrund der auf zwei gegenüberliegenden Seiten vorhandenen Vertiefungen der so genannten Strömungskanäle keine homogene Anpressung mit der flachen Sonotrode möglich war. Dennoch konnte mit einer Ultraschallleistung von etwa 100 W, einer Amplitude von $17 \mu\text{m}$ und einer Fügegeschwindigkeit von etwa 0,7 mm/s eine hinreichend gute Verbindung bei dieser Mischmaterialschweißung bzw. (Heiß-) Siegelung hergestellt werden (Frequenz 35 kHz). Die dafür benötigte reine Schweißzeit lag in einem Bereich von ca. 0,15 s. Eine auf diese Weise realisierte provisorische Verbindung, wie sie in Abb. 3-56 zu sehen ist, war ausreichend, um die Zellkulturträger mit Zellen beschicken zu können und sie im Bioreaktorsystem zu testen.

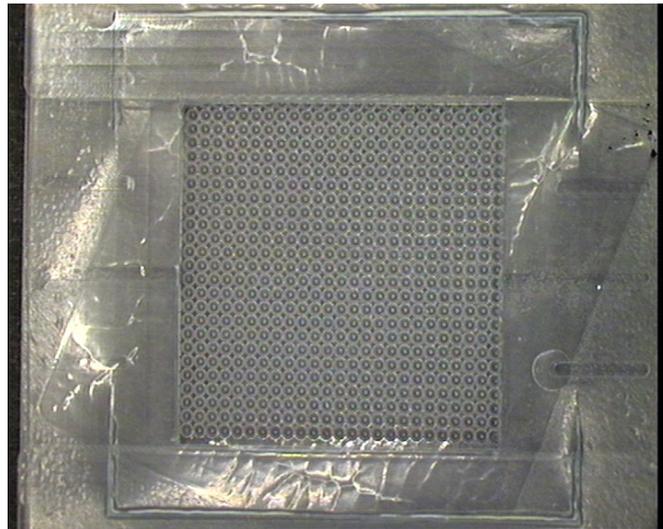


Abb. 3-56 Rückseite eines mikrothermogeformten Zellkulturträgers aus PC, der mit einer spritzgegossenen Rahmenstruktur mittels Ultraschall verschweißt wurde (Leistung 100 W, Amplitude 17 μm , Fügegeschwindigkeit 0,7 mm/s, Frequenz 35 kHz). Die Schweißnaht war nicht auf dem gesamten Umfang geschlossen.

Sollte eine solche Vorgehensweise etabliert werden, müssten einige Anpassungen durchgeführt werden, um die Qualität der Verschweißung zu erhöhen. Eine erste wichtige Anpassung wäre die Integration des Energierichtungsgebers in das Design des Spritzgussrahmens. Weiterhin müsste dessen Design u. a. im Hinblick auf das verwendete thermoplastische Material optimiert werden, damit eine fluidisch dichte Verbindung mit gesteigerter Festigkeit auf dem gesamten Umfang hergestellt werden kann. Es müsste sowohl die untere Auflagefläche als auch der Sonotrodenkopf an die Geometrie der Fügepartner angepasst werden, um eine optimale Energieweiterleitung und ein flächig homogenes Anpressen zu ermöglichen. Und schließlich würde die Verwendung identischer Materialien die Qualität der Verschweißung deutlich verbessern.

Das zweite Verfahren, das für eine Verbindung des folienbasierten Zellkulturträgers und einem spritzgegossenen Rahmen getestet wurde, war das Lösungsmittelschweißen in der Gasphase. Dieses Verfahren wurde bereits im Zusammenhang mit der Verbindung einer kommerziell erhältlichen Mikrofiltrationsmembran, die mit der Rückseite eines spritzgegossenen Zellkulturträgers verbunden wurde, zuvor beschrieben. Hier wurde nur die prinzipielle Machbarkeit untersucht, um für eventuell anschließende Entwicklungen an diese Arbeit eine mögliche Alternative zum Ultraschallschweißen bieten zu können. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber dem Ultraschallschweißen besteht darin, dass mit dieser ebenfalls sehr schnellen Fügechnik flächige Verbindungen gut zu realisieren sind.

Um eine Beschädigung der nach unten weisenden, dünnwandigen Mikrokavitäten zu verhindern, wurde für erste Tests als Auflage ein weiterer spritzgegossener Zellkulturträger mit entferntem Mikrostrukturbereich verwendet. Dieser untere Rahmen wurde in einen der vier durch die Kulisse definierten Plätze in der teilautomatisierten Anlage eingelegt. Darauf wurde der thermogeformte Zellkulturträger so positioniert, dass die Mikrokavitäten frei in die zentrale Aussparung des unteren Rahmens hineinragten. Auf den Zellkulturträger wurde der zweite Rahmen deckungsgleich aufgelegt. Äquivalent zu dem Verschweißprozess eines spritzge-

gossenen Zellkulturträgers mit einer mikroperforierten Membran wurde dieser Stapel im Ausgangszustand durch den oberen Stempel leicht angedrückt, während der geschlossene Rezipient evakuiert wurde. Die Lösungsmittelkontaktzeit wurde bei diesen Versuchen zwischen 10 und 20 s variiert. Abb. 3-57 zeigt einen mit einer Lösungsmittelkontaktzeit von 15 s verschweißten Stapel bestehend aus dem unteren Rahmen, dem folienbasierter Zellkulturträger und dem oberen Rahmen.

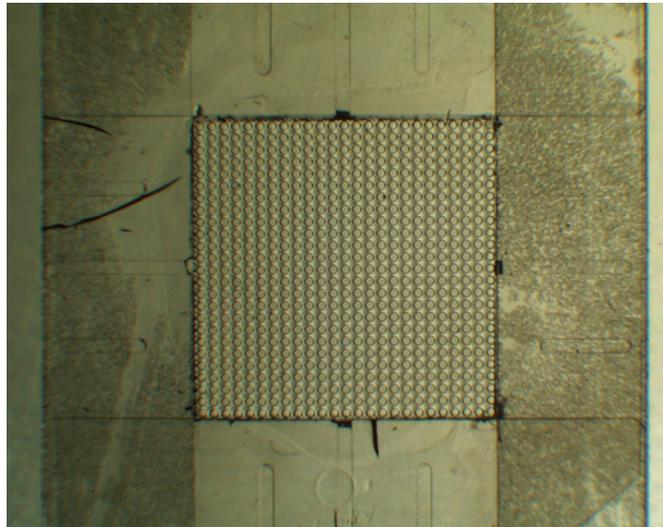


Abb. 3-57 Abbildung eines lösungsmittelverschweißten, mikrothermogeformten Zellkulturträgers. Die mikrothermogeformte Folie (PC) wurde bei einer Lösungsmittelkontaktzeit von ca. 15 s (Aceton) gleichzeitig mit jeweils einem Rahmen eines spritzgegossenen Zellkulturträgers (PMMA) auf der Ober- und Unterseite verschweißt.

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Mikrokavitäten in ihrer Form durch den kurzzeitigen Lösungsmittelkontakt nicht beeinflusst. In die Auflagefläche des unteren Rahmens prägte sich durch das Anlösen die raue Frittenoberfläche ein. Ein Grund hierfür war ein zu groß gewählter Anpressdruck (ca. 3 bar), der u. a. auch für das Auftreten der Risse in der Rahmenstruktur verantwortlich war. Prinzipiell wurde aber mit dieser Technik eine homogene flächige Verbindung zwischen der Rahmenstruktur und dem Zellkulturträger hergestellt, so dass z. B. auch der Aufbau eines ‚stacks‘ für einen Mehrfach-Bioreaktor auf diese Weise erfolgen könnte.

3.3.12 Möglicher kombinierter Prozessablauf

In diesem Kapitel wird kurz skizziert, wie ein kompletter Fertigungsprozess für einen mikrothermogeformten Zellkulturträger auf der Basis der voran beschriebenen Ergebnisse prinzipiell aussehen könnte. Aufgrund der Anforderung hohe Stückzahlen zu produzieren, sollte es sich bei dem Prozess um ein kontinuierliches Verfahren mit hohem Automations- und Wirkungsgrad handeln (Abb. 3-58). Das in Form von Rollenmaterial bezogene möglichst isotrope und unverstreckte Folienhalbzeug (1) wird, analog zur industriellen Herstellung von Mikrofiltrationsmembranen, großflächig mit energiereichen Ionen in einem kommerziell nutzbaren Beschleuniger (2) bestrahlt. In die modifizierten Folienbahnen werden anschlie-

ßend auf einem speziell entwickelten Rollen-Mikrothermoformautomat Mikrokavitätenarrays geformt und erneut auf eine Rolle gewickelt (3).

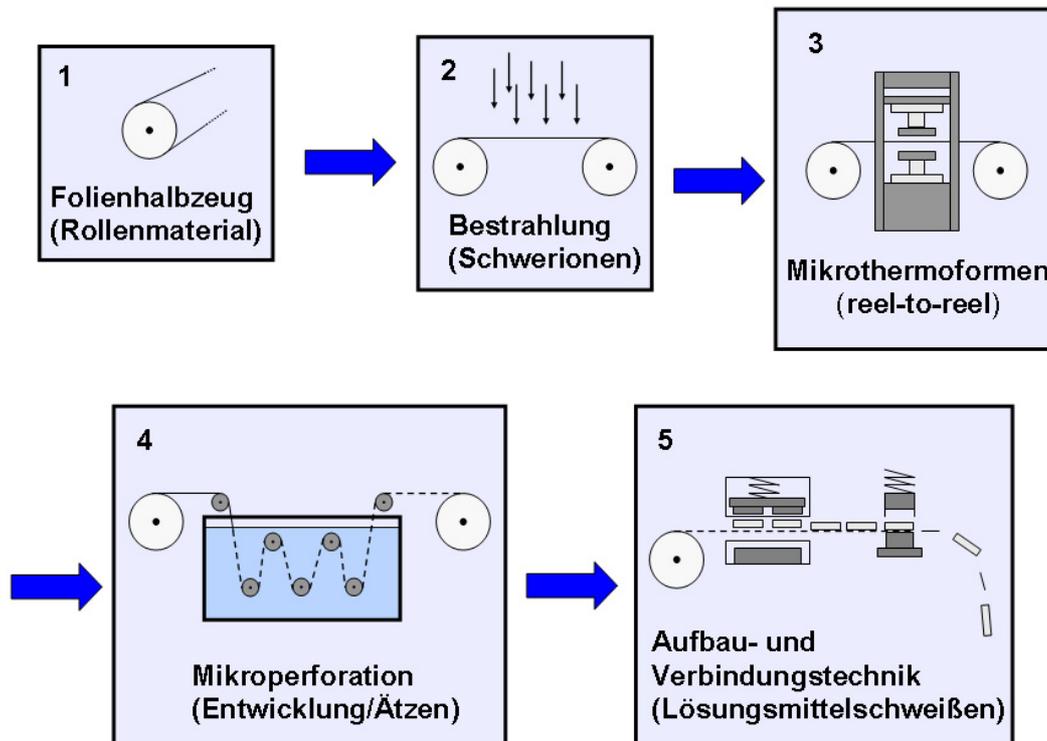


Abb. 3-58 Schematische Darstellung eines denkbaren Fertigungsverfahrens zur Herstellung mikroperforierter, mikrothermogeformter Zellkulturträger.

Die modifizierte und mikrothermogeformte Folie wird danach über ein Walzenwerk durch Tauchbäder für die nasschemische Ätzung der Mikroporen und durch Spülbäder zum Abstoppen des Entwicklungsschrittes geführt (4). In einem kombinierten Rollenautomaten mit Stanzwerkzeug kann anschließend die mikroperforierte und mikrostrukturierte Folie mit Rahmenstrukturen und eventuell mit Abstandshaltern für den Aufbau von Stacks verschweißt und gleichzeitig vereinzelt werden (5).

Ein mit dem Formvorgang zeitgleiches Aufsiegeln einer Rahmenstruktur und eines Abstandshalters innerhalb des Formwerkzeuges in einem Schritt [124,125] stellt nur dann eine gleichwertige Alternative hierzu dar, wenn die Siegelnaht den anschließenden Ätzschritt schadfrei übersteht und es zu keinen störenden Geometrieänderungen an den aufgesiegelten Bauteilen durch das Ätzen kommt.

4 Biologische Validierung

4.1 Zellkultur (Methoden)

Erst die parallele Durchführung von biologischen Tests und Prüfverfahren zur Entwicklung eines Herstellungsprozesses für Zellkulturträger ermöglicht eine effiziente und gezielte Entwicklung eines solchen Verfahrens, da das entscheidende Kriterium nicht die technische Machbarkeit, sondern vielmehr die angestrebte biologische Funktionalität ist. Kleinste Änderungen in der Prozess- und Verfahrenstechnologie können nachfolgend im Kontakt mit einem komplexen biologischen System zu massiven Auswirkungen in dessen Charakteristik und Funktionalität führen. Um frühzeitig Defizite und Fehlentwicklungen aufdecken zu können, müssen alle Neuentwicklungen und Änderungen, dies betrifft die Methodik, die verwendeten Materialien und die eingesetzten Hilfsstoffe (z. B. Trennmittel), möglichst zu einem frühen Zeitpunkt biologisch getestet werden. Für die biologische Validierung des polymeren, mikrostrukturierten Zellkulturträgers des Forschungszentrums Karlsruhe wurden für *in vitro* Tests sowohl verschiedene Zelllinien als auch primäre Zellen verwendet.

4.1.1 Zelllinie Hep G2

Für die *in vitro* Tests mit Zelllinien wurden zum einen adhärenente Zellen des Typs Hep G2 verwendet (Ref. Nr. HB-8065; ATCC American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine humane Hepatoblastomzelllinie mit epithelialer Morphologie. Die Kultivierung erfolgte in Form von Monolayern in 250 ml Kulturflaschen (Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (WTB Binder, CB210 CO₂-Inkubator). Die Zellen wurden einmal pro Woche in 250 ml Kulturflaschen in drei unterschiedlichen Zelldichten passagiert. Zusätzlich wurde im Abstand von je zwei Tagen ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem Zellkulturmedium basierend auf MEM Eagle (ATCC) mit einem Zusatz nicht-essentieller Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1500 mg/l Natriumbicarbonat, 1 Vol.% Penicillin/Streptomycin und 10 Vol.% FCS kultiviert.

Um die Zellen aus den Zellkulturflaschen zu ernten, wurde zunächst das überstehende Medium abgesaugt. Nach dem Waschen der auf dem Substrat haftenden Zellen mit 5 ml PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung (0,2 Gew.% Trypsin (Life technologies) in einer Lösung aus 4,5 g/l Na₃-Zitrat 2H₂O, 10 g/l KCl, 3,85 g/l EDTA und 5 mg/l Phenolrot) bei 37 °C für etwa 5 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 9 ml Medium abgestoppt und die Zellen mit einer Glaspipette vorsichtig vereinzelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Coulter Counters (Modell 871, Coulter Electronics Ltd.) in einer 1:100 Verdünnung mit Isoton-Lösung (Coulter Euro Diagnostics).

Dieser vom Leberparenchym abgeleitete Zelltyp besitzt noch eine Reihe basaler und induzierbarer zellspezifischer Leistungen, anhand derer eine qualitative und quantitative Beurteilung der Kultivierungsform durchgeführt werden kann [126]. Folgende leberspezifische Proteine werden basal *in vitro* von Hep G2 exprimiert:

- Albumin
- Transferrin
- Cytokeratin 8
- α_1 -Antitrypsin
- β -Fibrinogen
- Haptoglobin
- Transferrin

Bei den Monooxygenasen des Cytochrom P-450 Systems ist beispielsweise das Isoenzym Cyp1A2 nicht nachweisbar, kann aber durch einen polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoff, 3-Methylcholanthren, induziert werden [126].

4.1.2 Zelllinie L929

Neben den Hep G2-Zellen wurden des Weiteren adhärenz Zellen des Typs L929 verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Mausfibroblastenzelllinie. Als Medium wurde Minimum Essential Medium (MEM) mit 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 5 Vol.% fötales Kälberserum (FCS) verwendet. Die Zellen wurden einmal wöchentlich passagiert und im Abstand von je zwei Tagen wurde zusätzlich ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellzählung und das Passagieren der Zellen erfolgten nach dem gleichen Schema wie für die Zellen des Typs Hep G2. Die Zellen des Typs L929 wurden vorzugsweise für die *in vitro* Tests an oberflächenmodifizierten Polymersubstraten verwendet.

4.1.3 Primäres Zellmaterial (Ratte)

Für die biologische Validierung wurden zusätzlich zu den Zelllinien auch primäre, frisch isolierte Rattenhepatozyten eingesetzt. Die Zellen wurden aus männlichen Ratten (200 mg) des BDX-Stammes mittels einer ‚two step collagenase perfusion‘ nach Seglen (1976, [127]) gewonnen. Die Zellen wurden im Anschluss an die Perfusion in einem auf Eis gekühltem Isolationsmedium (0,14 g/l CaCl_2 , 0,40 g/l KCL, 0,06 g/l KH_2PO_4 , 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 8,0 g/l NaCl, 0,06 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,0 Glukose, 2,38 g/l HEPES und 10 ml/l Penicillin/Streptomycin) suspendiert und gewaschen. Das Isolationsmedium wurde vor dem Gebrauch mit Sauerstoff angereichert. Nach einer Anreicherung der lebenden Zellen in einem Dichtegradienten lag die Vitalität der mit dieser Methode gewonnenen Zellen in einem Bereich von etwa 90 bis 98%.

Die Kultivierung der primären Hepatozyten erfolgte danach in einem Waymouth 752/1-Medium mit 10 ml/l Glutamin-Lösung (200 mM), 1,0 ml Gentamycin-Lösung (50 μ g/ml), 10^{-8} M Insulin, 2ml/l Nicotinamid, 2 ml/l Aminolevulinsäure (100 μ M), 1 ml/l $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (250 nM), 2 ml/l Transferrin (13 nM), 100 ml/l CPSR1 (10%) und nach 24 h wurde zusätzlich 0,4 ml/l Hydrocortison zugegeben.

Diese primären Zellen besitzen aufgrund ihres Ursprunges ein breites Spektrum an zell- bzw. gewebespezifischen Stoffwechsellleistungen, die geeignete und quantitativ erfassbare Marker für eine histo- und biochemische Beurteilung darstellen. Darüber hinaus umfasst eine der angestrebten Anwendungen des Bioreaktorsystems die Stapelung vieler mit leberspezifischen Zellen gefüllter Zellkulturträger für den Aufbau eines extrakorporalen Leberunterstützungssystems, so dass gleichzeitig eine sehr anwendungsnahe Validierung erfolgen kann.

4.2 Vorbehandlung der Zellkulturträger

Damit die polymeren Strukturen für die Zellkultur verwendet werden konnten, wurden diese zuvor sterilisiert. Dazu wurden die Strukturen in Polyethylenfolie eingeschweißt und über einen Zeitraum von mindestens 1 h einer ^{60}Co γ -Strahlung (200 Gy/h) am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG, Forschungszentrum Karlsruhe) ausgesetzt.

Bei einigen Versuchen wurde zur Verbesserung der Zelladhäsion vor dem Beimpfen der Mikrostrukturen mit Zellen eine Beschichtung des Polymersubstrates mit Kollagen (rat tail collagen, Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturträger zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe mit Isopropanol (100%, 70%, 50%, 30%, 2 x steriles Wasser) vollständig benetzt. Anschließend wurde ein Tropfen (ca. 150–300 μl) wässriger Kollagenlösung verdünnt in 0,2 Vol.% Essigsäure für mindestens 12 h entweder bei 4 °C oder bei Raumtemperatur auf den mikrostrukturierten Bereich des Zellkulturträgers aufgebracht. Die auf der Oberfläche physisorbierte Gesamtmenge wurde so in einem Bereich von etwa 5–250 μg eingestellt. Vor dem eigentlichen Beimpfen mit Zellen wurde der mikrostrukturierte Bereich mindestens einmal mit PBS und einmal mit Medium gewaschen. In einigen Fällen wurde die Essigsäure vor dem Waschen durch das Anlegen eines Unterdrucks in einem Exsikkator vollständig verdampft, bevor die Mikrocontainer erneut mit Medium benetzt wurden.

4.3 Beimpfung der Zellkulturträger

Der mikrostrukturierte Zellkulturträger befand sich bereits seit einiger Zeit in seinem bisherigen Design am IBG in einer ersten biologischen Validierungsphase. Er wurde dabei sowohl in Form einer einfachen statischen Kultur, z. B. in einer gewöhnlichen Petrischale, als auch innerhalb eines speziell hierfür entwickelten Bioreaktorgehäuses, in dem eine aktive Mediumversorgung möglich ist, getestet. Die bisher verwendeten Methoden der Beimpfung und der Kultivierung wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit möglichst unverändert für die neuen Prototypen angewendet.

Die für den Zellkulturversuch zu beimpfende Zellzahl wurde deshalb zunächst in einem kleinen Tropfen Medium (100–300 μl) suspendiert, bevor dieser so auf den mikrostrukturierten Bereich eines entsprechend vorbehandelten Zellkulturträgers (siehe Kapitel 4.2) aufgesetzt wurde, dass alle Mikrocontainer davon benetzt wurden. In dieser Form wurde der Zellkulturträger für etwa 2–4 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit sedimentierten die Zellen in die Mikrocontainer und begannen sich auf den Oberflächen der Mikrokapazitäten zu verankern. Für eine statische Kultivierung wurde die Kulturschale danach vorsichtig mit Medium aufgefüllt, bis die Mikrostruktur gerade vollständig im Medium untergetaucht war. Um ein Aufschwimmen des Zellkulturträgers im Medium zu verhindern, wurden die spritzgegossenen Typen während des Auffüllens mit Medium mit sterilen Pinzetten auf den Boden der Kulturschale gedrückt. Nach der vollständigen Benetzung des Zellkulturträgers konnte dieses Hilfsmittel entfallen, da im Gegensatz zu den mikrothermogeformten Zellkulturträgern ohne Rahmenstruktur ein nachträgliches Aufschwimmen nie beobachtet wurde. Die mikrothermogeformten Zellkulturträger wurden über den gesamten Kultivierungszeitraum durch das Auflegen von sterilen Teflonringen im unstrukturierten Randbereich am Aufschwimmen gehindert.

Für eine Kultivierung der immobilisierten Zellen in den mikrostrukturierten Zellkulturträgern mit einer aktiven Mediumversorgung wurde der beimpfte Zellkulturträger unter sterilen Bedingungen in das geöffnete Bioreaktorgehäuse eingesetzt (siehe Kapitel 2.3). Nach dem Verschließen des Gehäuses wurden die Schläuche und der Bioreaktor aktiv über die Schlauchpumpe mit Medium aus der Vorlage möglichst Blasenfrei gefüllt. Falls sich dennoch kleine Luftblasen im System befanden, wurden diese durch vorsichtiges Drehen und Wenden des Bioreaktors mit dem Medium herausbefördert. Eine Beimpfung des Zellkulturträgers innerhalb des geschlossenen Bioreaktorsystems war prinzipiell möglich, wurde jedoch für die nachfolgenden Versuche im Rahmen dieser Arbeit nicht genutzt. Über eine Gasmischanlage wurde die Mediumvorlage mit Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid in einem definierten Verhältnis direkt vor Ort begast.

4.4 Fixations- und Färbemethode

Für spezielle mikroskopische Beobachtungen wurden Zellen auf den Kunststoffsubstraten fixiert und gefärbt. Dazu wurden die Substrate zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für etwa 30 min in eine wässrige Kristallviolettlösung (5,0 g/l in Methanol, Serva Feinbiochemika, Heidelberg) eingetaucht. Danach wurden die Strukturen mehrmals vorsichtig in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich luftgetrocknet.

4.5 Biokompatibilitätstestung

4.5.1 Besiedelungstests

Um die Reaktion lebender Zellen oder Gewebe auf bestimmte Materialien zu untersuchen, werden heutzutage sehr unterschiedliche Methoden angewendet. Auf europäischer Ebene wurde mittels der EN ISO 10993 eine Vereinheitlichung in der biologischen Beurteilung von Medizinprodukten angestrebt. Teil 5 dieser europäischen Norm beschreibt ein prinzipielles Vorgehen für die Prüfung auf *in vitro* Zytotoxizität von medizinischen und zahnmedizinischen Werkstoffen und Produkten. Die zu testenden Materialien werden dabei entweder in direkten Kontakt mit den Zellen gebracht (Besiedelungstests) oder die Zellen stehen nur indirekt über eine permeable Schicht z. B. aus Agar-Gel mit dem Werkstoff in Verbindung [128]. Der zweite Fall beschreibt damit ein Verfahren bei dem ein Einfluss bedingt durch Oberflächeneigenschaften und -strukturen auf das Verhalten der Zellen ausgeschlossen werden kann. Eine dritte Möglichkeit stellt der so genannte Extraktionstest dar, bei dem mittels geeigneter Medien Substanzen aus dem Werkstoff extrahiert werden und anschließend das Extrakt in unterschiedlichen Konzentrationen in das Zellkulturmedium beigemischt wird. Zur letztendlichen Beurteilung der Zytotoxizität sind Messungen unterschiedlicher Kategorien möglich (EN ISO 10993):

- Abschätzung der Zellschädigung aufgrund morphologischer Veränderungen
- Messungen der Zellschädigung
- Messungen des Zellwachstums
- Messungen spezifischer Aspekte des Zellstoffwechsels

In Anlehnung an diese Norm wurden erste Untersuchungen zur Toxizität der für das Mikrothermoformen verwendeten PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI) mit

Zellen der Zelllinie Hep G2 durchgeführt. Dieser Kunststoff wurde zunächst als einziger getestet, da bis zu diesem Zeitpunkt nur mit diesem Material der Mikrothermoformprozess und die ionenspurbasierte Mikroperforation in Kombination durchgeführt wurde und daher als einziges Material bis zu diesem Zeitpunkt für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen in einem Bioreaktorsystem zur Verfügung stand. Um sowohl die spezifischen Wechselwirkungen der Zellen mit der Oberfläche des Folienhalbzeuges als auch die zytotoxischen Eigenschaften des Materials selbst abschätzen zu können, wurde das Material in direktem Kontakt mit den Zellen in einer statischen Kultur getestet. Dazu wurden PC-Folien flächendeckend auf den Boden von Petrischalen aus PS (Durchmesser 60 mm) gelegt und an jeweils mehreren Punkten (max. 3–5 Punkte) im Randbereich thermisch mit dem Schalenboden verschweißt. Als negative Referenz wurden 60 mm Standard-Petrischalen für die Zell- und Gewebekultur aus PS ohne PC-Folie verwendet.

Ursprünglich wurden sowohl für die Referenz als auch für die zu testende PC-Folie $1,6 \times 10^5$ Zellen ausgesät und durch leichte, diametral gerichtete Bewegungen der Petrischale gleichmäßig auf der Fläche verteilt. In 5 ml Medium wurden die Zellen über max. 5 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Zellzählung wurde das Medium entfernt und die Zellen kurz mit 2 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Für das enzymatische Ablösen der Zellen wurden zunächst 2 ml Trypsin-Lösung in die Petrischale gegeben und vorsichtig geschwenkt, bevor 1,8 ml der Lösung wieder abgenommen wurden. Danach wurden die Zellen in den Schalen bei 37 °C für bis zu 6 min inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde nach dieser Zeit kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst hatten und eventuell wurde die Inkubationszeit um max. 1 min verlängert. Das Ablösen der Zellen wurde teilweise durch leichtes Klopfen der Schale auf eine harte Unterlage unterstützt. Nachdem sichergestellt wurde, dass sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden 2 ml Medium zum abstoppen der Reaktion zugegeben. Die Zellen wurden danach bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde je nach zu erwartender Zellzahl in einem geeignet kleinen Volumen Medium (20–700 µl) erneut resuspendiert. Schließlich wurden 10 µl dieser Suspension in eine Neubauer-Kammer zur Zellzahlbestimmung pipettiert.

Die Zellzahl wurde jeweils in drei parallelen Ansätzen zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h der Kultivierung bestimmt. Abb. 4-1 zeigt die ausgewerteten Zellzahlen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Auffallend an den Wachstumskurven ist hierbei die deutlich reduzierte Anzahl adhärerter Zellen nach dem Aussäen auf den beiden verschiedenen Substraten. Die vergleichsweise schlechte Verankerung der Zellen bewirkte einerseits, dass in den ersten Stunden nach dem Aussäen sowohl während des Trypsinierens als auch beim Waschen mit PBS für die Bestimmung der Zellzahl ein Großteil der Zellen verloren ging. Die aus den exponentiell gefitteten Daten berechnete Generationszeit von 29 h für das Wachstum der Zellen auf PC-Folie zeigte im Vergleich zu den 26 h Generationszeit der Kontrolle nur eine leichte Hemmung der Proliferation, jedoch keinen auffällig deutlichen Unterschied. Die ermittelte Generationszeit lag in einem für adhärente Zelllinien angegebenen typischen Bereich von 24–36 h [129].

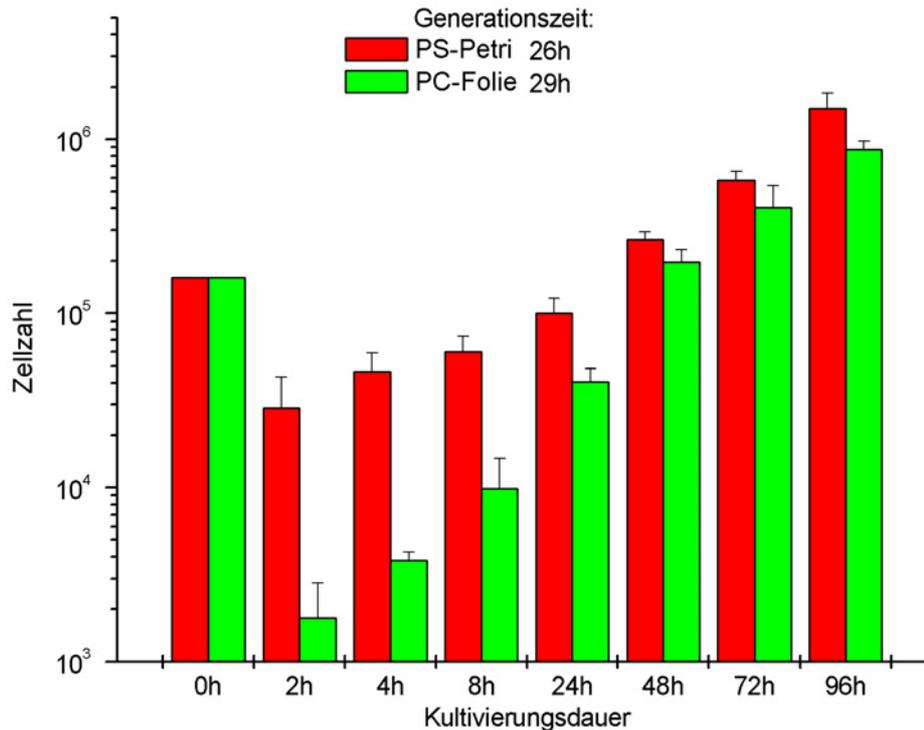


Abb. 4-1 Vergleich der Wachstumskurven von Hep G2 in 60 mm Standard-Petrischalen aus PS (Referenz) und auf PC-Folien (LoFo High Tech Film GmbH, Pokalon OG 461 GI).

4.5.2 alamarBlue™-Assay

Ein kommerzieller Test, der ein Maß für das Wachstum humaner und tierischer Zellen liefert, ist der so genannte alamarBlue™-Assay. Ähnlich wie bei dem weiter verbreiteten MTT-Test wird den lebenden Zellen ein nicht-toxischer Farbstoff ins Medium zugesetzt. Der in oxidierte Form zugegebene Indikator wird durch das von aktiven und vitalen Zellen erzeugte Milieu zu einer fluoreszierenden Form (Anregung 530–560 nm, Fluoreszenz 590 nm) reduziert. Parallel dazu ändern sich auch die Absorptionseigenschaften des Indikators, so dass die Reduktion auch über Absorptionmessungen bei den Wellenlängen 570 nm und 600 nm ermittelt werden kann.

Der Test wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die prinzipielle Aufrechterhaltung der zellulären Aktivität in mikrostrukturierten Zellkulturträgern nachzuweisen. Hierfür wurden drei unterschiedlich gefertigte Zellkulturträgertypen (spritzgegossene und laserperforierte Zellkulturträger, spritzgegossene und Membran-gebundene Zellkulturträger, mikrothermogeformte Zellkulturträger) verwendet. Im Fall der mikrothermogeformten Zellkulturträger kamen neben den drei verschiedenen Typen auch unterschiedliche polymere Materialien zum Einsatz (PC, PS und COP). Parallel hierzu wurde durch einen doppelten Versuchansatz ein Vergleich zwischen unbehandelten und mit Kollagen beschichteten Zellkulturträgern durchgeführt. Die Mikrostrukturen wurden hierfür zunächst sterilisiert (⁶⁰Co γ -Strahlung) und die eine Hälfte der Zellkulturträger mit ca. 250 μ g Kollagen beschichtet, bevor die unbehandelten und beschichteten Strukturen mit jeweils zwei Millionen Zellen (Hep G2) beimpft wurden [130]. Die Zellkulturträger wurden in Kulturschalen aus PS mit 5 ml Medium über einen

Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Unterschiede zeigten sich bereits direkt nach dem Beimpfen, da beim sehr vorsichtigen Auffüllen der Petrischalen mit Medium deutlich mehr Zellen aus den unbehandelten Mikrostrukturen ausgeschwemmt wurden als bei den beschichteten. Die folienbasierten, mikrothermogeformten Zellkulturträger wurden mittels sterilisierter Teflonringe beschwert, um ein Aufschwimmen der Strukturen im Medium zu verhindern. In die Kulturmedien wurden am 8. und 21. Tag der Kultivierung 10 Vol.% des alamarBlue™-Farbstoffes zugegeben und bei 37 °C im Brutschrank über einen Zeitraum von 3 h inkubiert. Anschließend wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt und das abgenommene Medium wurde photometrisch auf einer 96 Well Platte gemessen (Fluoreszenz 590 nm). Als Referenz (Blank) diente jeweils eine Petrischale aus PS mit 5 ml frisch angesetzttem Medium, die ebenfalls für 3 h mit dem Farbstoff inkubiert wurde. Abb. 4-2 und Abb. 4-3 zeigen exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen der in den verschiedenen Mikrostrukturen immobilisierten Zellen am 5. Tag der Kultivierung.

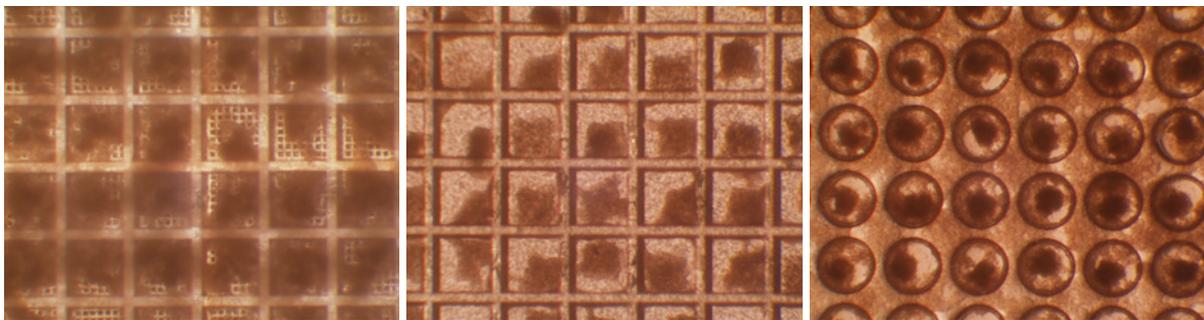


Abb. 4-2 Tag 5 der Kultivierung von 2×10^6 Hep G2-Zellen in den verschiedenen hergestellten und **nicht behandelten** Zellkulturträgertypen (von links nach rechts: laser-perforiert, Membran-gebondet und mikrothermogeformt).

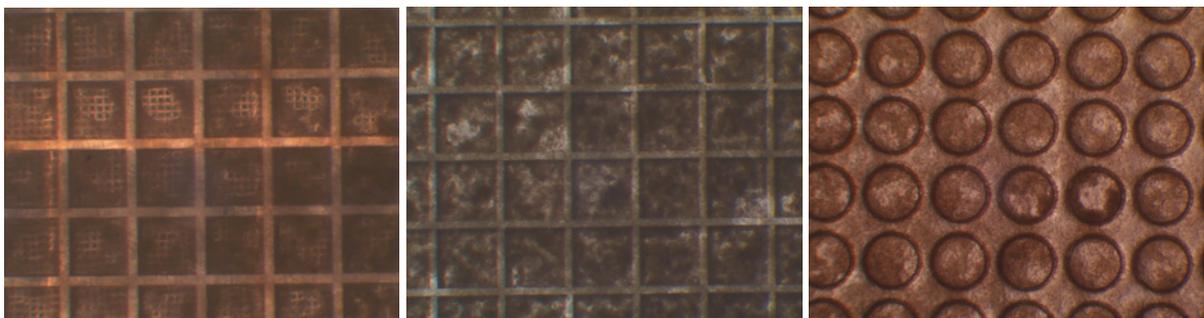


Abb. 4-3 Tag 5 der Kultivierung von 2×10^6 Hep G2-Zellen in den verschiedenen hergestellten und **kollagenisierten** Zellkulturträgertypen.

Die Abb. 4-4 und Abb. 4-5 zeigen die gemessenen Fluoreszenzwerte am 8. und am 21. Tag der Kultivierung mit den verschiedenen hergestellten Zellkulturträgern.

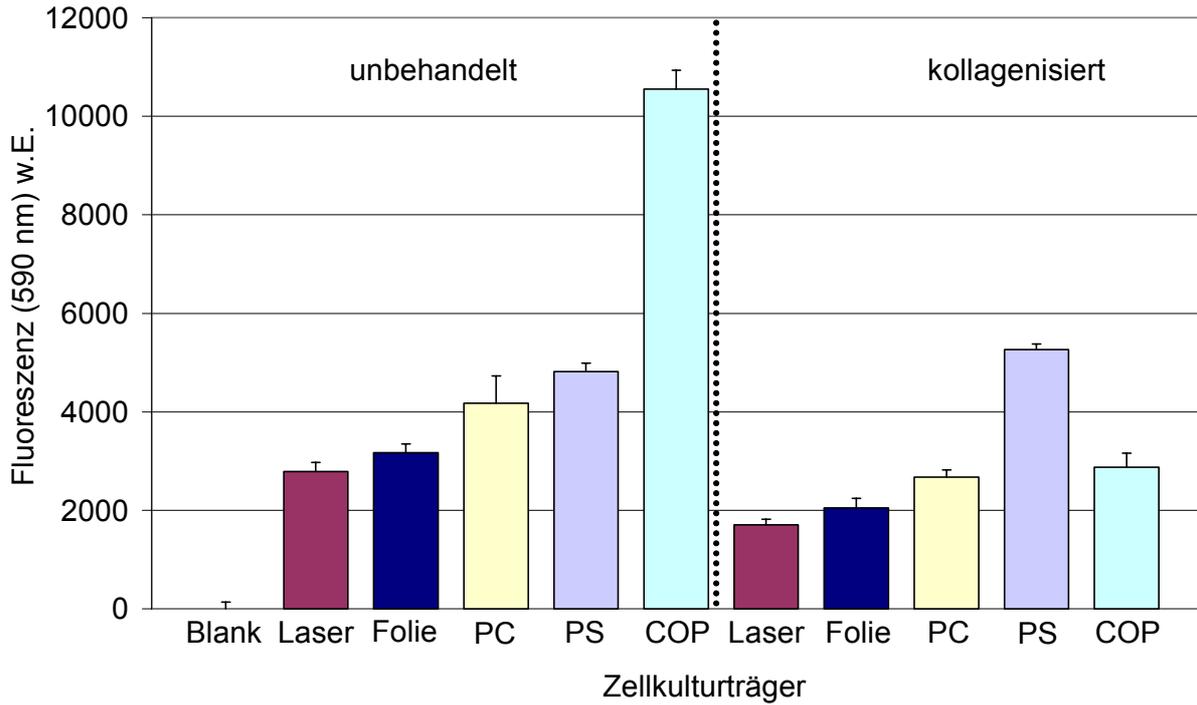


Abb. 4-4 Ergebnisse des alamarBlue™-Assays am 8. Tag der Kultivierung („Laser“ = laserperforierter Zellkulturträger; „Folie“ = Membran-gebondeter Z.; „PC“, „PS“, „COP“ = mikrothermogeformter PC-, PS-, COP-Z.).

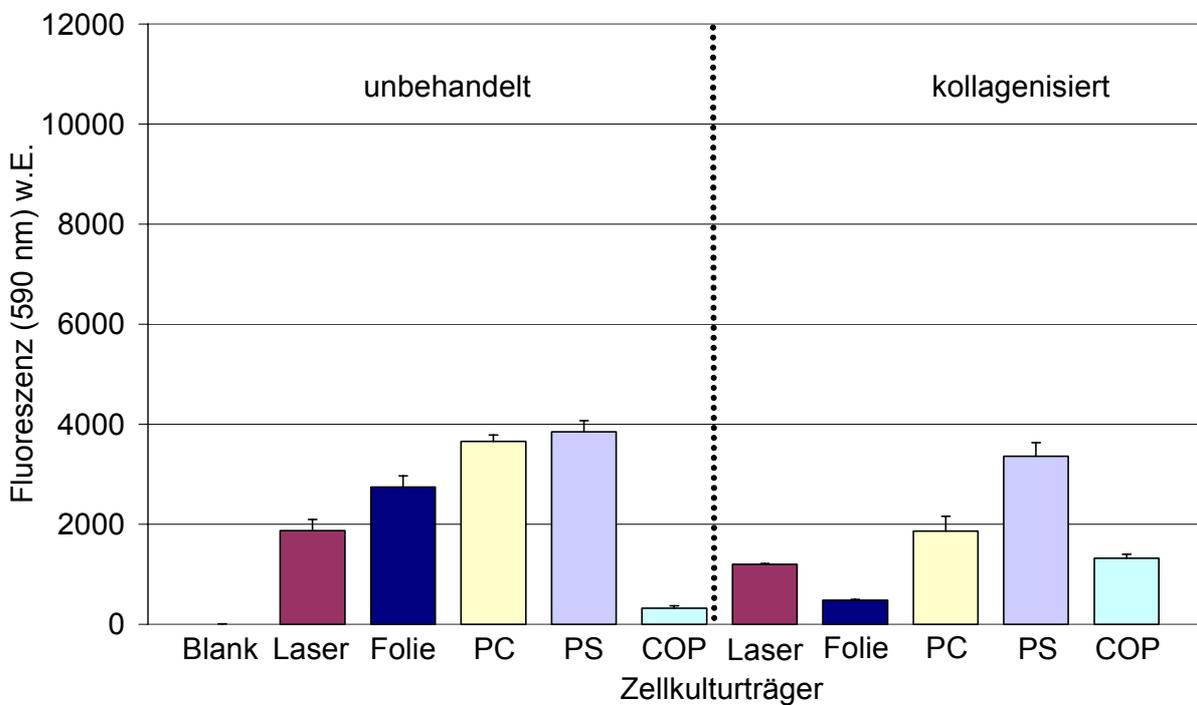


Abb. 4-5 Ergebnisse des alamarBlue™-Assays am 21. Tag der Kultivierung („Laser“ = laserperforierter Zellkulturträger; „Folie“ = Membran-gebondeter Z.; „PC“, „PS“, „COP“ = mikrothermogeformter PC-, PS-, COP-Z.).

Sowohl am 8. als auch am 21. Tag der Kultivierung konnte mit dem Test eine erhöhte zelluläre Aktivität bzw. Vitalität im Vergleich zur Referenz („Blank“) festgestellt werden. Dabei zeigten die Messwerte der mikrothermogeformten Strukturen in einem direkten Vergleich innerhalb der Gruppen ‚unbehandelt‘ und ‚kollagenisiert‘ durchgehend eine etwas höhere Aktivität als die laserperforierten und Membran-gebundenen Zellkulturträger. Im direkten Vergleich zwischen den unbehandelten und den kollagenisierten Zellkulturträgern lagen die Werte sowohl am 8. als auch am 21. Tag für die unbehandelten geringfügig höher. Des Weiteren war die gemessene Aktivität am 21. Tag im Vergleich zum 8. Tag in allen Fällen leicht und für den unbehandelten COP thermogeformten Zellkulturträger deutlich verringert. Das deutliche Absinken im letztgenannten Fall wurde jedoch durch das Ausschwemmen annähernd aller Zellen durch die zwei Medienwechsel am Tag 8 und 14 verursacht. Somit konnte für keine der Zellkulturträgertypen eine auffällige toxische Wirkung auf die Zellen beobachtet werden.

4.6 Oberflächenmodifikationen

4.6.1 Gasphasenfluorierung

Neben den verschiedenen, und heutzutage häufig eingesetzten Niederdruck-Plasmaprozessen mit Träger- und Reaktionsgasen wie N_2 , Ar, O_2 und H_2 etc. [131,132], stellt die direkte Gasphasenfluorierung eine weitere mögliche Methode dar, um die Oberflächeneigenschaften von komplexgestalteten, dreidimensionalen Mikrostrukturen gleichmäßig und flächig zu modifizieren. Elementares Fluor reagiert kontrolliert mit den meisten Kunststoffen bei Raumtemperatur. Neben einer statistischen Substitution der oberflächennahen Wasserstoffatome an den Polymerketten können auch Reaktionen mit anderen chemischen Gruppen (O_2 oder Cl_2 enthaltende Gruppen) im Kunststoff erfolgen. Durch die Substitutionsreaktionen entstehen u. a. C-F-, C-F₂- und C-F₃-Bindungen. Letztere führen jedoch am Grundkörper des Polymers zu Kettenbrüchen und damit zu einer Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung zu geringeren Molekulargewichten. Die Fluorierung von Kunststoffen bewirkt eine Hydrophilisierung der Oberfläche und wird deswegen industriell genutzt, um beispielsweise die Barriereigenschaften von Kraftstofftanks aus Polyethylen gegenüber hydrophoben Kraftstoffen zu verbessern [98]. Die fluorierten Kunststoffoberflächen zeichnen sich in der Regel neben den hydrophileren Eigenschaften auch durch eine höhere chemische Beständigkeit aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine direkte Gasphasenfluorierung von dreidimensional strukturierten Zellkulturträgern zur Verbesserung der Zelladhäsion geeignet ist. Es wurde vermutet, dass eine durch die Fluorierung verursachte Hydrophilisierung der Oberfläche des Polymers, ähnlich wie bei einer UV-basierten Oberflächenmodifikation (siehe Kapitel 3.2.11), zu einer veränderten Anlagerung und Zusammensetzung des Proteinadsorbates in einem Zellmilieu führt und darüber die Zelladhäsion beeinflusst werden kann.

Zunächst wurde die Reaktion des Fluors an planen Prüfkörpern aus verschiedenen Kunststoffen mittels eines FT IR-Spektrometers untersucht. Folgende Abb. 4-6 bis Abb. 4-8 zeigen die mit ATR-Technik (ATR, Abgewächte Total Reflektion) gemessenen Spektren dünner Folien aus PMMA, PC und COC. ATR-Messungen sind aufgrund der mehrfach auftretenden,

totalen Reflexionen und des dadurch mehrfachen Eindringens des evaneszenten Feldes in das Material besonders gut für eine qualitative Beurteilung von Oberflächen geeignet [133].

Probenkörper dieser drei Kunststofftypen wurden 2 h, 24 h und 96 h in einem gasdichten Rezipienten elementarem Fluor in einem Mischungsverhältnis mit Helium von 1:10 bei verschiedenen Gesamtdrücken ausgesetzt. Die Zugabe des inerten Gases in Form von Helium diente hierbei der ‚Verdünnung‘ des reaktiven Fluors. Der Gesamtdruck innerhalb des Rezipienten wurde in verschiedenen Versuchen in einem Bereich von etwa 100 bis 300 mbar variiert. In Abb. 4-6 sind neben dem, mit ATR-Technik, gemessenen Spektrum einer unbehandelten Probe, Spektren einer schwach und stark fluorierten PMMA-Platte aufgetragen.

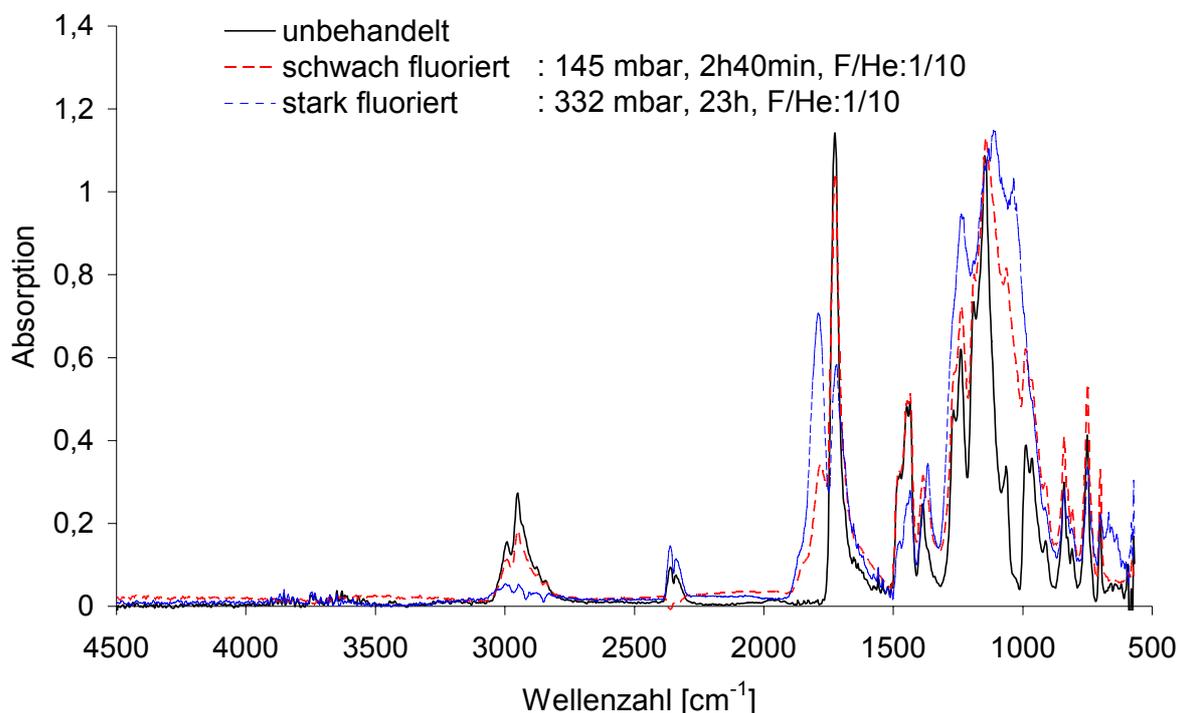


Abb. 4-6 IR-Spektren von einer unbehandelten, schwach und stark fluorierten PMMA-Probe (ATR).

Eine besonders auffällige Veränderung im Spektrum war die Abnahme der Schwingungsbanden (Valenzschwingung) der Methyl-, Methylengruppen und Methylester im Bereich von etwa 3000–2800 cm⁻¹ [133] durch die Substitution des Wasserstoffs mit Fluor. Des Weiteren kam es zu einer Abnahme der Carbonylbande (Valenzschwingung im Carbonsäureester) bei etwa 1730 cm⁻¹ bei gleichzeitigem Auftauchen von zwei neuen Banden bei etwa 1830 und 1770 cm⁻¹. Eventuell ist das Auftauchen dieser neuen Banden mit der Abnahme der ursprünglichen Carbonylbande gekoppelt und resultiert möglicherweise aus der Fluorierung des Methylesters. Schließlich tauchte eine neue Schwingungsbande im Wellenzahlbereich von 1400–1000 cm⁻¹ auf. Diese Bande ist auf das Entstehen von C-F-Bindungen zurückzuführen, deren Schwingungsbanden (Valenzschwingung) in diesem Bereich lokalisiert sind [133].

Die Fluorierung von Polycarbonat führt zu einer ähnlichen Veränderung im Spektrum wie bei Polymethylmethacrylat (siehe Abb. 4-7). Die Valenzschwingungsbanden der Methylgruppen bei $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ und die Deformationsschwingungsbande der aliphatischen Methylgruppen verschwinden mit zunehmendem Grad der Fluorierung. Im Gegenzug nimmt die Bande der C-F-Bindungen im Wellenzahlbereich von $1400\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ zu. Die Valenzschwingung der Carbonylgruppe des Carbonsäureesters zeigt eine ähnliche Abnahme wie beim PMMA mit einem vergleichbaren Anstieg einer neuen Bande im direkt benachbarten, höheren Wellenzahlbereich.

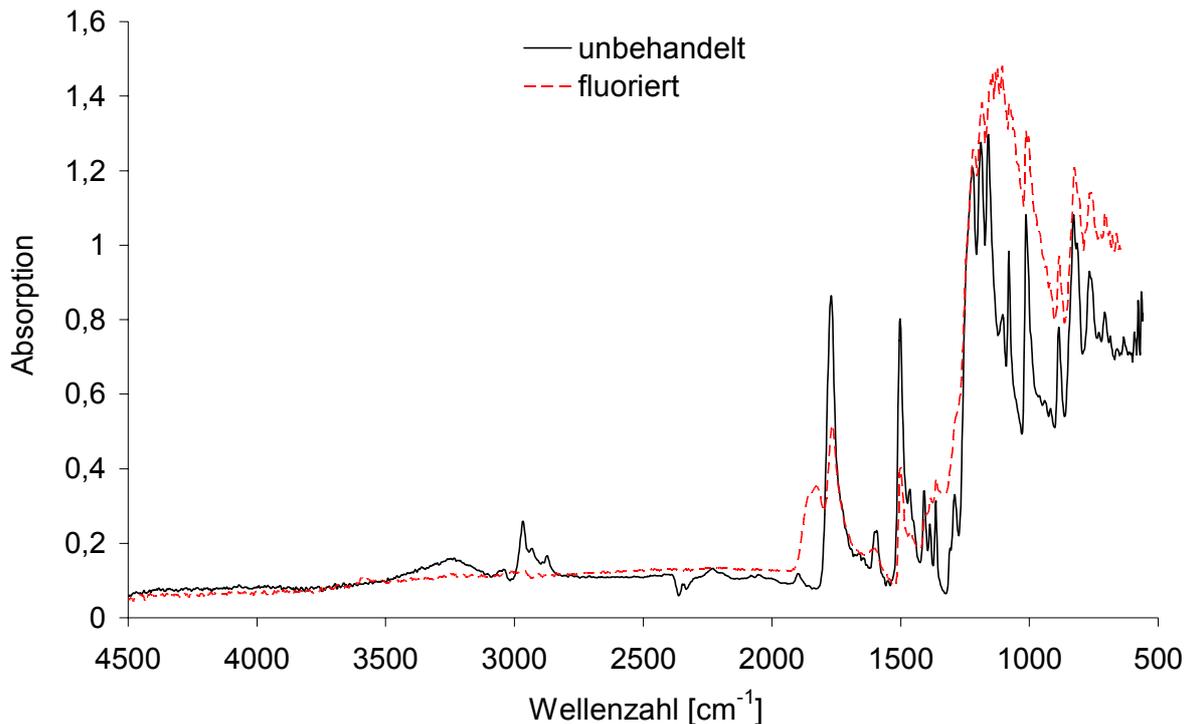


Abb. 4-7 IR-Spektren von einer unbehandelten und einer fluorierten PC-Probe (ATR).

Das Auftauchen der C-F-Schwingungsbande im Bereich $1400\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ist besonders ausgeprägt bei der Fluorierung von Cycloolefincopolymer (siehe Abb. 4-8), da in diesem Bereich das Polymer im nativen Zustand keine starke Absorption zeigt. Die Zunahme der C-F-Bande geht auch hier aufgrund der Substitutionsreaktion des Fluors mit Wasserstoff mit einer Abnahme der Valenzschwingungsbande der Methylengruppe einher. Das Entstehen einer neuen Schwingungsbande bei etwa 1850 cm^{-1} weist möglicherweise auf die Bildung einer Säurefluoridgruppe R-COF hin.

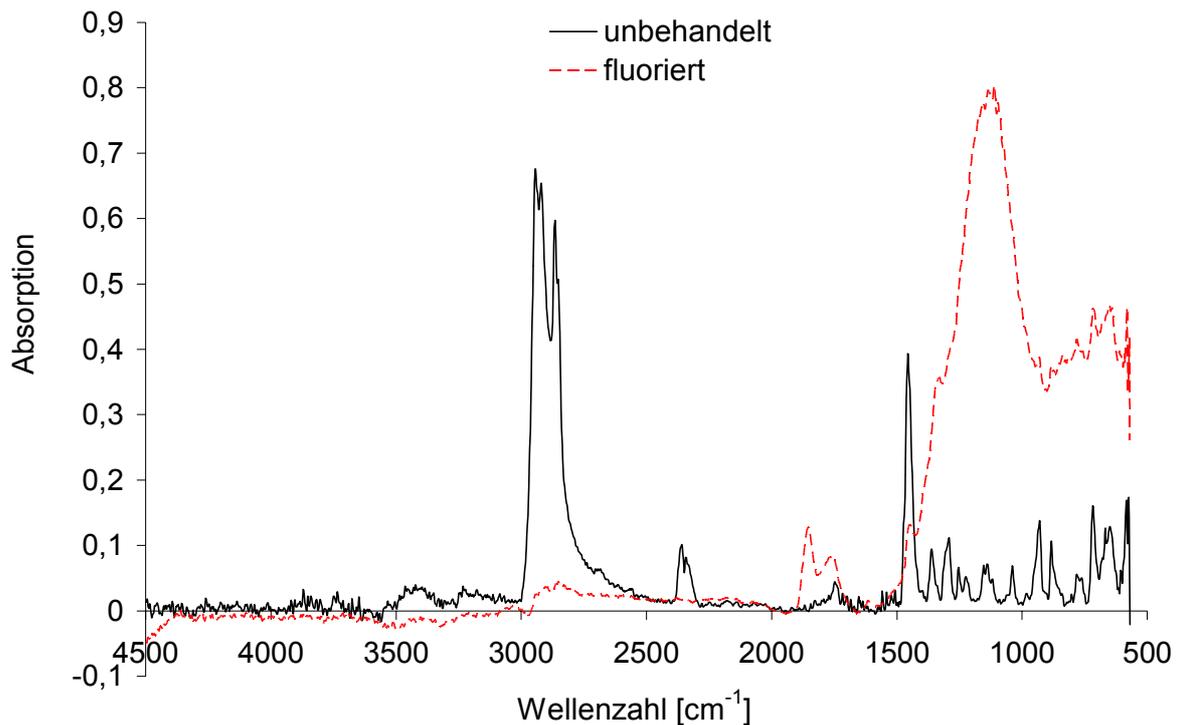


Abb. 4-8 IR-Spektren von einer unbehandelten und fluorierten COC-Probe (ATR).

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurden mit PC-Membranen verschweißte PC und PMMA Zellkulturträger unter moderaten Bedingungen fluoriert. Es wurde hierzu eine F₂:He Mischung von 1:10 bei einem Druck von etwa 65 mbar und eine Dauer von 2 h 45 min verwendet, um die Zellkulturträger an der Oberfläche zu fluorieren. Die Zellkulturträger wurden anschließend in Polyethylenbeuteln verschweißt und mit ⁶⁰Co γ -Strahlung sterilisiert. Die aus verschiedenen Materialien bestehenden Zellkulturträger wurden mit je zwei Millionen Zellen der Zelllinie Hep G2 angeimpft und über einen Zeitraum von mehr als 12 Tagen in statischer Kultur in einer Petrischale kultiviert. Unbehandelte Zellkulturträger wurden als Referenz unter den gleichen Bedingungen und mit gleicher Zellzahl parallel kultiviert. Es zeigte sich anhand lichtmikroskopischer Beobachtung, dass durch die Fluorierung keine oder sogar eine leichte Verschlechterung der Zelladhäsion im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturträgern zu beobachten war. Die Zellen bildeten vorzugsweise untereinander Zellkontakte aus, während das fluorierte Substrat gemieden wurde (siehe Abb. 4-9). Dadurch bildeten sich nahezu lose in den Mikrocontainern liegende so genannte ‚Cuboide‘ [91], die mitunter durch leichte Bewegungen des Mediums aus den Kavitäten herausgespült wurden. Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von an der Oberfläche fluorierten Polymeren auf die Vitalität bzw. die Biokompatibilität wurden aufgrund dieser Ergebnisse nicht weiter durchgeführt.

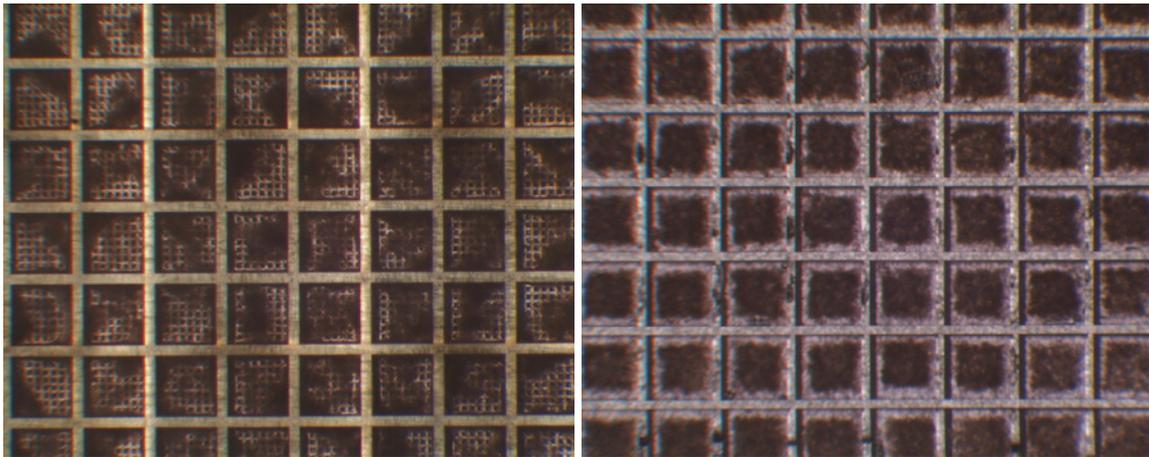


Abb. 4-9 Vergleich der Zelladhäsion von Hep G2 in einem unbehandelten, laserperforierten und in einem schwach fluorierten, Membran-gebundenen Zellkulturträger (beide PC; F₂:He Mischung 1:10, Druck: 65 mbar, Dauer: 2 h 45 min).

Die schlechte Haftung der Zellen auf den fluorierten Oberflächen kann möglicherweise auf einen chemischen Abbau der oberflächennahen Schichten des Kunststoffes durch das reaktive, elementare Fluor zurückgeführt werden. In ersten Tests konnte gezeigt werden, dass die Auslagerung der fluorierten Polymere besonders in erwärmtes Wasser (Temperatur 30–80 °C) zu einem Rückgang der durch die Fluorierung verursachten Änderungen im Spektrum führten (Spektrern nicht dargestellt). Eventuell wurde durch die Fluorierung eine hydrophile und aus kurzen Polymerketten bestehende fluorierte, wasserlösliche Schicht gebildet, so dass Zellen sich auf einer solchen nach und nach ablösenden Oberfläche nicht verankern konnten.

4.6.2 Beständigkeit UV-basierter Oberflächenmodifikationen

4.6.2.1 Lösungsmittelschweißen in der Gasphase

Der nasschemische Nachweis der eingeschränkten Beständigkeit der durch die UV-basierte Modifikationsmethode erzeugten negativen Oberflächenladungen gegenüber dem Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase wurde bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.2.11). Ausschlaggebend für die Anwendung ist jedoch nicht, ob in den bestrahlten Bereichen eine erhöhte Anzahl von Carboxylgruppen an der Oberfläche noch nachweisbar ist, sondern ob der verbliebene Kontrast zwischen unbestrahlten und bestrahlten Bereichen des Substrates ausreichend ist, damit er von auf der Oberfläche anhaftenden Zellen noch erkannt wird. Um dies zu testen wurden mikroperforierte PC-Membranen (Abmessung 2 x 2 cm²) über eine Chrom-Glas-Maske strukturiert oberflächenmodifiziert. Die Membranen wurden hierzu an Luft über einen Zeitraum von 60 min mit verschiedenen strukturierten Masken mit einer Niederdruck-Quecksilberdampflampe (Heraeus Noblelight GmbH, Kleinostheim, NNQ Lampe, Quarzröhre, 15 W) in einem Abstand von 10 cm bestrahlt. Anschließend wurden die Membranen sowohl in der Versuchsanlage als auch in der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage auf einen spritzgegossenen Zellkulturträgerrahmen ohne mikrostrukturierten Bereich mit den jeweils für die beiden oben beschriebenen Anlagen typischen Parametern (siehe oben, Kapitel 3.2.6 und Kapitel 3.2.9) gebondet.

Auf die verschweißten Teile wurden in 60 mm Petrischalen entweder L929- oder Hep G2-Zellen in unterschiedlicher Zelldichte gesät und mit 5 ml Medium im Brutschrank für mindestens 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer wässrigen Kristallviolettlösung fixiert. Die Abb. 4-10 zeigt UV-oberflächenmodifizierte PC-Membranen, die in der Versuchsanlage gebondet wurden.

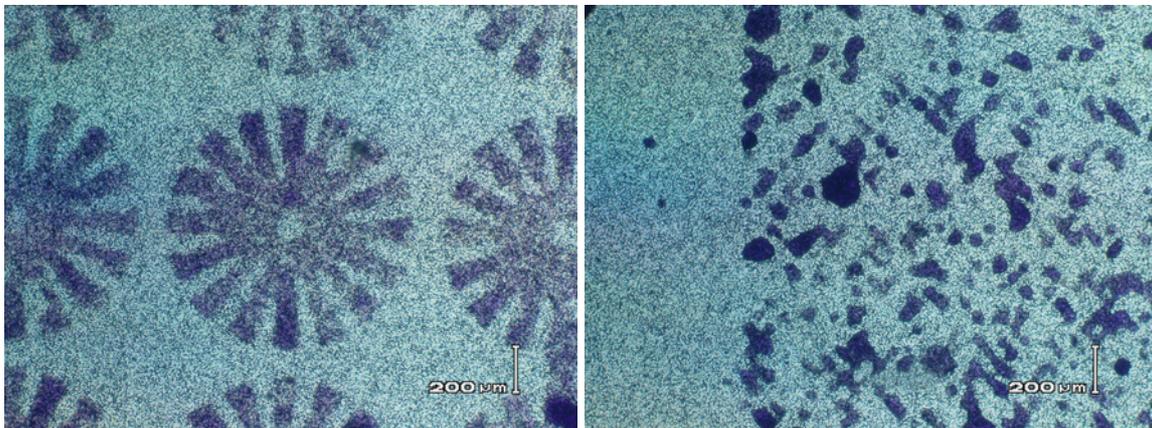


Abb. 4-10 Kristallviolett-Färbung von L929-Zellen auf mit UV-Strahlung modifizierten PC-Membranen, die in der Versuchsanlage typischen Lösungsmittelkontaktzeiten (Aceton) ausgesetzt wurden (links). Die PC-Membran in der rechten Abbildung wurde den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt, allerdings wurden ein anderes, hinsichtlich der Abmessungen jedoch vergleichbares Muster und Hep G2-Zellen verwendet.

Während das Muster im Fall der L929-Zellen relativ deutlich zu erkennen war, war es bei den Hep G2-Zellen nur leicht angedeutet. Zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Flächen war jedoch ein deutlicher Unterschied zu sehen, da auf den unbestrahlten Flächen keinerlei Hep G2-Zellen nach der Fixierung mehr auf der Oberfläche hafteten. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die L-Zellen auf den UV-modifizierten PC-Membranen, die in der teilautomatisierten Anlage verschweißst wurden (Abb. 4-11). Auch hier waren die vor dem Verschweißprozess erzeugten Muster noch für die Zellen erkennbar.

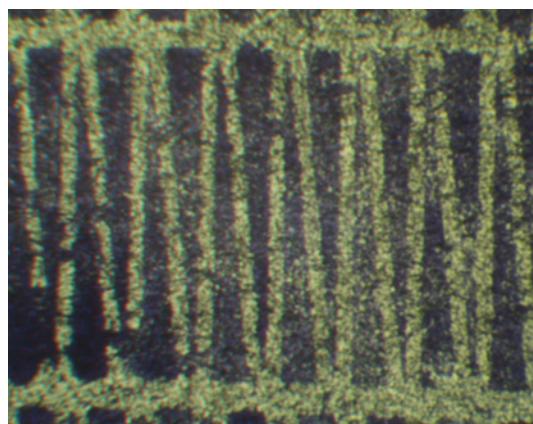


Abb. 4-11 Kultivierte und mit Kristallviolettlösung angefärbte L929-Zellen auf einer UV-oberflächenmodifizierten PC-Membran, die in der teilautomatisierten Anlage einer Lösungsmittelkontaktzeit von ca. 15 s ausgesetzt wurde.

Der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen korreliert mit der Beobachtung, dass sich Hep G2-Zellen prinzipiell schlechter auf der mikroperforierten Membran verankern konnten, so dass durch die Fixierungs- und Waschschriffe ein großer Teil der Zellen abgeschwemmt wurden und die Muster dadurch weniger deutlich erkennbar waren. Der Grund dafür, dass kein Unterschied zwischen den deutlich verschiedenen Lösungsmittelkontaktzeiten in der Versuchsanlage und in der teilautomatisierten Anlage zu sehen ist, ist ein Hinweis darauf, dass eine UV-Oberflächenmodifikation in einem Spektrenbereich von etwa 185 nm nur eine sehr dünne Oberflächenschicht des Polymers betrifft, die für einen ausreichend guten Schweißprozess in jedem Fall angelöst bzw. gequollen wird. Durch das Einwirken des Lösungsmittels erfolgt eine Mobilisierung der oberflächennahen Polymerketten, so dass sich möglicherweise ein Teil der neu erzeugten, negativ geladenen Gruppen umorientieren können und nicht mehr an der Oberfläche verfügbar sind. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass eine durch UV-Bestrahlung erzeugte Oberflächenmodifizierung vor dem Verbindungsverfahren mit Lösungsmittel in der Gasphase möglich ist, da die negative Oberflächenladungsdichte zwar durch den Lösungsmiteleinfluss abgeschwächt wird (siehe Kapitel 3.2.11), aber nach wie vor ein ausreichender Kontrast für adhärenente Zellen vorhanden ist. Auf diese Weise kann die flache mikroporöse Membran unabhängig von der spritzgegossenen Struktur vor dem Verschweißprozess mittels UV-Strahlung (strukturiert) oberflächenmodifiziert werden.

4.6.2.2 Mikrothermoformen

Neben dem Lösungsmittelschweißverfahren war das Mikrothermoformen einer der neuen zentralen Fertigungsschritte des polymeren Zellkulturträgers (siehe Kapitel 3.3.10). Hier wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt gezeigt, dass entsprechend vor dem Formvorgang auf der noch planen Folie angelegte Beschichtungsmuster und Topologien den strukturierenden Verstreckprozess prinzipiell überstehen.

Um zu prüfen ob eine vor dem Formprozess durch UV-Bestrahlung erzeugte Oberflächenmodifikation auch nach dem Prozess noch existent ist und Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Zellen nimmt, wurden flache PS-Folien (NSW, Norflex, Dicke 50 μm) mit einer Niederdruck-Dampflampe (siehe oben) über einen Zeitraum von 30 min bestrahlt. Auf das Kunststoffsubstrat wurde für die Bestrahlung eine strukturierte Chrommaske aufgelegt, um nur definierte Bereiche der Oberfläche zu modifizieren. Die Maske war in Form eines Schachbrettmusters mit einer Kantenlänge von 50 x 50 μm^2 strukturiert. Die Folien wurden anschließend mit 50 bar in einem Temperaturbereich von 106–109 °C mikrothermogeformt. Die dabei resultierende Tiefe der Kavitäten betrug etwa 240–260 μm . Die strukturierten Folien wurden mittels γ -Strahlung sterilisiert, bevor sie in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration des Isopropanols (100%, 70%, 50%, 30%, H₂O, H₂O) entlüftet und mit etwa 5×10^4 L929-Zellen beimpft wurden. Die beimpften Strukturen wurden in Petrischalen mit 5 ml Medium über mehrere Tage kultiviert. Dem Medium wurde 1 Vol.% Pluronic F68 Lösung (Sigma) zugesetzt, um die Selektivität der Adhäsion zu unterstützen [134,135]. Bereits nach wenigen Stunden zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens der Zellen in den UV-modifizierten Strukturen zu unbehandelten, ebenfalls mikrothermogeformten PS-Strukturen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert und als Referenz verwendet wurden. Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigte sich in zunehmend deutlicher Form,

dass die Zellen nur auf den bestrahlten Bereichen selektiv adhärten, ähnlich wie dies auch im zweidimensionalen Fall beobachtet wird [111] (Abb. 4-12).

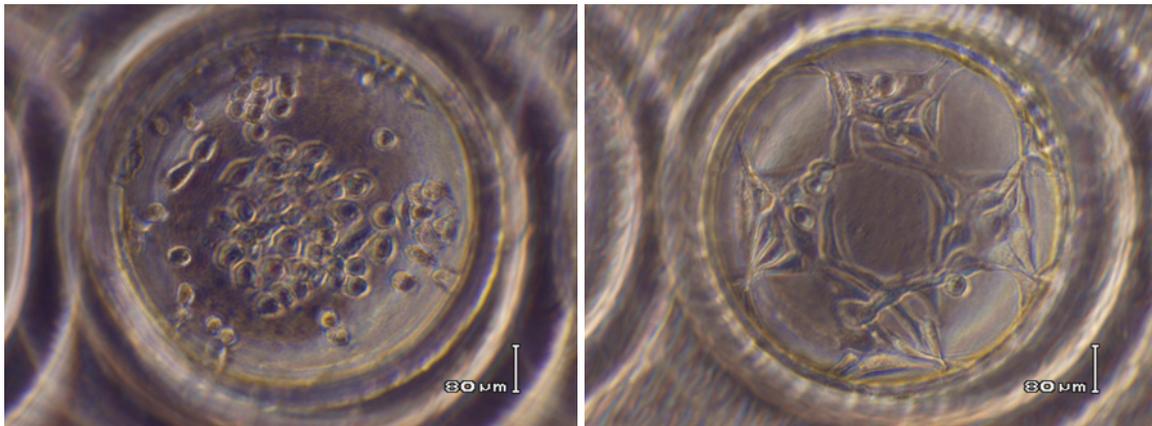


Abb. 4-12 Abbildung einzelner Mikrokavitäten von verschiedenen mikrothermogeformten PS-Zellkulturträgern am Tag 3 der Kultivierung mit etwa 5×10^4 L929-Zellen. In der linken, unbehandelten Mikrokavität adhärten die Zellen nur schlecht und unregelmäßig. Dagegen adhärten L929-Zellen in UV-modifizierten, mikrothermogeformten PS-Zellkulturträgern nur auf den bestrahlten Bereichen (rechts).

Die Zellen in den mikrothermogeformten Zellkulturträgern wurden in einer wässrigen Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt (siehe oben), um eine mikroskopische Begutachtung auch der seitlichen Wände der Mikrokavitäten zu ermöglichen (Abb. 4-13). Dabei konnte festgestellt werden, dass das Muster in allen Bereichen der Kavitätenoberfläche von den Zellen erkannt wurde. Die Geometrie der besiedelten Bereiche spiegelte dabei den Grad der Verstreckung deutlich wider.

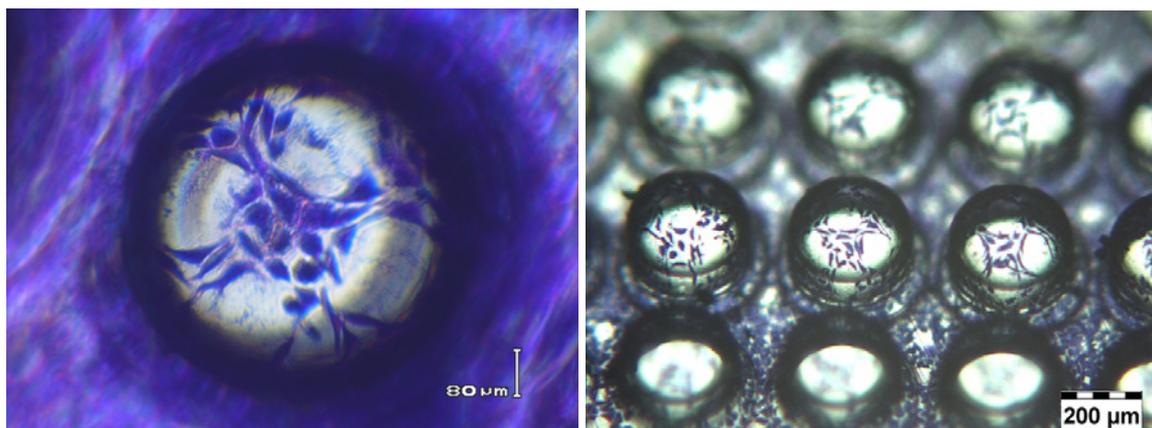


Abb. 4-13 Am Tag 4 mit Kristallviolett gefärbte und fixierte L929-Zellen in UV-oberflächenmodifizierten, mikrothermogeformten PS-Zellkulturträgern (links + rechts). Das Muster wird von den Zellen auch auf den Seitenwänden der Mikrokavitäten erkannt (rechts).

Ähnlich wie zuvor für den Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase beschrieben, ist das Mikrothermoformen geeignet, um mit dem am IBG entwickelten einfachen UV-basierten Oberflächenmodifikationsverfahren [111] kombiniert zu werden. Dabei bietet das Mikrothermoformverfahren den Vorteil, dass trotz einer dreidimensionalen Formgebung eine strukturierte Modifikation im Vorfeld auf der noch flachen Folie stattfinden kann. Dies ermöglicht die Beibehaltung des kostengünstigen, maskenbasierten Modifikationsverfahrens und erlaubt letztendlich auch die Applikation definierter und komplexer Muster auf der Folienoberfläche. Dabei muss einerseits, ähnlich wie bei einem Zerrdruck veredelter Halbzeuge für das makroskopische Thermoformen [113,136], die Verstreckung mit in die Maskengeometrie eingerechnet werden, um die nachfolgende Verzerrung des Musters zu kompensieren. Andererseits muss eine Positionierung des Folienhalbzeuges im Thermoformwerkzeug erfolgen, falls nur ausgewiesene Flächen der dreidimensionalen Mikrostruktur ein definiertes Oberflächenmuster aufweisen sollen. Des Weiteren führt die Verstreckung der gemusterten Folie sehr wahrscheinlich zu einer Verringerung der erzeugten Oberflächenladungsdichten in den bestrahlten Bereichen und damit zu einer Kontrastabnahme zwischen bestrahlten und unbestrahlten Oberflächen, so dass unter Umständen eine Anpassung der lokalen Verstreckung an das Muster erfolgen muss. Eine solche Anpassung könnte entweder durch eine Änderung der Geometrie der Mikrostruktur, z. B. durch das Einbringen von Fasen, Eckenverrundungen und Wandschrägen, erfolgen oder die lokale Verstreckung könnte durch geeignete Verstreckhilfen, z. B. Vorblasen, und/oder durch die Verwendung mikrostrukturierter Heizmuster beeinflusst werden.

4.7 Charakterisierung der Zellkulturträger-Prototypen anhand zellspezifischer Leistungen

Die biologische Validierung neuer Gerüststrukturen für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen umfasst, neben der Biokompatibilitätsprüfung, auch die Sicherstellung der entscheidend bedeutenderen Funktion der Wiederherstellung, des Erhalts oder der Verbesserung zell- und gewebespezifischer Leistungen immobilisierter Zellen in den Mikrostrukturen. Das Scaffold muss zusätzlich zu dessen Stützfunktion, zu dessen Gewährleistung einer ausreichenden Ver- und Entsorgung von Nährstoffen bzw. Metaboliten und dessen Vorgabe der Geometrie des rekonstituierten Gewebes einen wesentlichen Beitrag hinsichtlich des Differenzierungszustandes der Zellen leisten. Die Beurteilung eines solchen Zustandes kann mit unterschiedlichsten Methoden und hinsichtlich verschiedener Kriterien erfolgen. Dies richtet sich im Allgemeinen nach der vorgesehenen Anwendung des Zellkultursystems und den eingesetzten Zelltypen. In den letzten Jahren werden vermehrt Untersuchungen auf der Ebene des Genoms, des Transkriptom oder auch des Proteoms für die Beurteilung des Differenzierungszustandes von Zellen angewendet.

Primäre Hepatozyten sind insbesondere aufgrund ihres breiten Spektrums an zellspezifischen Leistungen geeignete Modelle für die Prüfung der Funktionalität einer Gerüststruktur. Leberspezifische Parameter, die aussagekräftige Differenzierungsmarker darstellen, sind im Bereich der sekretorischen Leistungen beispielsweise die Albuminsynthese, die Harnstoffsynthese sowie die Sekretion von Bilirubin, Cholesterin und Fibrinogen. Eine Charakterisierung des Zellkultursystems kann auch anhand von verschiedenen Toxizitätsmarkern erfolgen, wie z. B. der γ -Glutamyltransferase (γ -GT), der Aspartat-Aminotransferase (AST), der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Alkalische Phosphatase (AP) und der Laktatdehydroge-

nase (LDH). Die Leber stellt außerdem das zentrale Organ für den xenobiotischen Stoffwechsel dar. In der so genannten Biotransformation werden Xenobiotika durch Enzyme der Phase I oxidiert, reduziert oder hydrolysiert und durch Enzyme der Phase II konjugiert, so dass diese inaktiviert und leicht ausgeschieden werden können. Die Beurteilung der Leistungen der Zellen hinsichtlich der Biotransformation kann somit anhand der verschiedenen Enzyme der Phase I (z. B. CYP1A1 (Substrat: EROD), CYP 2B1 (Substrat: BROD), CYP2B1/2 (Substrat: PROD), CYP1A2 (Substrat: MROD), CYP2B1/2A2 (Substrat: ECOD)) und der Enzyme der Phase II (z. B. UDP-Glucuronyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT), Glutathion-S-Transferase (GST)) erfolgen. Zu einigen dieser Differenzierungsmarker gibt es inzwischen kommerzielle Testsysteme, die beispielsweise auch in der klinischen Diagnostik zur Ermittlung der Leberwerte eingesetzt werden.

4.7.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Im Rahmen der biologischen Validierung wurde die Expression von 8 bzw. 9 Monooxygenasen des Cytochrom P450 Systems (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2, CYP4A1) in dreidimensional kultivierten, primären Rattenhepatozyten quantitativ untersucht. Eine quantitative Analyse kann beispielsweise auf RNA-Ebene mittels Microarrays oder Northern Blots erfolgen, während auf DNA-Ebene eine Quantifizierung durch Hybridisierung (Southern Blot) durchgeführt werden kann. In diesem Fall wurde für die quantitative Expressionsanalyse der Isoenzyme auf RNA-Ebene ein kommerzieller Kit (Rat Cytochrome P450 Competitive RT-PCR Set + RNA LA PCR Kit Ver. 1.1, TaKaRa) für die kompetitive Reverse Transkriptase-PCR (Polymerase Chain Reaction) genutzt. Bei der kompetitiven PCR wird ein interner Standard verwendet, der, wie das Target, dieselbe Primerbindungsstelle besitzt und nahezu die gleiche Amplifikationseffizienz aufweisen sollte. Wird die Target-DNA in Anwesenheit des Kompetitors amplifiziert, so kommt es zu einer kompetitiven Nutzung der in begrenzter Menge verfügbaren Primer. Aufgrund der konkurrierenden Situation entspricht das Verhältnis der gebildeten amplifizierten Produkte (auch in der Plateauphase!) dem Verhältnis der ursprünglich vorhandenen Mengen an cDNA. Auf diese Weise kann über den, in bekannter Menge eingesetzten, internen Standard auf die Menge der Target-DNA zurückgerechnet werden. Des Weiteren kann durch eine Normierung über die Amplifikation des Cyclophilins („housekeeping gene“) trotz eventuell vorliegender Kontaminationen der Proben mit (Fremd-) DNA, degradiertes DNA oder Nukleinsäuren eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Proben hergestellt werden.

Es wurden mittels der kompetitiven RT-PCR der mRNA-Gehalt der Cytochrom P450 Isoenzyme in frisch isolierten Rattenhepatozyten direkt nach der Isolierung (Tag 0) und nach einer Kultivierungsdauer von 1, 3 und 5 Tagen in mikrothermogeformten, nicht perforierten PC-Zellkulturträgern ohne Rahmenstruktur bestimmt. Die Zellkulturträger wurden zuvor sterilisiert und mit etwa 5 µg Kollagen beschichtet. Die Strukturen wurden direkt nach der Isolation mit ca. 3×10^6 Zellen beimpft und in Petrischalen statisch kultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde das Medium entfernt und der mikrostrukturierte Bereich wurde aus der Folie ausgeschnitten. Dieser ausgeschnittene Bereich wurde für die Isolierung der Gesamt-RNA anschließend in ein Gefäß mit etwa 400 µl Lysispuffer (4M Guanidin-Isothiocyanat, 25mM Na-Citrat, 0,5% Sarkosyl, DMPC-Wasser, 0,1M β-Mercaptoethanol) gegeben und im Ultraschallbad für etwa 5 min behandelt. Danach wurde der Lysispuffer mit den vollständig lysierten Zellen abgenommen und entsprechend dem Protokoll des verwendeten Kits

(Quiagen, RNeasy® Mini Kit) aufgereinigt. Der Gesamt-RNA-Gehalt wurde in einer 1:50 Verdünnung bei 260 nm photometrisch gemessen (GeneQuant™, Amersham Biosciences). Im Anschluss an die Reverse Transkription (30 °C–10 min, 55 °C–20 min, 95 °C–5 min, 5 °C–5 min; Hybaid, MBS 0.2S), in der entsprechend des vorgegebenen Protokolls 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt wurden, erfolgte die kompetitive Amplifikation der aus der Reversen Transkription erhaltenen cDNA in 25 Zyklen (94 °C–30 s, 56 °C–30 s, 72 °C–30 s; Hybaid, MBS 0.2S). Die Auswertung der kompetitiven PCR wurde mittels CE auf einem 2100 Bioanalyzer der Fa. Agilent Technologies durchgeführt. Abb. 4-14 zeigt beispielhaft ein Gel einer gemessenen Probe am Tag 0.

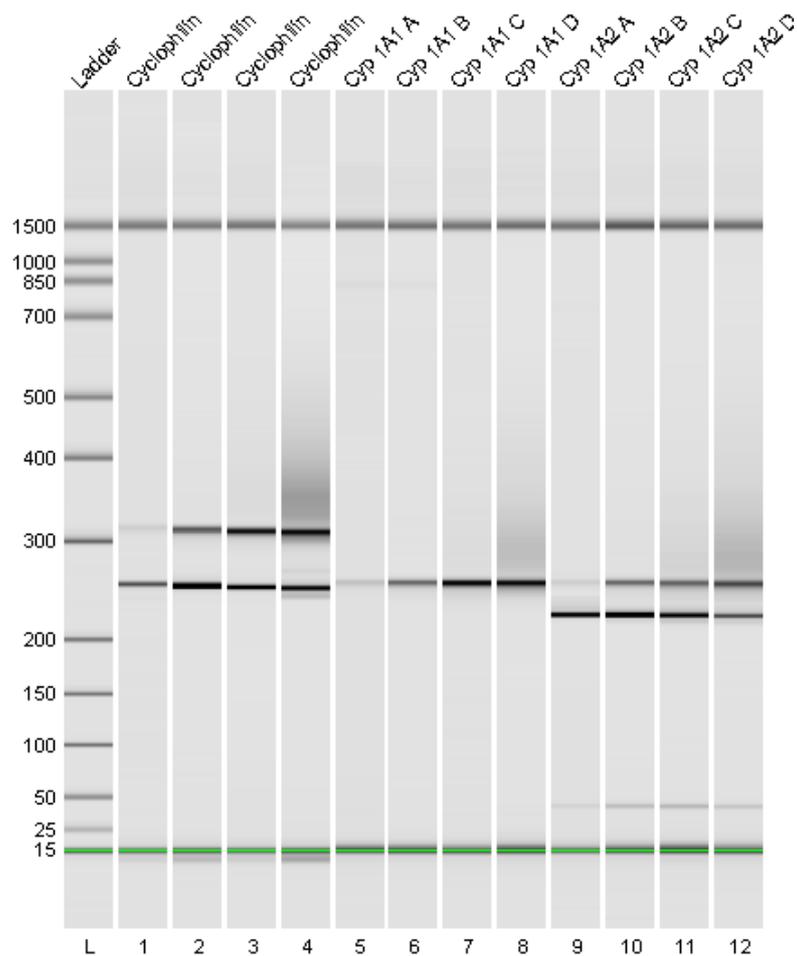


Abb. 4-14 Abbildung eines durch die Kapillarelektrophorese erhaltenen Gels einer Probe am Tag 0. In den Bahnen 1–4 wurde der interne Standard Cyclophilin bestimmt. Von den beiden aufgetragenen Isoenzymen (Cyp1A1, Cyp1A2) des Cytochrom P450-Systems war nur das Cyp1A2 (Bahnen 9–12) nachweisbar.

Die ermittelten Werte wurden anschließend über die parallel gemessenen Cyclophilin-Werte normiert, so dass ein Vergleich der Werte untereinander ermöglicht wurde. In Abb. 4-15 sind die Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR in einem gemeinsamen Diagramm dargestellt. Die ursprünglich ermittelten Cyclophilin-Werte sind unverändert zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Alle Proben wurden entsprechend des Protokolls auf den Wert des Cyclophilins am Tag 0 normiert.

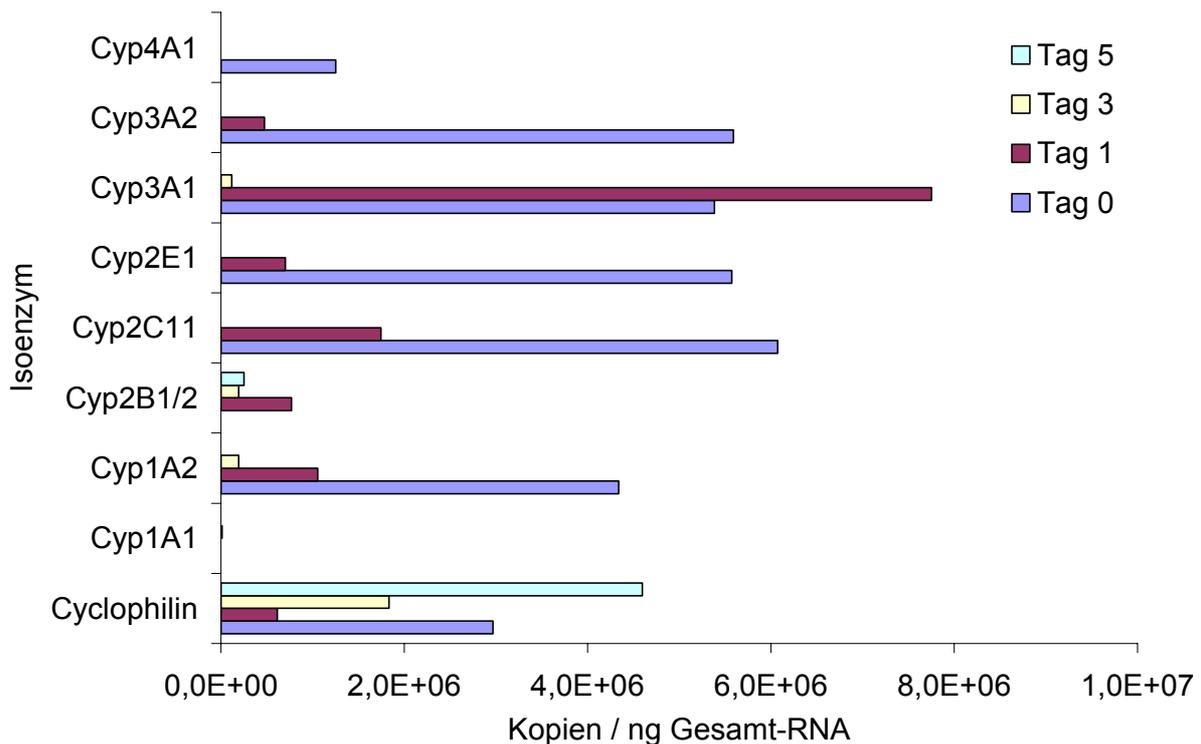


Abb. 4-15 Ursprünglich vorhandene Kopienanzahl an mRNA von 8 ausgewählten Cytochrom P450-Isoenzymen statisch kultivierter primärer Rattenheps an den Tagen 0, 1, 3 und 5.

Während in den frisch isolierten Rattenhepatozyten direkt nach der Isolation noch mRNA von etwa 5 der 9 mit dem Kit quantifizierbaren Isoenzymen des P450-Systems (CYP1A2, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2 und CYP4A1) in einer Menge von 4×10^6 – 6×10^6 Kopien pro ng Gesamt-RNA nachweisbar war, konnte mit zunehmender Dauer der Kultivierung nur noch eine kontinuierlich abnehmende Anzahl an Cytochrom P450-mRNA gemessen werden. Zusätzlich zu der abnehmenden Anzahl der einzelnen Isoenzyme nahm auch deren Anzahl der ursprünglich vorhandenen Kopien deutlich ab. Am Tag 5 konnten nur noch $2,5 \times 10^5$ Kopien pro ng Gesamt-RNA der Isoenzyme CYP2B1/2 gemessen werden.

Dieser Effekt kann wahrscheinlich auf zwei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen wurden die primären Rattenzellen ohne eine physiologische ‚Last‘ kultiviert, d. h. es wurde keine spezifische Induktion der Cytochrom P450-Monooxygenasen eingeleitet. Das Fehlen von Induktoren kann möglicherweise einen Dedifferenzierungsprozess der Zellen fördern und damit einen Rückgang spezifischer Cytochrom P450-mRNA bewirken. Andererseits weisen die vor kurzem veröffentlichten Ergebnisse einer Arbeitsgruppen daraufhin [137], dass eine Kollagenase-basierte Isolation primärer Rattenhepatozyten über verschiedene Signalwege bzw. Stimuli (MAP Kinase, NF- κ B, Hypoxie) schon bereits wenige Stunden nach der Isolierung zu einer Induzierung von Ribonukleaseaktivität und damit zum Abbau von RNA in der Zelle führt. Es ist jedoch nicht geklärt, ob es möglicherweise durch eine andauernde dreidimensionale Kultivierung der primären Rattenhepatozyten über einen Zeitraum von mehr als 5 Tagen mit einer unterstützenden Wirkung von Induktoren (Phenobarbital, Dexamethason, Ethanol, 3-Methylcholanthren etc.) zu einer verstärkten Neusynthese bzw. Hemmung des Abbaus vorhandener mRNA kommt und damit ein Redifferenzie-

rungsprozess initiiert werden kann. Weiterhin müssen hier zukünftig Variationen des Perfusionsprotokolls getestet werden, um eine Aktivierung der Ribonukleaseaktivität von vorneherein möglicherweise vermeiden oder aktiv hemmen zu können. Aufgrund dieser weit reichenden Problematik wurden keine weiteren Vergleichsmessungen bezüglich der Cytochrom P450-Isoenzyme zur Charakterisierung der neuen Zellkulturträger-Prototypen durchgeführt.

4.7.2 Albuminsekretion

4.7.2.1 Statische Kultur

Ein wichtiger und häufig untersuchter leberspezifischer Differenzierungsmarker von *in vitro* kultivierten Hep G2-Zellen ist die Synthese und Sekretion von Albumin. Dabei handelt es sich um ein zentrales Protein des Blutkreislaufsystems, das ausschließlich in der Leber synthetisiert wird. Es ist, neben den Globulinen, das wichtigste Plasmaprotein und übernimmt wichtige Transportfunktionen im Blut u. a. für nicht wasserlösliche Substanzen wie z. B. Gallensäure, Fettsäuren, Bilirubin. Darüber hinaus ist es für die Aufrechterhaltung des intravasalen kolloidosmotischen Druckes verantwortlich.

Der Nachweis des sezernierten Albumins kann mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) erfolgen. Die Methode beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion und wird in der Regel in parallelen Ansätzen auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Platte wird hierfür mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper beschichtet. Danach werden die auf Albumin zu testenden Proben in die entsprechenden Wells zugegeben. Das Albumin bindet dabei spezifisch an den, über hydrophobe Wechselwirkung an die Kunststoffoberfläche gebundenen, primären Antikörper. Bevor der sekundäre Antikörper zugegeben wird, werden in einem Waschschrift die nicht gebundenen Substanzen aus den Wells entfernt. Der mit einer Peroxidase konjugierte sekundäre Antikörper bindet spezifisch an das in den Wells gebundene Albumin. Es erfolgt ein weiterer Waschschrift bevor anschließend ein Substrat in die Wells pipettiert wird, das durch die Peroxidase enzymatisch umgesetzt wird. Diese enzymatische Reaktion führt zu einem Farbumschlag, der proportional zur vorhandenen Albuminmenge ist und photometrisch bestimmt werden kann.

Die Proben für die nachfolgend vorgestellten Albuminmessreihen wurden jeweils aus dem Überstand der Zellen entnommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nach Beendigung des Zellkulturversuchs wurden die Proben parallel auf Mikrotiterplatten mittels der zuvor beschriebenen ELISA-Methode mit einem kommerziellen Kit ausgewertet (E90-129, NatuTec GmbH).

Anhand des zentralen Differenzierungsmarkers Albumin wurde untersucht, ob das Herstellungsverfahren, die dadurch bedingte Geometrie, das verwendete Material oder eine Oberflächenbeschichtung mit Kollagen einen merklichen Effekt auf die dreidimensional kultivierten Hep G2-Zellen hat. Dafür wurden in einem ersten Versuch herkömmlich gefertigte, Membran-gebundene und mikrothermogeformte Zellkulturträger, sowohl unbehandelt als auch mit $250\text{ }\mu\text{g}$ Kollagen beschichtet, mit jeweils 2×10^6 Zellen Hep G2 beimpft und über einen Zeitraum von 17 Tagen statisch in Petrischalen kultiviert. Das Gesamtvolumen in den Petrischalen betrug jeweils 5 ml. Täglich wurde 1 ml Probe aus dem Medium entnommen und mit 1 ml frischem Medium aufgefüllt. Die dadurch stattfindende fortlaufende Verdünnung

des Albumins im Medium wurde, genauso wie die Veränderung der Konzentrationen durch die regelmäßig durchgeführten Medienwechsel, normalisiert.

Folgende Abb. 4-16 zeigt die Werte der Sekretion und Akkumulation des Albumins der in den unbehandelten Zellkulturträgern immobilisierten Hep G2-Zellen.

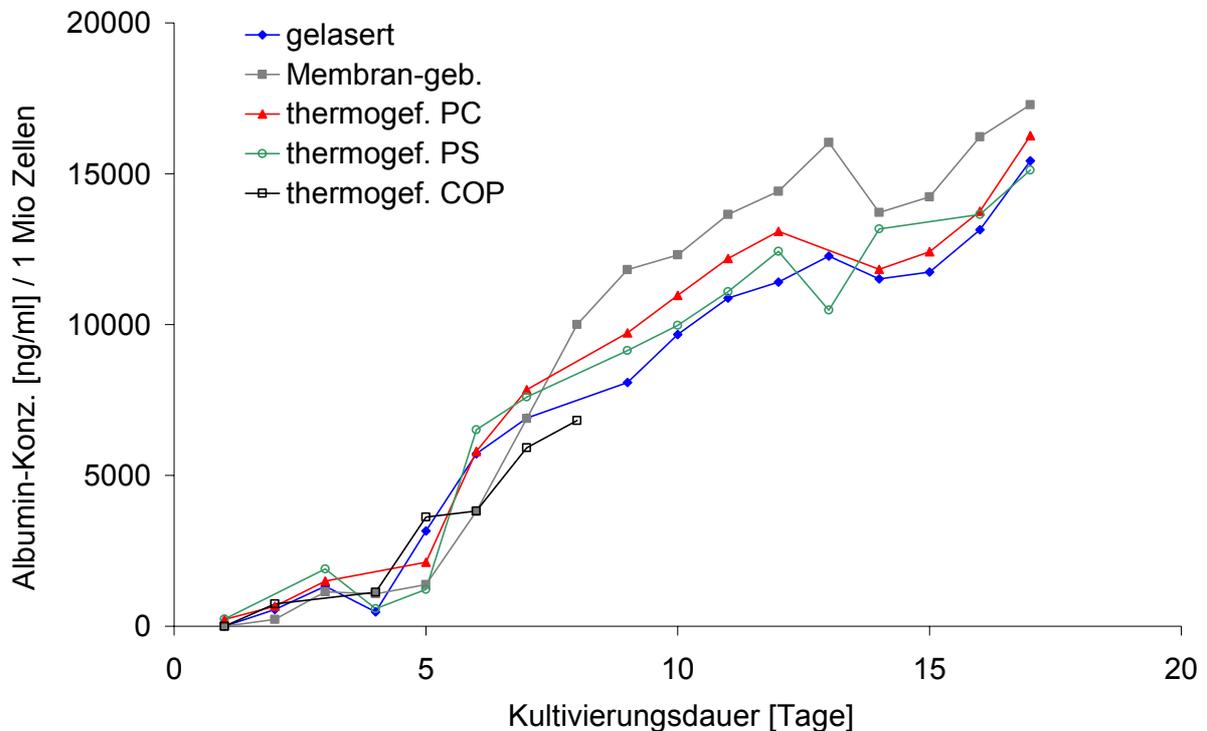


Abb. 4-16 Verlauf der Albuminkonzentrationen im Überstand von statisch kultivierten Hep G2 (2×10^6 Zellen) in **unbehandelten** und verschiedenen gefertigten Zellkulturträgern (laserperforiert, Membran-gebondet, mikrothermogeformt). Die Werte wurden auf 1 Million Zellen normiert.

In Abb. 4-17 ist die Albuminsekretion einer ursprünglich gleich großen Anzahl von Hep G2-Zellen in kollagenisierten Zellkulturträgern dargestellt. Die in beiden Diagrammen mitunter auftretenden negativen Steigungen des Albuminkonzentrationsverlaufs im Medium sind theoretisch gesehen nicht möglich und stellen wahrscheinlich Artefakte aufgrund fehlerhafter Pipettier- und Verdünnungsschritte dar. Die Werte stiegen in den ersten 6 Tagen relativ gleichförmig bis auf Werte von ca. 4000–6000 ng / 5 ml und pro 1 Million Zellen. Im anschließenden Zeitraum erfolgt eine langsame Abflachung der Kurvenverläufe und die Kurven beginnen insbesondere bei den kollagenisierten Zellkulturträger stärker zu streuen. Am 17. Tag der Kultivierung werden Werte im Bereich von 15000–17000 ng / 5 ml und pro 1 Million Zellen in den unbehandelten und etwa 12000–20000 ng / 5 ml und pro 1 Million Zellen in den kollagenisierten Zellkulturträgern erreicht.

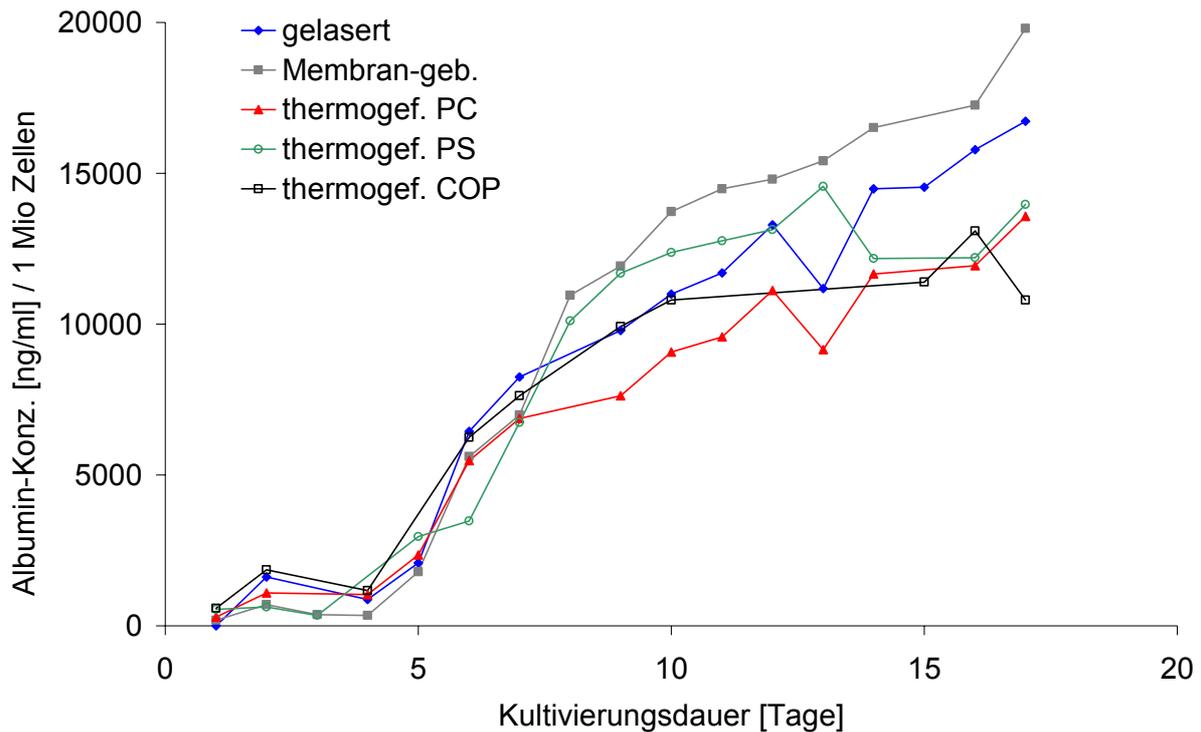


Abb. 4-17 Verlauf der Albuminkonzentrationen im Überstand von statisch kultivierten Hep G2 (2×10^6 Zellen) in **kollagenisierten** und verschiedenen gefertigten Zellkulturträgern (laserperforiert, Membran-gebondet, mikrothermogeformt). Die Werte wurden auf 1 Million Zellen normiert.

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Zellkulturträgertypen innerhalb der beiden Diagramme zeigte somit keinen wesentlichen Unterschied hinsichtlich des Verlaufs und der absoluten Höhe der Albuminkonzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. In gleicher Weise war beim Vergleich zwischen den unbehandelten und kollagenisierten Zellkulturträgern keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich der Albuminproduktion der Zellen festzustellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die hier getesteten unterschiedlichen Zellkulturträger und die verwendeten Materialien zumindest auf diesen zentralen Differenzierungsmarker keinen unterscheidbaren Einfluss nehmen. Weiterhin scheint zwar aufgrund lichtmikroskopischer Beobachtungen eine Kollagenisierung die Adhäsion der Zellen auf den Kunststoffoberflächen deutlich zu begünstigen, eine Beeinflussung der Zellen hinsichtlich der Albuminsynthese konnte mit diesem Versuch jedoch nicht gezeigt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit die Zelldichte in einem solchen Zellkulturträger in einer statischen Kultur Einfluss auf das Verhalten und den Zustand von Zellen nimmt. Eine Kultivierung in einem ruhenden Medium ist in der Regel mit der Problematik behaftet, dass eine Vergiftung der Zellen durch die lokale Akkumulation von eigenen Stoffwechselprodukten auftreten kann. Zusätzlich müssen die Zellen allein über Diffusionsprozesse versorgt werden, so dass eventuell Zellen innerhalb von Aggregaten ungenügend mit Gasen und Nährstoffen versorgt werden. Hierzu wurden sowohl Membran-gebundene PMMA- als auch thermogeformte PC-Zellkulturträger (nicht perforiert) mit einer geringen Zellzahl (9×10^5 Hep G2) und mit einer vergleichsweise großen Zellzahl (3×10^6 Hep G2) beimpft und in einem parallelen Versuchsansatz hinsichtlich der Albuminsekretion miteinan-

der verglichen. Als Referenz wurde eine Standard-Gewebekulturschale aus Polystyrol ebenfalls mit 9×10^5 Hep G2 unter gleichen Bedingungen im Brutschrank über 9 Tage kultiviert. Petrischalenboden und die mikrostrukturierten Oberflächen der Zellkulturträger wurden so kollagenisiert (Petrischale: 30 μg ; Zellkulturträger: 5 μg), dass sie mit einer vergleichbaren Kollagenmenge pro Flächeneinheit beschichtet waren. Die Zellen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 5 ml Medium kultiviert und für die Bestimmung der Albuminkonzentration wurde jeweils 1 ml Medium entnommen und 1 ml frisches Medium zugegeben. Die nachstehende Abbildung (Abb. 4-18) zeigt die im Überstand zunehmende Konzentration des Albumins über den Zeitraum von 9 Tagen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 3 Ansätzen und wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen normiert.

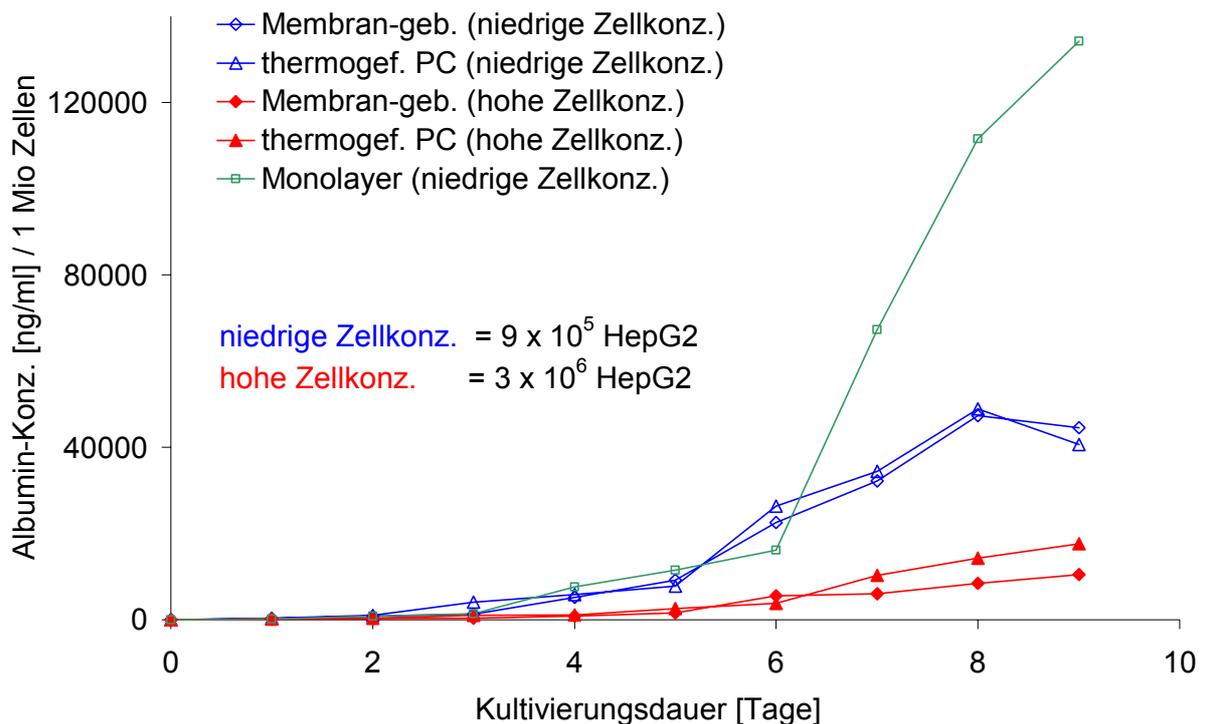


Abb. 4-18 Albuminsekretion von in unterschiedlicher Dichte und in verschieden gefertigten Zellkulturträgern ausgesäten Hep G2. Die Zellen wurden statisch über einen Zeitraum von 9 Tagen kultiviert. Zum Vergleich wurde die Albuminsekretion von in Monoschichten kultivierten Hep G2 aufgetragen. Die Werte stellen jeweils einen Mittelwert aus drei Ansätzen dar und wurden auf 1 Million Zellen normiert.

Der Vergleich zwischen den Membran-gebondeten und den mikrothermogeformten Zellkulturträgern bei jeweils der gleichen ursprünglichen Zellzahl zeigt keinen auffälligen Unterschied im Hinblick auf die Albuminsekretion der Zellen. Jedoch zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei beiden Zellkulturträgertypen wenn eine unterschiedliche Anzahl von Zellen beimpft wurde. Überraschend ist hierbei, dass eine mehr als dreimal so hohe ursprüngliche Zellzahl in beiden Fällen zu einer nur etwa halb so hohen messbaren Albuminkonzentration im Mediumüberstand im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 9 führte. Im Vergleich dazu nahm die Albuminproduktion der Zellen, die in Form eines Monolayers in kollagenisierten Petrischalen kultiviert wurden, etwa ab dem 6. Tag deutlich zu und erreichte einen, im Vergleich zu den Zellkulturträgern mit der gleichen Zellzahl von 9×10^5 , etwa dreifach so hohen Endwert nach

einer Kultivierungsdauer von 9 Tagen. Der auffällige Anstieg ab dem 6. Tag fällt ungefähr mit dem Zeitpunkt des Erreichens der Konfluenz zusammen. Die Ergebnisse deuten möglicherweise daraufhin, dass die geringere Albuminsekretion in den Zellkulturträgern im Vergleich zur Monolayerkultur auf eine generell schlechtere Versorgung und eine daraus resultierende verminderte Stoffwechselaktivität der Zellen in den Mikrokavitäten bei einer statischen Kultivierung zurückzuführen ist. Dies würde auch die verminderte Albuminsekretion in den Zellkulturträgern mit den ursprünglich höheren Zellzahlen erklären, da hier aufgrund der hohen Zelldichte eine verminderte Versorgung von Nährstoffen bzw. Gasen und eine verschlechterte Entsorgung von Metaboliten durch Diffusion zu einer stärkeren physiologischen Belastung der Zellen bei einer statischen Kultivierung führen.

4.7.2.2 Perfundierte Zellkulturträger im Bioreaktor

Da die Versorgung der Zellen im Fall einer statischen Kultivierung allein über die Diffusion offensichtlich keine optimalen Bedingungen für die Zellen darstellten, wurden Versuche mit den beiden neuen Zellkulturträgertypen (Membran-gebondet und mikrothermogeformt) im Bioreaktorsystem durchgeführt (siehe auch Kapitel 4.3). Die Zellen wurden hierbei ab dem Zeitpunkt des Einbaus der Zellkulturträger in das Bioreaktorgehäuse (etwa 4 h nach der Beimpfung) mit Medium perfundiert. Das Medium wurde von der Rückseite mit einem Volumenstrom von 56,5 µl/min durch die Zellkulturträger gepumpt. Das Medium wurde in der Vorlage steril mit einer definierten Gasmischung (80% N₂, 5% CO₂, 20% O₂ bei jeweils 10 sccm) begast.

Nachstehende Abb. 4-19 zeigt den Verlauf der Albuminkonzentration im Medium während des Perfusionsversuchs über einen Zeitraum von 19 Tagen. Die Zellkulturträger wurden mit 5 µg Kollagen beschichtet bevor sie anschließend mit 3×10^6 Zellen Hep G2 beimpft wurden. Für die Bestimmung der Albuminkonzentration wurde in regelmäßigen Abständen 1 ml Medium entnommen und 1 ml frisches Medium zugesetzt. Am 5. Tag der Kultivierung wurde ein vollständiger und am 12. Tag ein halber Mediumwechsel durchgeführt. Die Gesamtmenge des Mediums betrug 25 ml und die in Abb. 4-19 dargestellten Werte sind hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit den vorangehenden Versuchen in statischer Kultur auf 5 ml Mediummenge umgerechnet.

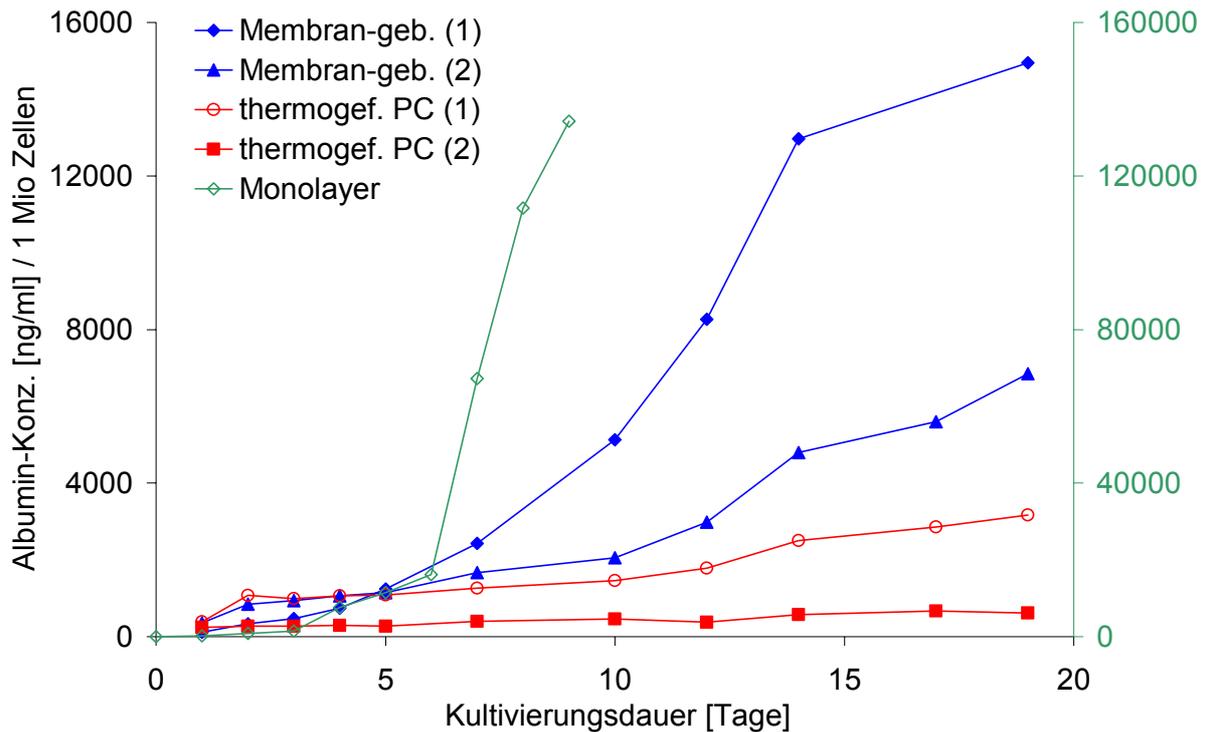


Abb. 4-19 Albuminsekretion von im Bioreaktorsystem mit Nährmedium perfundierten Hep G2 (3×10^6 Zellen). Die Zellen wurden in verschiedenen, kollagenisierten Zellkulturträgern gezüchtet (Membran-gebondet, mikrothermogeformt/perforiert). Als Vergleich wurden die Werte der Monolayerkultur aufgetragen (Sekundärachse).

Das folgende Diagramm (Abb. 4-20) gibt die ermittelten Messwerte der Albuminkonzentrationen eines zweiten Perfusionsversuchs über einen Zeitraum von 22 Tagen wider. Die Zellkulturträger wurden in diesem Fall mit $30 \mu\text{g}$ Kollagen beschichtet und mit 2×10^6 Zellen Hep G2 beimpft. Neben der jeweiligen Entnahme von 1,5 ml Probe und der Zugabe von 1,5 ml frischem Medium für die Albuminwertbestimmung wurde kein zusätzlicher Mediumwechsel durchgeführt. Die Werte wurden ebenfalls aus Gründen der Vergleichbarkeit von einem Medium-Gesamtvolumen von 25 ml auf 5 ml umgerechnet.

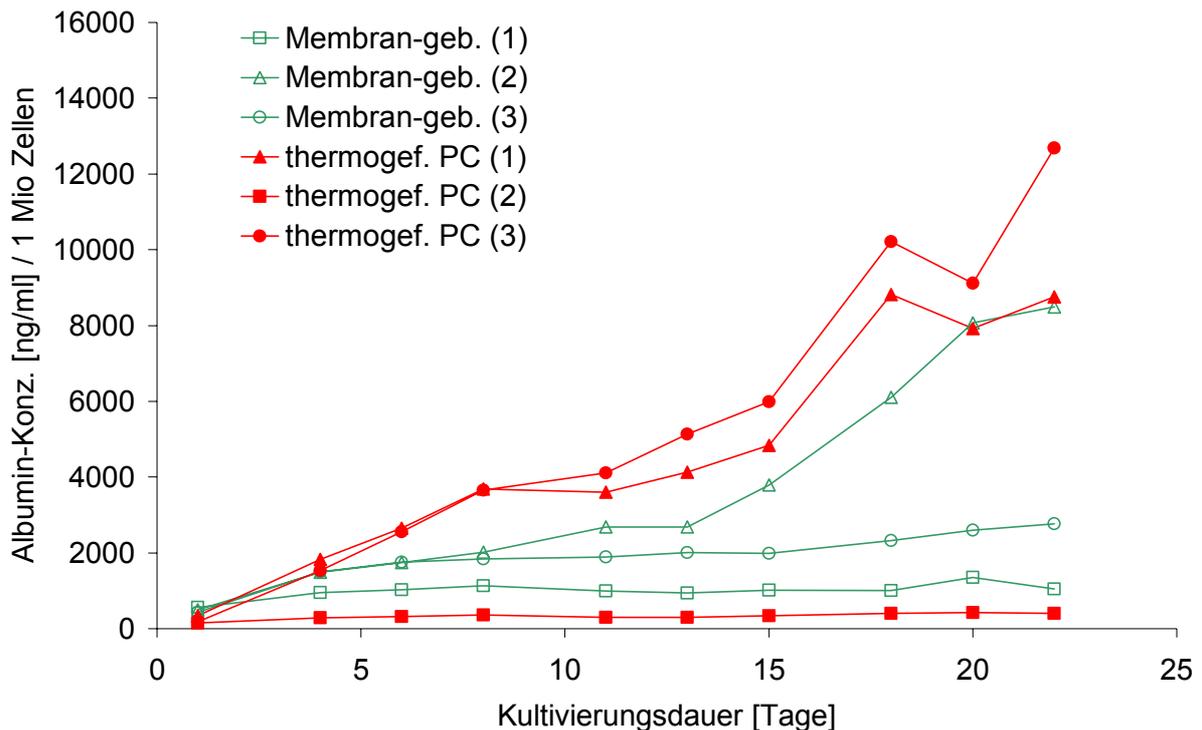


Abb. 4-20 Albuminsekretion von im Bioreaktor perfundierten Hep G2 (2×10^6 Zellen) in kollagenisierten, Membran-gebondeten und mikrothermogeformten Zellkulturträgern.

In beiden vorstehenden Diagrammen sind Kurvenverläufe zu sehen, die nur einen sehr geringen Anstieg der Albuminkonzentration über den gesamten Zeitraum der Kultivierung aufweisen. Hier wurden nur Konzentrationen bis zu 2000 ng / 5 ml und pro 1 Million Zellen gemessen. Dies korreliert in der Regel sehr gut mit den parallel durchgeführten lichtmikroskopischen Beobachtungen, die zeigten, dass in diesen Zellkulturträgern ein Großteil der Zellen durch den Einbau in das Bioreaktorgehäuse und durch das Verdrängen der Luft aus dem Gehäuse mit Medium verloren gingen. Die anderen Kurven der beiden Zellkulturträgertypen zeigten bei lichtmikroskopisch vergleichbarem Füllgrad der Mikrokavitäten in beiden Versuchen einen ähnlichen Anstieg auf Endwerte im Bereich von ca. 7000–15000 ng / 5 ml und pro 1 Million Zellen. Ein deutlicher Unterschied war anhand dieser einzelnen auswertbaren Messungen zwischen den verschiedenen Zellkulturträgertypen nicht zu erkennen. Diese Werte sind jedoch deutlich niedriger als die, die bei der statischen Kultivierung in Petrischalen bei vergleichbarer Kultivierungsdauer gemessen wurden (vgl. z. B. Abb. 4-16). Im Fall der mikrothermogeformten Zellkulturträger des zweiten Perfusionsversuchs wurde nach dem Ausbau der Zellkulturträger aus dem Bioreaktorgehäuse am 22. Versuchstag festgestellt, dass ein Großteil der Zellen aufgrund zu groß geätzter Poren auf die Rückseite der Struktur migrierten und dort in Gewebeschichten kultiviert wurden. Weiterhin konnte lichtmikroskopisch in beiden letztgenannten Versuchen eine stärkere Proliferation der Zellen in den Membran-gebondeten Zellkulturträgern festgestellt werden.

5 Diskussion

Diskussion des Prinzips Chipformat gegenüber anderen dreidimensionalen Zellkultivierungsstrategien

Das am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte Bioreaktorsystem zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellen bzw. Zellaggregaten basiert auf dem zentralen Element eines mikrostrukturierten, polymeren Zellkulturträgers im Chipformat [12]. Es stellt daher einen deutlich unterschiedlichen Ansatz im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Strategien der dreidimensionalen Kultivierung dar. Diese Strategien, die beispielsweise für den Aufbau extrakorporaler Organunterstützungssysteme, für die Antikörpergewinnung oder in der Tumorforschung eingesetzt werden, können in der Regel den folgenden Typen zugeordnet werden: den gelbasierten Flachbettreaktoren, den kapselbasierten Kultursystemen, den Hohlfasersystemen, Systemen basierend auf perfundierten, schaumartigen oder textilen Scaffolds und den freischwimmenden Sphäroiden (siehe Abb. 5-1).

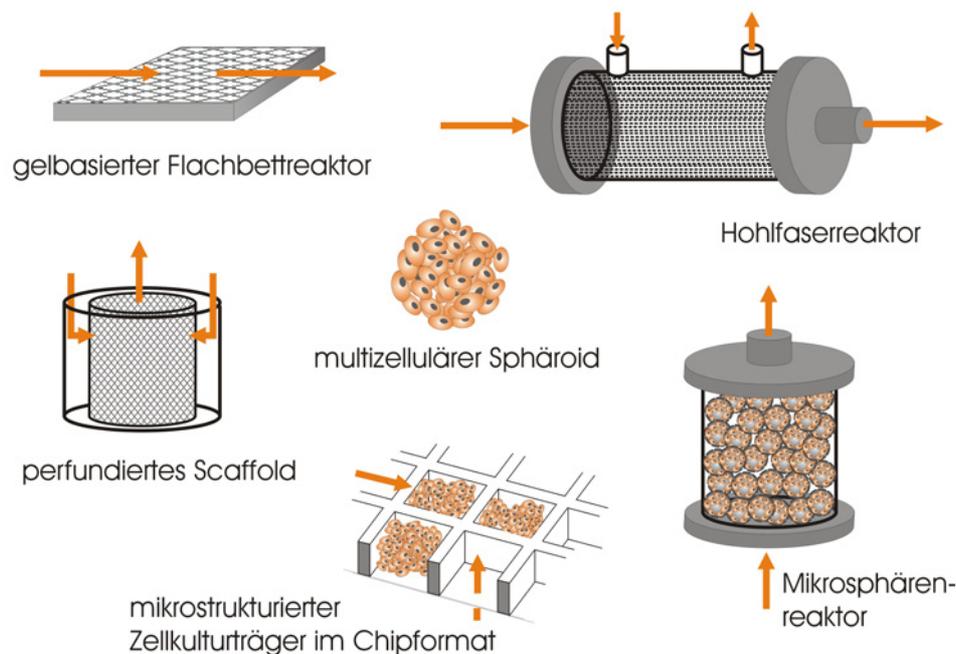


Abb. 5-1 Schematische Darstellung verschiedener, dreidimensionaler Zellkultivierungsstrategien (verändert nach [138]).

Flachbettreaktoren beruhen in der Regel entweder auf der Kultivierung von flächig ausgedehnten Monolayer-Schichten [139] oder auf in Gel eingebetteten, dreidimensionalen, gewebsähnlichen Zellschichten [67], deren Dicke durch die des (Kollagen-) Gels, in das die Zellen eingegossen werden, bestimmt wird. In der Regel erfolgt eine Versorgung der Zellen durch Diffusion aus dem über der Zellschicht strömenden Medium. Um die Versorgungswege von in Gel eingegossenen Zellen gering zu halten, muss dieses sehr dünn sein, so dass eine großflächige Ausdehnung zur Erzielung hoher Zellzahlen erforderlich ist. Eine großflächige Ausdehnung führt aber unweigerlich zu einer seriellen Versorgungssituation, bei der Zellen am Ende des Versorgungsweges eine andere Zusammensetzung des Mediums

sehen, als die Zellen zu Beginn. Mit zunehmend überströmter Fläche der Zellschicht im Reaktor kommt es zu einer zunehmenden Verarmung des Mediums an Nährstoffen, bei einer gleichzeitigen Anreicherung von Stoffwechselprodukten durch die Zellen. Dies führt zu einer ungleichmäßigen Ver- und Entsorgungssituation für die Zellen. Während dessen kann in einer solchen Anordnung eine gleichmäßige Gasversorgung durch eine flächige und parallel durchgeführte Oxygenierung, beispielsweise durch eine gasdurchlässige Membran [67], gewährleistet werden.

Im Fall der kapselbasierten Kultursysteme werden die zu kultivierenden Zellen in poröse Hohlkugeln mit definiertem Durchmesser eingeschlossen. Diese Kugeln werden entweder dicht gepackt („fixed bed“) oder suspensions-ähnlich („fluidized bed“) in einem Bioreaktorgehäuse mit Medium durchströmt [138,140]. Ein wesentlicher Nachteil dieses Typs ist, dass keine definierten chemischen oder physikalischen Gradienten über den Zellaggregaten aufgebaut werden können. Des Weiteren erfolgt hier ebenfalls eine serielle Anströmung der Zellaggregate in den einzelnen Hohlkugeln, so dass es zu einer Verarmung der Nährstoffe bei gleichzeitiger Anreicherung von Metaboliten im Medium entlang des Strömungspfad es kommt. Im Fall von Bioreaktoren mit dicht gepackten Hohlkugeln wurde in praktischen Versuchen bereits die Ausbildung präferierter Strömungswege beobachtet, so dass unterschiedlich gut versorgte Teilbereiche im Reaktor entstehen [138,141]. In einem „fluidized bed“-Reaktor besteht dahingegen das Problem, dass sich Kapseln in Totwasserzonen sammeln können und damit auf Dauer nicht ausreichend mit frischem Medium versorgt werden. Weiterhin können sich, aufgrund der Relativbewegung zwischen Medium, Bioreaktorgehäuse und Hohlkugeln [141], im Inneren der porösen Mikrosphären keine definierten und kontrollierten Strömungsverhältnisse ausbilden, wodurch ständig wechselnde Verhältnisse für die Zellen vorliegen.

Ein sehr häufig eingesetzter Bioreaktortyp ist das so genannte Hohlfasersystem. Diese Bioreaktoren bestehen in der Regel aus einem Gehäuse, das von einem Bündel mikroporöser Hohlfasern durchzogen wird. Komplexer gestaltete Hohlfaserreaktoren können dabei aus mehreren Gruppen von Hohlfasern aufgebaut werden, wobei jede Gruppe eine eigene Funktion, wie z. B. den Plasmadurchfluss, den Gasaustausch oder die Nährstoffversorgung, übernimmt [142,143]. Die Zellen können bei einem Hohlfaserreaktor entweder im Raum zwischen den Fasern oder im Lumen der Faser lokalisiert sein. Im ersten Fall wird das Medium aktiv durch die Faser und im zweiten Fall aktiv durch die Zwischenräume gepumpt. Der erste Fall bietet dahingehend einen Vorteil, dass in den Zwischenräumen eine größere Kontaktfläche für die Verankerung der Zellen zur Verfügung steht. Ähnlich wie zu den zuvor genannten Systemen erfolgt auch hier eine serielle Anströmung der im Bioreaktor befindlichen Zellen, so dass eine graduelle Veränderung der Zusammensetzung des Mediums über die Länge des Strömungspfad es stattfindet. Weiterhin besitzen diese Systeme den Nachteil, dass insbesondere die Zwischenräume, aufgrund der losen Faserführung im Inneren des Bioreaktorgehäuses, keine definierten Volumen begrenzen. Dadurch kann die Größe der sich ausbildenden Zellaggregate nur eingeschränkt kontrolliert werden. Zu große Zwischenräume bedingen unter Umständen zu lange Versorgungswege, so dass ein Entstehen von nekrotischen Bereichen im Inneren der Zellaggregate nicht verhindert werden kann. Die mögliche Ausbildung unkontrollierter Totwasserbereiche behindert zudem den zügigen Abtransport von Stoffwechselprodukten. Die zellnahe Akkumulation von Metaboliten kann zu einer Toxifikation der Zellen führen.

Diese letztgenannten Argumente treffen in ähnlicher Weise auch auf die Bioreaktorsysteme zu, die auf der Perfusion von schaumartigen oder textilen Scaffolds basieren. Sie besitzen zwar den Vorteil, sehr große Oberflächen für die Verankerung von Zellen zur Verfügung zu stellen, jedoch können in der Regel die kapillaren Zwischenräume nach dem momentanen Stand der Technik, wie bereits mehrfach angeführt, hinsichtlich ihrer Größe, Form und/oder Porosität nicht exakt definiert werden. Inhomogenitäten im Scaffold hinsichtlich des Strömungswiderstandes führen auch hier zur Ausbildung von ausgewählten Strömungspfaden und damit zu unterschiedlich gut versorgten Teilregionen. Eine Adressierung der kapillaren Hohlstrukturen, z. B. im Fall einer histologischen Begutachtung immobilisierter Zellaggregate, kann nur anhand von Querschnitten des Scaffolds durchgeführt werden.

Dreidimensionale Kulturen werden heutzutage häufig in Form von so genannten multizellulären (Tumor-) Sphäroiden für sehr unterschiedliche Verwendungszwecke genutzt (Tumorforschung, Erforschung von Angiogenese etc.). Sie werden u. a. als Standardgewebemodelle für zellbasierte Hochdurchsatztests in der pharmazeutischen Forschung diskutiert [8]. Zellen können mit unterschiedlichen Methoden, z. B. Spinnerkulturen oder ‚hanging drop‘, zu dreidimensionalen, kugelförmigen Zellhaufen definierter Größe aggregiert werden. Die multizellulären Sphäroide werden in der Regel freischwimmend, ähnlich einer Suspension, kultiviert. Aufgrund der fehlenden Immobilisierung der Sphäroide sind jedoch keine definierten physikalischen und chemischen Gradienten innerhalb der Aggregate realisierbar. Der Wechsel von aufeinander folgenden und unterschiedlich zusammengesetzten bzw. unterschiedlich konzentrierten Medien ermöglicht nur zeitlich limitierte, radiär gerichtete Gradienten, die sich infolge der Diffusionsprozesse mit der Zeit ausgleichen. Die Größe der multizellulären Sphäroide ist beschränkt, da keine aktive Durchströmung der Zellaggregate möglich ist. Die Überschreitung einer kritischen Größe, die von verschiedenen Parametern (z. B. Zelltyp, Zusammensetzung des Mediums) abhängt, führt zum Auftreten zentraler Nekrosen. Darüber hinaus fehlt diesem Modellsystem eine elementare Eigenschaft natürlicher Gewebe, die räumliche Begrenzung z. B. durch benachbarte Gewebe oder Stütz- bzw. Leitstrukturen.

Im Gegensatz zu den oben genannten Kultivierungssystemen besitzt das chipbasierte System des Forschungszentrums Karlsruhe einige bedeutende Vorteile. So ermöglicht die definierte und regelmäßige Kompartimentierung des Zellkulturträgers in flächig angeordnete Mikrocontainer prinzipiell eine Adressierung der einzelnen Zellcontainer, z. B. hinsichtlich einer lichtmikroskopischen Beobachtung oder einer Probenzugabe bzw. -entnahme. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, dass aufgrund des Chipformats des Zellkulturträgers sehr einfach zwischen verschiedenen Strömungsvarianten, z. B. Superfusion oder Perfusion, gewechselt werden kann. Hierzu ist lediglich eine Umschaltung der fluidischen Anschlüsse zu den Kammern ober- und unterhalb des Zellkulturträgers des Bioreaktors durchzuführen. Das Bioreaktordesign in Kombination mit dem Zellkulturträger ermöglicht zudem eine exakte Einstellung der versorgenden Volumenströme. Die modulartige Bauweise gestattet eine einfache und variable Skalierung des Systems mit hohen Zelldichten [144]. Schließlich können aufgrund der unabhängigen fluidischen Ansteuerung der ober- und unterhalb des Zellkulturträgers befindlichen Kammern langzeitstabile, definierte chemische und/oder physikalische Gradienten über der Gewebeschicht realisiert werden. Diese Eigenschaften bilden die Grundlage für die sehr breit angelegten und angestrebten Anwendungsfelder dieses chipbasierten Bioreaktorsystems. Als Gewebekulturplattform soll es u. a. für Fragestellungen im Bereich der Grundlagenforschung (Reifungs- und Differenzierungsprozesse,

Angiogenese etc.), der pharmazeutischen Forschung (z. B. Wirkstoffentwicklung, pharmakotoxikologische Tests), für den Aufbau extrakorporaler Organunterstützungssysteme, für die Stammzellexpansion und eventuell für den Ersatz von Tierversuchen dienen. Aufgrund der vielfältigen Vorteile eines Bioreaktorsystems, basierend auf einem mikrostrukturierten Zellkulturträger im Chipformat, wurde dieses grundlegende Konzept auch für die hier vorgestellten Arbeiten weiterverfolgt. Die Außenabmessung des Zellkulturträgers wurde mit 20 x 20 mm² zunächst beibehalten, so dass die neu entwickelten Strukturen im bestehenden Bioreaktor unter reproduzierbaren Bedingungen untersucht und validiert werden konnten.

Innerhalb der kurzfristigen Strategie wurde eine möglichst schnell realisierbare Vereinfachung des bestehenden herkömmlichen Fertigungsprozesses angestrebt, um zumindest den Eigenbedarf an Zellkulturträgern für Labortests möglichst rasch zu decken. Aufgrund der Tatsache, dass der mikrostrukturierte Boden durch eine mikroperforierte Membran ersetzt werden sollte, um den sehr aufwändigen Prozess der Lasermikroperforation zu eliminieren, konnte ein vereinfachtes Formeinsatzdesign für den Spritzgussprozess entwickelt werden. Sowohl die mikromechanische Fertigung des Formeinsatzes aus Messing als auch der Spritzgussprozess wurden durch den Wegfall des mikrostrukturierten Bodens in den Mikrokontainern vereinfacht. Weiterhin könnte theoretisch, aufgrund des geringeren Anspruchs auf Präzision hinsichtlich der Planarität und der verbleibenden Dicke, der beim Mikrospritzguss unvermeidbar auftretenden Restschicht, ein schnelleres Nachbearbeiten des Zellkulturträgers erfolgen. Damit wäre eine Verkürzung des bisher zeitintensivsten Arbeitsschrittes prinzipiell möglich. Der Vorhalt von 100 µm in der Containerwandhöhe des neuen Designs reduzierte außerdem nicht nur die Anforderung hinsichtlich der Präzision des AbfräSENS, sondern gestattete auch ein sicheres und vollständiges Entfernen der Restschicht aus den Mikrocontainern. Durch das vereinfachte Design konnte somit die Prozesssicherheit gesteigert und damit nach Einschätzungen des bearbeitenden Personals die Menge an Ausschussteilen reduziert werden. Die neu entwickelte Lösungsmittelschweißanlage ermöglichte zudem eine, aufgrund der exakten Kontrollierbarkeit der Schweißparameter (Druck, Temperatur, Lösungsmittelmenge etc.), reproduzierbare und zuverlässige Verschweißung von 4 Zellkulturträgern pro Zyklus. Werden sowohl für die Vorbereitung, d. h. Reinigung der Spritzgussteile, Zuschneiden der Membranen und Einbau in die Anlage als auch für den Verschweißprozess jeweils etwa 5 min Bearbeitungszeit gerechnet, so können 4 Zellkulturträger innerhalb eines Zeitraumes von ca. 10 min verschweißt werden. Damit liegt die Zykluszeit, auf einen Zellkulturträger gerechnet, etwa um einen Faktor 4 niedriger als bei dem Lasermikroperforationsprozess (Zykluszeit etwa 10 min pro Zellkulturträger).

Während durch den neuen, modifizierten Prozess die gesamte Fertigungszeit nur geringfügig verkürzt werden konnte, wurden die Kosten für die Herstellung geringer Stückzahlen im Labormaßstab deutlich reduziert. Die Fertigungskosten eines herkömmlich hergestellten Zellkulturträgers wurden im Wesentlichen durch die entstehenden Kosten des Lasermikroperforationsschrittes von etwa 29 € bestimmt und ergaben letztendlich 43 € pro Stück (siehe Kapitel 2.5). Die Kosten für die Herstellung des neuen Formeinsatzes, den variothermen Spritzguss und die mechanische Nachbearbeitung können ähnlich zum bisherigen Verfahren unverändert mit etwa 14 € beziffert werden. Mit einem durchschnittlichen Stundensatz von etwa 40 € für technisches Personal (Forschungszentrum Karlsruhe) ergaben sich bei einer Prozesszeit von etwa 10 min für 4 Zellkulturträger beim Lösungsmittelschweißverfahren Bearbeitungskosten von ca. 2 € pro Zellkulturträger. Die Materialkosten für die in einer

geringen Stückzahl bezogenen und bereits zugeschnittenen Membranen (25 x 80 mm²) beliefen sich auf etwa 3 € pro Zellkulturträger. Wird jedoch die mikroperforierte Membran vom gleichen Hersteller als großflächige Rollenware (Angebot Pieper Filter GmbH vom 21.06.2004: 46 m² zu 10500 €) bezogen, so reduzieren sich die Materialkosten auf etwa 10 Cent pro Zellkulturträger. Die letztendlichen Herstellungskosten für einen mit Spritzguss und Lösungsmittelschweißen hergestellten mikrostrukturierten Zellkulturträger lagen somit, bei einer Vernachlässigung weiterer Betriebsmittel, wie z. B. dem Lösungsmittel, in einem Bereich von etwa 16–19 €. Dadurch wurde zwar eine Kostenreduktion für die Herstellung um mehr als die Hälfte erzielt, jedoch liegt dieser Wert deutlich über dem ursprünglich angestrebten Wert von etwa 50 Cent. Eine weitere deutliche Kostenreduktion wird mit diesem kombinierten Verfahren, auch im Fall einer vollautomatisierten Produktion, wahrscheinlich nicht mehr erreicht werden können. Die Gründe hierfür liegen im Wesentlichen im Bereich des Mikrospritzgussprozesses. Die Herstellung eines Zellkulturträgers mit dem vorliegenden Design kann bisher nur variotherm erfolgen. Weiterhin kann die beim Prozess erzeugte Restschicht zwar noch in ihrer Dicke reduziert werden, eine Abformung ohne Restschicht ist aber, aufgrund deren Notwendigkeit für den Entformprozess, nicht möglich. Zukünftige Entwicklungen von entsprechend dimensionierten Auswerfersystemen könnten theoretisch ein Entformen auch von restschichtfreien Mikrospritzgussteilen ermöglichen. Die beim heutigen Stand der Technik unvermeidbare Restschicht erzwingt jedoch, wie oben beschrieben, kostenintensive Nachbearbeitungsschritte. Insofern wird diese Verfahrenskombination nach dem derzeitigen Stand der Technik nicht für eine Großserienproduktion geeignet sein.

Anstelle des Mikrospritzguss könnte eventuell das Heißprägen zur Replikation genutzt werden, da hier unter Umständen Durchgangslöcher abgeformt werden können [93]. Jedoch ist das Heißprägen, aufgrund einer vergleichsweise großen Zykluszeit und einem geringen Automatisierungsgrad, ungeeignet für die Abformung großer Stückzahlen in einer Serienfertigung. Dieses Verfahren wird typischerweise für die Herstellung von Prototypen und für Kleinserienfertigungen angewendet [145]. Die Einsparungen aufgrund der Abformung von Zellkulturträgern mit beidseitig geöffneten Zellcontainern, ohne dass eine mechanische Nachbearbeitung notwendig wäre, müssten somit mindestens den Mehraufwand, bedingt durch die größeren Zykluszeiten des Heißprägens im Vergleich zum Spritzgießen, aufwiegen.

Oberflächenmodifikation des Membran-gebondeten Zellkulturträgers

Neben der Reduzierung des zeitlichen und finanziellen Aufwandes wurde bei der Entwicklung der kurzfristigen Strategie eine erhöhte Variabilität des Zellkulturträgers bezüglich dessen Materialeigenschaften angestrebt. Die verfahrenstechnische Kombination einer modularen Bauweise und einer Verbindungstechnik, die für ein breites Spektrum polymerer Materialien geeignet ist, legt den Grundstein für die gesteigerte Variabilität des Membran-gebondeten Zellkulturträgers. Mit dem Verfahren des Lösungsmittelschweißens in der Gasphase können, neben gleichen, auch verschiedene Kunststoffe für die mikroperforierte Membran und für die spritzgegossene Gerüststruktur verwendet werden, falls diese sich in einer Mischmaterialschweißung miteinander verbinden lassen und ein gemeinsames, geeignetes Lösungsmittel zur Verfügung steht.

Trotz der Vielfalt der thermoplastischen Materialien und der großen Bandbreite an verfügbaren Lösungsmitteln ist wahrscheinlich nur eine begrenzte Anzahl von Materialkombinationen möglich [98], die durch eine echte Verschweißung miteinander verbunden werden können. In vielen Fällen kann jedoch wahrscheinlich zumindest eine ausreichend hohe Adhäsion zwischen den verschiedenen Materialien durch dieses Verfahren erzeugt werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Membranen (z. B. bezüglich Porengröße, Porendichte) oder Membrantypen (z. B. Porenmembran, Tiefenfilter) kann außerdem eine schnelle Anpassung des Zellkulturträgers an besondere Anforderungen in der Zellkulturtechnik, z. B. hinsichtlich der hydraulischen Permeabilität, erfolgen. Weiterhin ermöglicht das Konzept der modularen Bauweise eine voneinander unabhängige und möglicherweise verschiedene Vorbehandlung der beiden Elemente vor dem Verbindungsprozess. So können die beiden Module beispielsweise unterschiedlichen Plasmavorbehandlungen unterzogen werden, um verschiedene Benetzungseigenschaften zu erzeugen. Diese Vorgehensweise einer vorangehenden Modifikation der Module ist jedoch dahingehend eingeschränkt, als dass die durch die Vorbehandlung erzeugten neuen Materialeigenschaften den Verbindungsprozess nicht nur nicht behindern dürfen, sondern diesen auch in gewünschter Weise überstehen müssen. So ist einerseits das Aufbringen von Beschichtungen auf der Oberfläche, die ein Quellen bzw. Anlösen der Oberfläche auch im Bereich der Fügefläche verhindern, nicht möglich. Ein Ausweg könnte hierbei die Applikation strukturierter Beschichtungen bzw. Modifikationen darstellen, bei der speziell die Fügeflächen der Module ausgespart werden. Dies erfordert jedoch, neben dem erhöhten Aufwand des strukturierenden Modifikationsverfahrens, einen Verbindungsschritt, der eine präzise Ausrichtung der beiden Module zueinander für das Verschweißen ermöglicht. Andererseits müssen die neu eingestellten Eigenschaften der Module das kurzzeitige Anlösen der Oberfläche durch das gasförmige Lösungsmittel überstehen. Umorientierungsprozesse der Polymerketten und deren Seitengruppen, aufgrund der gesteigerten mikrobrownschen Molekularbewegung und dem Lösen temporärer physikalischer Vernetzungsstellen, können die Verfügbarkeit der neuen Eigenschaften an der Oberfläche beeinflussen.

Die Kompatibilität eines modernen, UV-basierten Oberflächenmodifikationsverfahrens [111] mit dem Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt. Da die durch die Bestrahlung erzeugten Oberflächeneigenschaften den Fügeprozess, wenn auch eingeschränkt (siehe Kapitel 3.2.11), überstehen, ist eine Modifikation der beiden Module mit diesem Verfahren im Vorfeld des Verbindungsprozesses möglich. Dies gestattet, insbesondere im Fall der flachen Membran, einen direkten Maskenkontakt für die strukturierende Oberflächenmodifikation, so dass kostengünstige, divergierende UV-Quellen für diesen Prozess eingesetzt werden können. Eine auf diese Weise verfügbare lokale Steuerung des Adhäsionsverhaltens von Zellen am Boden der Mikrokavitäten kann möglicherweise zukünftig, analog zu den bisher mikrostrukturierten Containerböden, dazu benutzt werden, die Ausbildung und den Erhalt dreidimensionaler Zellkulturen zu fördern [78].

Langfristige Strategie

Parallel zu dieser ersten Strategie wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ansatz basierend auf einem neuartigen Mikroreplikationsverfahren, dem Mikrothermoformen, entwickelt. Das Thermoformen ist ein in der makroskopischen Welt häufig genutztes Verfahren zur Herstellung dünnwandiger Formteile in Großserienproduktionen. Während die prinzipielle Machbar-

keit des Verfahrens für eine mikrotechnische Replikation von Formteilen mit geringen Aspektverhältnissen (ca. 0,5) bereits im Vorfeld gezeigt worden war [95], wurde hier die Möglichkeit der Fertigung von Bauteilen mit einer hohen Strukturdicke und höheren Aspektverhältnissen geprüft. Das an dieses Verfahren angepasste Zellkulturträgerdesign mit zylindrischen Mikrokavitäten, mit einem Durchmesser und einer Tiefe von 300 µm, besaß ein Aspektverhältnis von etwa 1. Eine vollständige und scharfe Ausformung der in einem quadratischen Feld von 25 x 25 angeordneten zylindrischen Kavitäten des Formwerkzeuges war mit einem maximal angewendeten Arbeitsdruck von ca. 60 bar nicht möglich.

Ein entscheidender Faktor hierfür war das für den Formprozess gewählte Heizkonzept des konduktiven Erwärmens der Folienhalbzeuge über die Formwerkzeuge. Dabei hatte der Aufbau der Formwerkzeuge auf einer herkömmlichen Heißprägeanlage zunächst zur Folge, dass zwar eine für den Heißprägeprozess ausreichende, jedoch eine für das Mikrothermoformen nur geringe Temperaturgenauigkeit zur Verfügung stand. Im Vergleich zu einer modernen Heißprägeanlage fehlte zudem eine, die Formwerkzeuge umgebende, thermisch isolierende Vakuumkammer, so dass Temperaturschwankungen bis etwa ± 2 °C am Formwerkzeug mittels des strukturnah platzierten Thermoelements festgestellt wurden. Wegen dieser messbaren Temperaturschwankungen wurde stets eine moderate Soll-Temperatur knapp unterhalb der, bei diesem Heizkonzept möglichen, maximalen Verarbeitungstemperatur (ca. 1–2 °C) gewählt, um eine zu starke Erwärmung und ein möglicherweise oberflächennahes Aufschmelzen der Folie in der Struktur des Formwerkzeuges zu vermeiden. Eine zu hohe Temperatur führte in der Regel zu einer erhöhten Haftung der Folienstruktur im Formwerkzeug, so dass eine schadfreie Entformung verhindert wurde. Dadurch, dass der E-Modul vieler Thermoplaste jedoch bereits bei einer geringen Temperaturabnahme von nur wenigen Grad Celsius stark ansteigt [113], werden aber schnell deutlich höhere Drücke für eine vergleichbar gute Ausformung erforderlich. Diese Problematik kann möglicherweise mit einem alternativen Heizkonzept umgangen werden, bei dem die Erwärmung des Folienhalbzeuges nicht über das Formwerkzeug, sondern über ein separates Heizelement erfolgt. Das in diesem Fall kühlere Formwerkzeug ermöglicht es eventuell, ähnlich wie beim makroskopischen Thermoformen, höhere Formtemperaturen zu verwenden und damit eine höhere Ausformschärfe zu erzielen, ohne dass eine erhöhte Haftung an der kühlen Werkzeugwand zu erwarten ist.

Der an dieser Anlage zur Verfügung stehende Druckbereich war jedoch ausreichend, um trotz der leicht verringerten Umformtemperaturen eine Ausformung zumindest bis zum Boden der Kavitäten des Formwerkzeuges zu ermöglichen. Die plane Bodenfläche der geformten Mikrokavitäten lag dabei bei einem Durchmesser von etwa 100–200 µm, so dass in der Regel eine Kantenverrundung mit einem Radius von etwa 50–100 µm im Übergang vom Boden zur Wand der Mikrokavitäten vorlag (siehe z. B. Abb. 3-37). Diese Ausformschärfe führte zu einem, anhand von REM-Querschnittsaufnahmen näherungsweise berechneten, inneren Volumen von etwa $1,7 \times 10^7$ µm³. Damit lag das Volumen einer einzelnen, thermogeformten Mikrokavität bei nur etwa 63% einer spritzgegossenen, kubischen Kavität mit einem Volumen von etwa $2,7 \times 10^7$ µm³. Aufgrund der etwas geringeren Anzahl an mikrothermogeformten Mikrokavitäten (25 x 25), im Vergleich zu den spritzgegossenen Strukturen (27 x 27), konnte somit nur eine geringere Zahl an Zellen pro mikrothermogeformten Zellkulturträger immobilisiert werden. Dies muss auch bei der Interpretation der Ergebnisse der durchgeführten biologischen Versuche und Tests berücksichtigt werden.

Eine Steigerung der Ausformung ohne eine zusätzliche Vorver Streckung oder spezieller Heizbilder würde bei Foliendicken unter 50 μm zu sehr dünnwandigen und instabilen Mikrokavitäten führen, die eventuell durch auftretende Entformkräfte beschädigt werden würden oder sogar während des Formvorgangs einreißen. Dies bedeutet, dass für eine sehr scharfe Ausformung der Kavitäten des Formwerkzeuges entweder dickere Folienhalbzeuge verwendet oder Vorstreckeinrichtungen mit in das Werkzeug integriert werden müssten. Die Verwendung dickerer Folienhalbzeuge führt aber in den nahezu unverstreckten Bereichen des oberen Randes der Mikrokavitäten zu einer immer stärkeren Einengung der Öffnung. Im Extremfall entstehen Ω -förmige Strukturen mit einer im Vergleich zur Kavität deutlich kleineren Querschnittsfläche im Bereich der Öffnung, so dass ein echter, räumlicher Hinterschnitt vorliegt [95]. Vorver Streckungen der Halbzeuge, die für das Thermoformen makroskopischer Bauteile verwendet werden, können durch mechanische Ver Streckstempel, durch ein Vorblasen oder eine Kombination aus beiden Methoden erzielt werden [113,136]. Während eine mechanische Vorver Streckung aufgrund des auftretenden Positionieraufwandes und der sehr aufwändig zu realisierenden beweglichen Elemente innerhalb des Formwerkzeuges im mikroskopischen Maßstab eher ungünstig erscheint, stellt das Vorblasen eine einfachere Variante für die Umsetzung dar. Durch das Anlegen eines Druckgases könnte hierbei die Folie in negativ ausgestaltete Kavitäten im Gegenwerkzeug, mit leicht vergrößertem Durchmesser und größerer Tiefe, frei vorgeblasen werden, um sie dann durch einen Wechsel der Druckbeaufschlagung in die jeweils gegenüberliegenden Kavitäten des Formwerkzeuges umzustülpen. Auf diese Weise können Formteile aufgrund der erzielten gleichmäßigeren Wanddickenverteilung stärker ver Streckt werden, ohne dass eine Beschädigung zu befürchten ist. Von Nachteil ist hierbei jedoch, dass eine Positionierung zwischen Formwerkzeug und Gegenwerkzeug erfolgen muss und die Strukturdicke durch die vergrößerte Stirnfläche der Kavitäten für das Vorblasen im Gegenwerkzeug stärker beschränkt ist. Eine mögliche Beeinflussung der Wanddickenverteilung durch eine Änderung der Dynamik der Druckbeaufschlagung konnte an dieser Anlage nicht untersucht werden, da aufgrund der langen, zuführenden Druckleitung mit einem geringen Durchmesser nur begrenzt schnelle Druckanstiege realisierbar waren. Sie stellt aber möglicherweise ein weiteres Hilfsmittel zur Beeinflussung der Wanddickenverteilung dar, denn Polymere zeigen häufig eine, in Abhängigkeit der Dehngeschwindigkeit, unterschiedliche Dehnviskosität [107].

Denkbare zukünftige Anwendungsgebiete des Mikrothermoformens sind beispielsweise das ‚Micro Packaging‘, die Herstellung dünnwandiger Reservoir- und Kanalstrukturen im Chipformat für biologische, pharmazeutische oder medizinische Anwendungen (Stichwort: μTAS , [18]) und die Herstellung von Zellkulturplattformen bzw. Scaffolds. Für diese Bauteile sind in der Regel keine deutlich höheren Aspektverhältnisse als 1 erforderlich, so dass bereits einfach aufgebaute Formwerkzeuge ohne integrierte Vorstreckeinrichtungen ausreichen könnten, um entsprechende Geometrien, jedoch mit verrundeten Kanten und Ecken, zu erzeugen. Viel wichtiger als das erzielbare Aspektverhältnis ist in diesen Anwendungsgebieten jedoch die Frage nach der Prozessgeschwindigkeit bzw. nach der Höhe der Produktionskosten im Rahmen einer Serienproduktion. Ein entscheidender Faktor in Bezug auf die Prozessgeschwindigkeit ist die benötigte Zeit, um das Halbzeug auf Formtemperatur zu heizen und auf Entformtemperatur wieder abzukühlen. Das konduktive Heizen des Halbzeugs über das Formwerkzeug und die Gegenplatte, wie es bei den hier vorgestellten Arbeiten erfolgte, ist aufgrund deren großer, thermisch träger Massen sehr ungünstig. Daher ergaben sich bisher für die Herstellung des Zellkulturträgers die für einen Thermoformpro-

zess untypischen, großen Zykluszeiten von etwa 20–30 min. Das Thermoformen makroskopischer Bauteile erfolgt aus Gründen der Effektivität in der Regel mit separaten Form- und Heizstationen, so dass das Werkzeug selbst aktiv keinen Temperaturvariationen unterworfen werden muss und so, ähnlich wie bei einem isothermen Spritzgussprozess, Prozesszeit eingespart werden kann. Ein wichtiger zukünftiger Entwicklungsschritt für das Mikrothermoformen stellt daher die Integration schneller und effektiver Heizsysteme dar. Mikrostrukturierte Heizelemente könnten beispielsweise aus keramischen Dünnschichten aufgebaut und direkt als mikrotechnische Komponente mit geringer Wärmekapazität im Gegenwerkzeug integriert werden. Ein weiterer Vorteil der sich aus einem solchen Heizkonzept ergeben könnte, ist die Erzeugung mikrostrukturierter Heizbilder auf dem Halbzeug. Heizbilder können analog zum makroskopischen Prozess für eine Beeinflussung der Wanddickenverteilung im Formteil genutzt werden [113]. Eine aktive Kühlung der Folie im Formwerkzeug muss in diesem Fall nicht erfolgen, da die Kühlung im Moment des Kontaktes der dünnen Folie mit der kühleren Formwerkzeugwand erfolgt. Das Thermoformwerkzeug selbst ist dabei gleichförmig temperiert bzw. unterliegt nur einem Temperaturzyklus mit geringer Amplitude.

Das Mikrothermoformen ist ein noch sehr junges Verfahren im Bereich der Mikrotechnik und als solches müssen noch zahlreiche weitere Entwicklungen erfolgen, bevor es für eine Serienproduktion, beispielsweise des hier beschriebenen Zellkulturträgers, verwendet werden könnte. Eine Abschätzung hinsichtlich entstehender Produktionskosten ist damit an diesem Punkt noch nicht sinnvoll. Es ist jedoch zu erwarten, dass analog zum makroskopischen Bereich ähnlich geringe oder sogar geringere Fertigungskosten, wie beispielsweise beim Mikrospritzguss, erzielt werden können, falls es gelingt die Geschwindigkeit des Verfahrens, z. B. durch Folientransportvorrichtungen und effektive Heiz- und eventuell Kühlsysteme, in den mikrotechnischen Bereich zu überführen.

Kombination mit Ionenspurtechnologie

Die Herstellung dünnwandiger und nicht vergrabener Mikrostrukturen durch Mikrothermoformen eröffnet eine besonders günstige Ausgangssituation für die Herstellung dreidimensionaler, mikroperforierter Strukturen. Wandstärken deutlich unter 50 μm sollten unabhängig von der angewendeten Perforationsmethode prinzipiell eine schnellere und effektivere Mikroperforation ermöglichen. Ein industriell bereits etabliertes Verfahren, das sich nicht nur aufgrund der Verwendung des gleichen Halbzeugformates ‚Folie‘ besonders gut verfahrenstechnisch mit dem Mikrothermoformen kombinieren lässt, ist die Ionenspurtechnologie. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung von PC-Folien mit beschleunigten Ionen sowohl vor als auch nach dem Mikrothermoformprozess stattfinden kann. In beiden Fällen ist eine exakte Einstellung der Poreneigenschaften durch die Bestrahlungsparameter und durch die Parameter der nachfolgenden nasschemischen Entwicklung möglich.

Die Ionenspurtechnologie ist ein vergleichsweise kostengünstiges Verfahren. Im Gegensatz beispielsweise zum Laserperkussionsbohren, das zwar prinzipiell ein schnelles aber dennoch serielles Verfahren darstellt, können bei der Ionenspurtechnologie große Flächen mit einem hohen Durchsatz bestrahlt und in nachfolgenden Bädern zu Membranen mit exakten Porengrößen und Porendichten entwickelt werden. Daher wird dieses Verfahren im

industriellen Sektor vielfach zur Erzeugung mikroperforierter Membranen mit einem definierten ‚cut-off‘ verwendet.

Besondere Vorteile für die Fertigung des Zellkulturträgers ergaben sich im Fall einer vor dem Thermoformen durchgeführten Bestrahlung der Folie und einer nach dem Formprozess durchgeführten Entwicklung der Poren. Durch diese neuartige Anordnung der Prozessschritte, bei der die zuvor erzeugten latenten Spuren während des Formvorgangs erhalten bleiben, war eine einfache Herstellung allseitig mikroperforierter, dünnwandiger Mikrokavitäten möglich. Dies ermöglicht prinzipiell eine gleichmäßige Versorgung der in den Mikrokavitäten immobilisierten Zellen mit Medium von allen Seiten und nicht nur über einen perforierten Boden und der nach oben offenen Fläche des Mikrocontainers. Diese Anordnung der Prozessschritte wurde bisher jedoch nur mit Polycarbonat getestet. Aus der Literatur ist nicht bekannt, ob es insbesondere unter den in den letzten Jahren entwickelten Polymeren (z. B. COP) thermoplastische Materialien gibt, bei denen zuvor angelegte latente Spuren ebenfalls erst mit dem Eintreten in die Schmelzphase gelöscht werden. Weiterhin werden in einem solchen Fall die Porengeometrie, der Porendurchmesser und die Porendichte durch den Verstreckprozess beeinflusst. Die Verstreckung verursacht wahrscheinlich eine Verschmierung der lokal in der Folie abgelegten Dosis, so dass daraus ein unterschiedliches Ätzverhalten resultiert. Eine genauere Untersuchung hierzu steht noch aus. Es hat sich jedoch bei Messungen an rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen angedeutet, dass zumindest zwischen dem Porendurchmesser und dem lokalen Verstreckfaktor ein proportionaler Zusammenhang besteht.

Insofern ist es für zukünftige Entwicklungen des Mikrothermoformprozesses umso bedeutender, die lokale Verstreckung und damit auch die Wanddickenverteilung, den Porendurchmesser und die Porendichte gezielt beeinflussen zu können. Auf diese Weise könnten sowohl dünnwandige, mikroperforierte Mikrostrukturen mit einer gleichmäßigen Porendichte und mit gleich bleibender Porengröße und Wanddicke als auch Mikrostrukturen mit einer über den lokalen Verstreckfaktor kontrollierbaren Verteilung der Porengröße, der Porendichte und der Wanddicke hergestellt werden. Eine derartige dreidimensionale, dünnwandige und filterartige Mikrostruktur, dessen Porosität so exakt kontrollierbar ist, ist nach dem momentanen Stand der Technik mit keinem anderen Verfahren der Mikrotechnik bei vergleichbarem Aufwand herzustellen. Dies trifft insbesondere zu, wenn es sich um eine Anordnung von vielen, direkt benachbarten und erhabenen Mikrostrukturen handelt. In diesem Fall ist eine nach dem Formprozess durchgeführte Perforation der gesamten Wandung, aufgrund der begrenzten Zugänglichkeit der Oberflächen und den zusätzlich auftretenden Abschattungseffekten im Fall von Perforationsverfahren, die auf elektromagnetischer oder Teilchenstrahlung beruhen, nicht oder nur begrenzt möglich. Das Mikrothermoformen von bereits perforierten Membranen mittels einer geschlossenen Druckfolie ist bei den für den Zellkulturträger bestehenden Designs wegen der bereits im Kapitel 3.3.9.2 genannten Gründe wahrscheinlich nicht möglich. Jedoch sind Strukturen, die eine größere Wandschräge und eventuell ein geringeres Aspektverhältnis haben, möglicherweise auch für ein solches Verfahren geeignet, so dass eine Mikroperforation einer flachen Membran vollkommen entkoppelt vor dem Formprozess durchgeführt werden könnte.

Die Verwendung typischer Resistmaterialien der Röntgenlithografie als Folienhalbzeuge für das Mikrothermoformen könnte eine ähnliche verfahrenstechnische Kombination wie mit der

Ionenspurtechnologie ermöglichen. Polymethylmethacrylat (PMMA) beispielsweise, ein klassischer Positivresist, kann mittels röntgenlithografischer Methoden auch noch in Dicken von über 100 µm sehr gut strukturiert werden. Die Bestrahlung des Polymers führt zu Kettenbrüchen und damit zu einer Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung in Richtung geringerer Molekulargewichte. Dabei bleibt jedoch, ähnlich wie bei einer Bestrahlung mit beschleunigten Ionen, ein struktureller Zusammenhalt des Materials erhalten, so dass ein Mikrothermoformen der in der Tiefe des Materials modifizierten Folie prinzipiell erfolgen kann. Mit Hilfe des etablierten lithografischen Verfahrens sind über mikrostrukturierte Masken beliebige Konturen der bestrahlten Bereiche realisierbar. Ein nach dem Mikrothermoformprozess anschließendes selektives Lösen der bestrahlten Bereiche in der dreidimensionalen Struktur mit geeigneten Entwicklern könnte somit die Erzeugung von Poren bzw. Fenstern mit jeder erdenklichen Form und Größe ermöglichen. Auf diese Weise sollten sich auch Extremformen wie beispielsweise dreidimensionale, annähernd netzartige Strukturen herstellen lassen. Als Problematisch könnten sich bei einer solchen Vorgehensweise unter Umständen die veränderten thermomechanischen Eigenschaften großflächig bestrahlter Bereiche während des Formprozesses erweisen. Eine veränderte Molekulargewichtsverteilung führt in der Regel zu einer Veränderung der Erweichungstemperatur, so dass eventuell ein vorzeitiges Schmelzen der modifizierten Bereiche, im Vergleich zu den unbestrahlten Bereichen, zu einem Öffnen der Folie und damit zu einem vorzeitigen Abstoppen des Formprozesses führt. Möglicherweise treten auch deutlich höhere Haftkräfte zur Formwerkzeugwand auf, die ohne spezielle Beschichtungen des Formwerkzeuges eine Entformung unmöglich machen.

Die Herstellung dünnwandiger, unvergrabener und mikroperforierter Mikrostrukturen, deren Porosität in allen Wandbereichen exakt kontrolliert werden kann, bietet für Anwendungen im Bereich der Zellkultur interessante Vorteile. Ein Vorteil ist die mikrostrukturierte Topologie und damit vergrößerte Oberfläche der Rückseite einer solchen Struktur. Es handelt sich hierbei zwar nicht um klar umgrenzte Kavitäten, wie auf der Vorderseite, jedoch können sich Zellen zwischen den konvex geformten Wandungen der Kavitäten verankern und sind partiell vor auftretenden fluidischen Scherkräften geschützt. Auf diese Weise ist grundsätzlich eine (Co-) Kultivierung dreidimensionaler Gewebeschichten zu beiden Seiten der mikroperforierten Membran denkbar. Dabei besteht eventuell auch die Möglichkeit, im Fall größerer Poren bzw. Fenster eine definierte Kontaktfläche für die Interaktion zwischen zwei, durch die Folie getrennten, dreidimensionalen Gewebeschichten (Konfrontationskultur) herzustellen. Diese Eigenschaft des mikrothermogeformten Zellkulturträgers könnte beispielsweise für spezielle Studien im Bereich der Zellmigration, der Tumorinvasivität oder der Vaskularisierung verwendet werden. Das flächige Design des polymeren Zellkulturträgers des Forschungszentrum Karlsruhe ermöglicht zudem, im Gegensatz zu multizellulären Sphäroiden, den Aufbau von langzeitstabilen, physikalischen und chemischen Gradienten. Damit lässt sich z. B. auch der Einfluss von chemotaktischen Wirkstoffen auf die zuvor genannten Vorgänge untersuchen.

Beständigkeit von Materialmodifikationen beim Mikrothermoformen

Heutzutage sind viele verschiedene Verfahren verfügbar, um die physikochemischen Eigenschaften von Polymeren an der Oberfläche, aber auch in der Tiefe, im Nano- und Mikrometerbereich lokal beeinflussen zu können. Verschiedene auf klassische, lithografische Metho-

den basierende Verfahren, wie z. B. das ‚micro contact printing‘ oder das mikrofluidische ‚patterning‘ [28], werden eingesetzt, um die Adhäsion von organischen Molekülen, Molekülen der extrazellulären Matrix und damit die Adhäsion von Zellen gezielt zu kontrollieren. Fast alle dieser mustererzeugenden Verfahren beruhen jedoch auf Methoden, die bisher nur auf zweidimensionalen oder nur stark begrenzt auf dreidimensionalen Substraten angewendet werden konnten. Dies trifft insbesondere auf masken- und stempelbasierte Verfahren zu, die in der Regel einen direkten Kontakt mit dem Substrat erfordern. Verfahren, die auf einem direkten Schreiben durch Licht- oder Teilchenstrahlung basieren, werden in dreidimensionalen Substraten u. a. durch Abschattungs- und Beugungseffekte stark behindert. Das Mikrothermoformen gestattet aufgrund der geringen Prozesstemperatur, im Vergleich zu den herkömmlichen, urformenden Replikationsverfahren, wie dem Spritzguss oder dem Heißprägen, eine dem Formvorgang vorangehende Modifikation des flachen Folienhalbzeugs, ohne dass diese neuen, erzeugten Eigenschaften während des Umformens verloren gehen. Da die Umformung der thermoplastischen Folien in deren viskoelastischen Zustand erfolgt, bleibt der materielle Zusammenhalt während des Mikrothermoformens bestehen und ermöglicht nicht nur den Erhalt globaler oder lokaler physikochemischer Materialmodifikationen, sondern auch den Erhalt von Mikro- und Nanotopologien. Mit Hilfe des Mikrothermoformens können somit nahezu alle mustererzeugenden Verfahren der Kunststoffmodifikation in eine dritte, räumliche Dimension transferiert werden. Folgende schematische Abbildung (Abb. 5-2) fasst die im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführten, verschiedenen und grundlegenden Varianten eines solchen kombinierten Mikrothermoformprozesses zusammen.

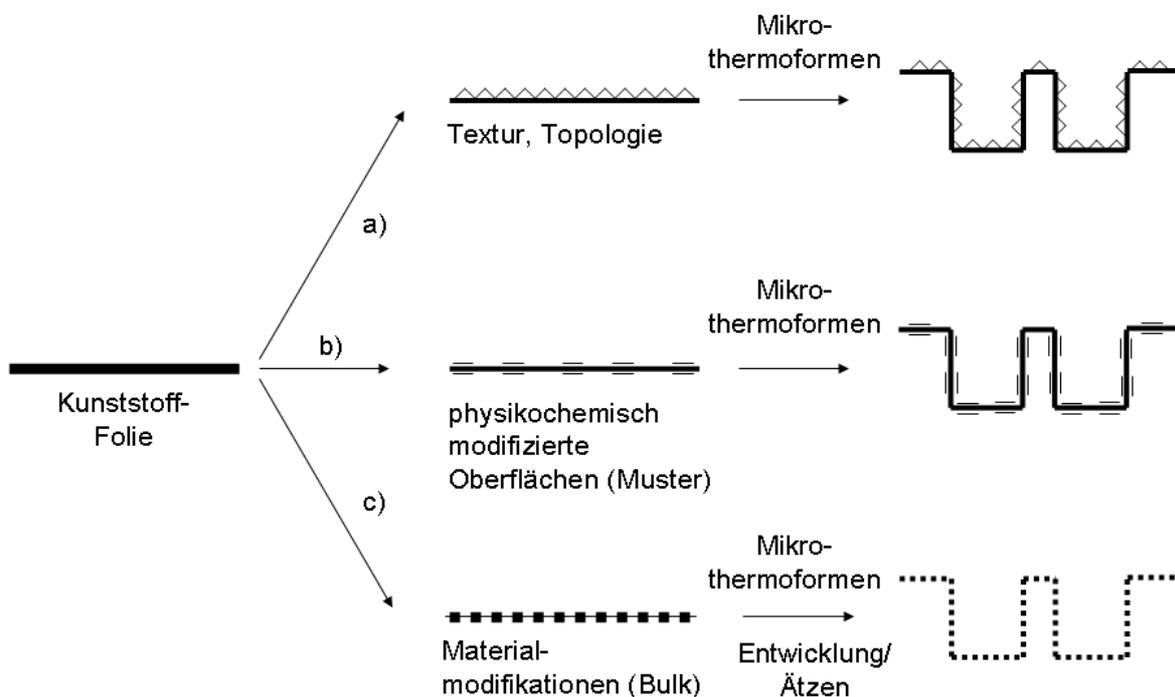


Abb. 5-2 Schematische Darstellung der prinzipiellen Kombinationsmöglichkeiten des Mikrothermoformprozesses mit verschiedenen, verbreiteten Kunststoffmodifikationsverfahren (verändert nach [146]).

Der prinzipielle Erhalt der vor dem Formprozess erzeugten speziellen Folieneigenschaften während des Mikrothermoformens wurde in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden gezeigt. Im Fall einer durch maskenbasierte UV-Bestrahlung erzeugten lokalen Oberflächenmodifikation erfolgte dies beispielsweise durch die selektive Anheftung verschiedener Zelltypen auf den bestrahlten Bereichen der inneren Oberfläche der mikrothermogeformten Kavitäten. Die nach dem Mikrothermoformen vorliegende erhöhte Oberflächenladungsdichte in den bestrahlten Bereichen der Mikrokavitäten war somit noch ausreichend, um einen für die Zellen erkennbaren Kontrast zu den unbestrahlten Bereichen der Folienoberfläche zu bilden. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob eine Abnahme der Oberflächenladungsdichte bei einem Verstreckvorgang stattfindet bzw. in welchem Ausmaß sie erfolgt. Neben den mechanisch induzierten könnten auch thermisch induzierte Umorientierungsprozesse auf molekularer Ebene an der Oberfläche einen Einfluss auf die Verfügbarkeit der modifizierten Eigenschaften haben. Eine vergleichende, nasschemische Untersuchung an bestrahlten unverstreckten und unterschiedlich stark verstreckten Folien gleicher Fläche mit einem kationischen Farbstoff könnte hierüber einen gewissen Anhaltspunkt geben (siehe auch Kapitel 3.2.11, [112]). Um hierüber jedoch genauere Informationen zu erhalten, müssen wahrscheinlich weitergehende oberflächenanalytische Verfahren angewendet werden (z. B. Sekundärionenmassenspektroskopie SIMS).

Die selektive Adhäsion von Zellen in einem dreidimensionalen Zellkulturträger mit UV-basierter und strukturierter Oberflächenmodifikation ermöglicht beispielsweise die Realisierung definiert zusammengesetzter, dreidimensionaler Co-Kulturen. Dies konnte bisher nur auf zweidimensionalen, meist mit Verfahren der Softlithografie oberflächenstrukturierten Substraten durchgeführt werden [29]. Im Fall des mikrothermogeformten Zellkulturträgers könnte somit ein mit geringer Zellzahl beimpfter erster Zelltyp zunächst selektiv auf den modifizierten Oberflächenbereichen der Innenseite der Kavitäten adhären. Nach einer definierten Phase der Vorkultivierung könnten Zellen eines zweiten Zelltyps in die Kavitäten beimpft werden. Diese Zellen können sich dann aufgrund einer veränderten Mediumzusammensetzung (z. B. ohne Pluronic) sowohl an den bereits verankerten Zellen des ersten Zelltyps als auch schwach an den unbestrahlten Bereichen der Mikrokavitätenwandung adhären. Auf diese Weise können theoretisch *in vitro* dreidimensionale Co-Kulturen definierter Zusammensetzung mit definierten Kontaktflächen zwischen den verschiedenen Zelltypen erzeugt werden. Dreidimensionale Co-Kulturen stellen wichtige Gewebemodelle beispielsweise für die *in vitro* Untersuchung heterotypischer Zell-Zell-Interaktionen dar, so dass dies möglicherweise ein spezifisches Einsatzgebiet mikrothermogeformter Scaffolds darstellt.

Durch lichtmikroskopische Aufnahmen konnte des Weiteren belegt werden, dass die einseitige Oberflächenrauigkeit auf einer kommerziellen PC-Folie nach dem Mikrothermoformprozess auf der Innenseite der Mikrokavitäten zwar in verzerrter Form, aber prinzipiell noch verfügbar war. Inwiefern jedoch die Rauigkeit durch den Mikrothermoformprozess quantitativ beeinflusst wird, wurde nicht ermittelt. Die Schwierigkeit hierbei ist die begrenzte Zugänglichkeit der inneren Oberfläche der Kavitäten, um beispielsweise mit einem Profilometer die Oberflächenrauigkeit zu messen. Dies könnte entweder an im Querschnitt geöffneten Kavitäten erfolgen oder wenn die Folie mit der oberflächenrauen Seite nach außen verformt wird, kann eventuell auf der Außenfläche direkt gemessen werden. Im zweiten Fall besteht jedoch das Problem, dass die Oberflächenrauigkeit durch den Kontakt mit der Formwerk-

zeugwand wahrscheinlich verändert wird [95]. Bereits durchgeführte Versuche, bei denen die oberflächenraue Seite der Folie zur Formwerkzeugwand wies, lassen vermuten, dass die vergleichsweise geringere Kontaktfläche zur Formwerkzeugwand zu einer Verringerung der Haft- bzw. Entformkräfte führt. Dies konnte jedoch aufgrund fehlender zuverlässiger Messmethoden bisher nicht quantitativ beurteilt werden. Ähnliche Effekte der Reduzierung der Wandhaftung werden auch mitunter beim Thermoformen makroskopischer Bauteile beobachtet [113]. In diesem Fall werden die Rauigkeiten jedoch in der Regel als permanente Eigenschaft des Formwerkzeuges ausgelegt. Folien mit ausgeprägten Oberflächentopologien könnten in Zukunft beispielsweise auch eingesetzt werden, um mittels Mikrothermoformen dreidimensionale Mikrostrukturen mit echten Hinterschnitten zu erzeugen. So könnten dünnwandige nach Innen ragende Lamellen im oberen Bereich der Seitenwand der Mikrokapazitäten beispielsweise als Barrieren eingesetzt werden, die für das Passieren größerer Teilchen (Zellen, Beads etc.) in eine Richtung einen erhöhten mechanischen Widerstand bieten. Im Bereich des Tissue Engineerings wird bereits seit einigen Jahren der Einfluss von mikro- und nanotexturierten Oberflächen auf das Verhalten von Zellen untersucht. Der unter dem Begriff ‚contact guidance‘ zusammengefasste Effekt spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Zellmigration, bei dem gerichteten Auswachsen von Neuriten und bei der Beeinflussung des Zytoskeletts bzw. der Zellmorphologie. Insofern könnte dies einen wichtigen Parameter für zukünftige Zellkultursysteme darstellen, um wirksame Signale und Reize für Differenzierungs- und Reifungsprozesse, aber auch für die Aufrechterhaltung gewebespezifischer Funktionen in einem dreidimensionalen Scaffold zur Verfügung zu stellen.

Darüber hinaus wurde auch eine an die Oberflächen nicht kovalent gebundene und mikrostrukturierte Beschichtung mit der Trägerfolie thermogeformt. Anhand des erzeugten Musters auf der Oberfläche konnte gezeigt werden, dass dessen Verzerrung mit dem lokalen Verstreckfaktor annähernd proportional zusammenhängt. Aufgrund der Verstreckung konnte ein Zerreißen der dünnen Beschichtung nicht verhindert werden. Es kann außerdem angenommen werden, dass neben der Verstreckung auch die den unterschiedlichen Materialien eigenen thermischen Ausdehnungskoeffizienten zusätzliche Spannungen in der Schicht erzeugen und einen Einfluss auf das Verhalten der Beschichtung während des Formvorgangs haben. Möglicherweise kann über die Schichtdicke oder die Auswahl neuer Materialien dieses inselartige Aufreißen der Beschichtung bei hohen Verstreckfaktoren umgangen werden. Metallische Schichten (z. B. aus Gold) können einerseits, wie in dieser Arbeit bereits beschrieben wurden, als mikrostrukturierte Startschichten für das lokale Aufbringen beispielsweise von SAM genutzt werden. Andererseits können derartige metallische Strukturen auch als Elektrodenbahnen mit in die Kavitäten eingeformt werden, beispielsweise um *in situ* Impedanz- bzw. Leitfähigkeitsmessungen an immobilisierten Zellen durchzuführen. Neben sensorischen Aufgaben sind auch elektrische Stimulationen und Reize z. B. bei der Kultivierung elektrisch erregbarer Zellen denkbar. Für diese Anwendungen müsste jedoch ein Aufreißen der Metallschicht unbedingt verhindert werden. Unter Umständen könnte eine nachträgliche Ausheilung inselartig zerrissener Elektrodenbahnen durch eine anschließende stromlose Galvanik erfolgen. Neben metallischen Schichten sind auch Dünnschichten aus anderen Materialien z. B. Keramik, SiO_x denkbar, die beispielsweise mittels Sputterverfahren (un-) strukturiert vor dem Mikrothermoformen auf das flache Folienhalbzeug aufgebracht werden können. Piezoelektrisch aktive Keramiken oder Polymere könnten auf diese Weise genutzt werden, um gezielte mechanische Reize auf Zellaggregate in den Mikrokapazitäten

auszuüben. Dies könnte eventuell ein zentrales Werkzeug für die Differenzierung von Muskel- oder Knochengewebe darstellen.

Die hohe Variabilität, die sich durch die Kombinationsmöglichkeiten des Mikrothermoformens mit den verschiedensten Modifikationsverfahren ergeben, ist ein weiterer wichtiger Schritt für die Realisierung biomimetischer Scaffolds. Die hohe Adaptivität der herstellbaren dreidimensionalen Mikrostrukturen ermöglicht aber nicht nur einen Einsatz in einem breiten Spektrum zellbasierter Systeme, sondern bietet auch viele neue Chancen für den Aufbau mikrostrukturierter, technischer Systeme (Lab-on-a-Chip, μ -TAS).

Biologische Validierung

Die Entwicklung neuer Herstellungsverfahren für Produkte für das Tissue Engineering sollte idealerweise von Beginn an mit biologischen Tests begleitet werden, um frühzeitig eventuell auftretende biologische Unverträglichkeiten zu erkennen und zu eliminieren. Aufgrund dessen wurden bereits in einem sehr frühen Versuchsstadium die Materialien und die ersten gefertigten Prototypen in der Zellkultur geprüft. Hierzu wurden, wie in Kapitel 4.5 beschrieben, zunächst einfache Biokompatibilitätstests angewendet, die eine einfache Interaktion zwischen lebenden Zellen und den für die Verfahren verwendbaren Materialien umfassten. Ein wichtiger und kritischer Punkt bezüglich der Herstellung des Membran-gebundenen Zellkulturträgers war, dass keine, oder zumindest keine potentiell toxisch wirkende Restmenge an eingeschlossenem Lösungsmittel nach dem Fügeverfahren im Kunststoff verbleibt. Es wurde zwar mittels mikrogravimetrischen und gaschromatografischen Messungen für die in der teilautomatisierten Lösungsmittelschweißanlage gebundenen Zellkulturträger gezeigt, dass aufgrund der kurzen Lösungsmittelkontaktzeiten nach dem Fügeprozess keine messbare Gewichtsabnahme stattfindet und bereits nach nur etwa 20–30 min nahezu keine nachweisbaren Mengen an Lösungsmittel aus dem Kunststoff in die Umgebung austreten. Dennoch konnte mit diesen Methoden letztendlich nicht geklärt werden, wie groß der Anteil des im Polymer verbleibenden Lösungsmittels ist. Weiterhin wurden diese Messungen in normaler Atmosphäre und bei Raumtemperatur durchgeführt, so dass sie keinen Hinweis auf die Lösungsmittelabgabe im erwärmten, wässrigen Milieu beispielsweise eines Zellkulturmediums geben. Daher liefern diese Ergebnisse im Wesentlichen Anhaltspunkte hinsichtlich einer minimalen Dauer einer vorsorglichen Auslagerung der Zellkulturträger, bevor sie für eine biologische Anwendung genutzt werden können.

Um weitergehende Informationen zu gewinnen war es wichtig frühzeitig lösungsmittelgeschweißte Zellkulturträger in Kontakt mit lebenden Zellen zu bringen und anhand deren Verhalten Rückschlüsse auf die Verträglichkeit der eingesetzten Materialien zu erhalten. Hierzu wurden Vitalitätsmessungen und Messungen der Albuminsekretion von beimpften und in den Mikrostrukturen immobilisierten Hepatoblastomzellen durchgeführt und in Relation zu den herkömmlichen, laserperforierten Zellkulturträgern gesetzt. Die Kultivierung für diese Vergleichsmessungen fand unter einfachen statischen Bedingungen statt, um Unterschiede hervorgerufen durch verschieden starke Porositäten des Bodens möglichst auszuschließen. Anhand der alamarBlueTM- und der Albuminvergleichsmessungen konnte kein auffälliger Unterschied zwischen dem Verhalten der Zellen in den herkömmlichen und den neuartigen, lösungsmittelgeschweißten Zellkulturträgern ermittelt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei den typischen Parametern des neuen Prozesses keine

toxischen Restmengen an Lösungsmittel im Kunststoff verbleiben bzw. in der Zellkultur freigesetzt werden. Weiterhin scheint auch der flache unstrukturierte Boden in den lösungsmittelgeschweißten Zellkulturträgern keinen sichtbaren Einfluss auf diesen Zelltyp und auf die ermittelten zellphysiologischen Parameter zu haben. Diese Ergebnisse müssen jedoch in Zukunft durch weitere Tests auch mit verschiedenen Zelltypen und Parametern bestätigt werden. Darüber hinaus ist die Zuverlässigkeit der insbesondere mit dem alamarBlueTM-Test gewonnenen Ergebnisse fragwürdig, da dieser Test ursprünglich für Monolayerkulturen konzipiert wurde. Ein Erreichen aller Zellen mit dem nicht-toxischen Farbstoff ist hier aufgrund der guten Zugänglichkeit im Monolayer sichergestellt. Im Fall dreidimensional kultivierter Zellen in statischer Kultur stellt sich jedoch das Problem, dass innen liegende Zellen von dem Farbstoff nicht oder nur sehr spät über Diffusionsprozesse erreicht werden. Diese Eigenschaft bewirkt, dass nur ein Teil der Zellen auf ihre Aktivität und Lebensfähigkeit getestet werden. Umgangen werden könnte diese Problematik möglicherweise bei zukünftigen Messungen durch eine aktive Perfusion der Zellen in den Zellkulturträgern mit dem Farbstoff. Eine gewisse Vergleichbarkeit bei diesem Test ist jedoch dahingehend gewährleistet, als dass in allen Zellkulturträgern eine annähernd gleiche, initiale Zellkonzentration vorherrschte. Extreme Auswirkungen wären somit auch mit diesem Test nachweisbar, traten aber bei den hier eingesetzten Materialien und Designs nicht auf.

Für die Herstellung mikrothermogeformter Zellkulturträger wurden neue Halbzeugmaterialien verwendet, die sich besonders für den Formprozess eigneten. Eine biologische Verträglichkeit der Folienmaterialien war jedoch zu Beginn der Arbeit unbekannt. Daher wurden sowohl mit den flachen unstrukturierten Folien (PC) als auch mit den ersten mikrothermogeformten Zellkulturträgern Tests in direktem Kontakt mit Zellen durchgeführt. Die vergleichenden biologischen Messungen zwischen den laserperforierten, den Membran-gebundenen und den mikrothermogeformten Zellkulturträgern zeigten sowohl in statischer Kultur als auch unter Perfusionsbedingung ebenfalls keine auffälligen Unterschiede. Es wurde jedoch in diesen vergleichenden Versuchen nur ein einziger zellspezifischer Parameter an Zellen nur einer Zelllinie abgeprüft. Verwertbare Aussagen auf der Ebene der RNA anhand primärer Zellen konnten, wahrscheinlich aufgrund des verwendeten Perfusionsprotokolls (siehe Kapitel 4.7.1), nicht erhalten werden. Eine solche Bestätigung ist jedoch für die weitere Entwicklung und im speziellen für die Realisierung eines extrakorporalen Organunterstützungssystems unumgänglich.

Die Kollagenisierung der Mikrostrukturen führte bei allen verwendeten Materialien und Zellkulturträgertypen zu einer verbesserten Zelladhäsion, nahm aber keinen sichtbaren Einfluss auf die untersuchten zellphysiologischen Parameter. Die unterschiedliche und schwer zu kontrollierende Adhäsion der Zellen, speziell in den ersten Stunden nach der Beimpfung der Zellkulturträger, ist jedoch ein zentrales Problem dieser Untersuchungen. Alle ermittelten Daten der biologischen Versuche wurden auf die ursprünglich ausgesäte Zellzahl bezogen. Aufgrund des unterschiedlichen Designs der Zellkulturträger beispielsweise traten aber unterschiedlich starke fluidische Scherkräfte auf, die zu einer Ablösung verschieden großer Zellzahlen in den Mikrostrukturen führte. Dies stellte insbesondere ein Problem beim Einbau bereits beimpfter Zellkulturträger in das Bioreaktorgehäuse dar, bei dem teils größere Mengen an Zellen aus den Mikrokavitäten herausgespült wurden. Dies ist auch die wahrscheinlichste Erklärung für die etwas reduzierten Albuminkonzentrationen im Medium im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen im Überstand der statisch kultivierten

Zellkulturträger. Weiterhin ist der Einfluss der unterschiedlichen Geometrien und Materialien auf das Proliferationsverhalten der Zellen nicht im Detail untersucht worden, so dass nach länger andauernden Kultivierungen ein Bezug der Messwerte auf die ursprünglichen Zellzahlen nur eine unbefriedigende Lösung darstellen. So sind wahrscheinlich auch die ab dem 6. Tag der Kultivierung deutlich gesteigerten Albuminkonzentrationen im Überstand der herkömmlichen Monolayerkulturen im Vergleich zu statisch kultivierten Zellkulturträgern zu erklären. Das größere Platzangebot führte hier zu einer sichtbar stärkeren Proliferation der Zellen im Monolayer, so dass die gesteigerten Werte eigentlich auf eine vergleichsweise höhere Zellzahl bezogen werden müssten. Damit würde sich die doch deutliche Differenz zwischen den Monolayerdaten und den an den Zellkulturträgern ermittelten Werten relativieren. Weiterhin wurden für die Perfusionsversuche der Zellkulturträger im Bioreaktorsystem die bisher verwendeten Standardparameter verwendet. Dabei handelt es sich aber, insbesondere hinsichtlich des eingestellten Volumenstroms und des für die Zellen verfügbaren Sauerstoffpartialdrucks, um noch nicht optimierte Kultivierungsbedingungen, so dass eine verminderte zellphysiologische Leistung der dreidimensionalen Kulturen gegenüber Monolayerkulturen wahrscheinlich daraus resultiert.

Eine automatisierte und reproduzierbare Beimpfung sowie ein reproduzierbares Handling der Zellkulturträger in weiteren Arbeitsschritten stellen daher notwendige Entwicklungen dar, um eine objektive Beurteilung der erhobenen Daten zu gewährleisten. Um eine konkrete und objektive Vergleichbarkeit im speziellen zu anderen Kultivierungsformen, wie z. B. der Monolayerkultur zu ermöglichen, müsste theoretisch zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung eine Normierung der ermittelten Daten auf die tatsächliche Anzahl der lebenden Zellen erfolgen. Das Lysieren der Zellen in den Zellkulturträgern, beispielsweise zur Bestimmung des Protein- oder RNA-Gehaltes, auf die in der Fachliteratur häufig Bezug genommen wird, stellt keine sinnvolle Lösung für mikrostrukturierte, polymere Zellkulturträger dar, so lange nicht gezeigt werden kann, wie groß der Anteil der an der großen Oberfläche des Scaffolds adsorbierten Menge der Zielsubstanz ist, die dadurch für eine Messung nicht mehr zugänglich ist. Ein weiterer vorläufiger, jedoch besserer Ansatz, stellt hier das enzymatische Herauslösen ganzer Zellen aus den Mikrostrukturen dar, um sie erst anschließend für weitere Messungen aufzubereiten. Ein solches Verfahren muss jedoch standardisiert werden, um zuverlässig den Anteil der lebenden und der toten Zellen zu messen. Durch die enzymatische Behandlung der Zellen (z. B. Trypsin, Kollagenase) darf es zu keiner nachträglichen Veränderung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen kommen. Darüber hinaus muss in einem solchen Fall sichergestellt werden, dass alle Zellen restlos aus den Kavitäten herausgelöst wurden. Im Fall mikroperforierter Zellkulturträger ist dies mittels lichtmikroskopischer Beobachtung aufgrund von Brechungs- und Beugungseffekten bereits nicht mehr möglich, so dass hier zusätzliche Kontrollschritte, wie z. B. spezifische Antikörperfärbungen, durchgeführt werden müssten. Idealerweise wäre eine Bestimmung der lebenden Zellen online über integrierte Sensoren direkt in den Mikrokavitäten wünschenswert, beispielsweise über bioelektrische Impedanzanalysen. Eine solche sensorische online Überwachung der Zellen wäre nicht nur als Kontrolle der Zellkultur von Vorteil, sondern könnte auch für eine quantifizierte Bewertung von Substanzen und Wirkstoffen in standardisierten Toxizitätstests an dreidimensionalen Zellkulturen dienen.

Die Problematik der nicht genau definierten Zellzahlen bei den hier durchgeführten Versuchen macht einen objektiven Vergleich mit Daten aus der Literatur fragwürdig, so dass

hierauf verzichtet wurde. Ein interner Vergleich zwischen den verschiedenen Zellkulturträgertypen und Materialien ist jedoch in eingeschränkter Form und unter Vorbehalt zulässig, da alle Zellkulturträgertypen prinzipiell einer gleichen Prozedur unterworfen wurden. Auf der Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche ist somit festzuhalten, dass es keine wesentlichen und auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen gefertigten Zellkulturträgertypen und Materialien für die dreidimensionale Kultivierung gab und dass sowohl die kurzfristige als auch die langfristige Strategie somit prinzipiell für die Herstellung des polymeren Zellkulturträgers des Forschungszentrums Karlsruhe auch vom biologischen Standpunkt aus geeignet erscheinen.

6 Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit wurden parallel zwei verschiedene Strategien zur Verbesserung der Herstellung dreidimensionaler, mikrostrukturierter Zellkulturträger verfolgt. Im Rahmen der **kurzfristigen Strategie** wurden das bisherige Herstellungsverfahren und das Design der Zellkulturträger nur geringfügig geändert. Der Mikrospritzguss wurde weiterhin als Replikationsverfahren genutzt, während die kosten- und zeitintensiven Prozessschritte zur laserbasierten Mikroperforation der Mikrocontainerböden durch einen vereinfachten Membran-Bondprozess ersetzt wurden. Die Entwicklung eines Herstellungsverfahrens für den Zellkulturträger basierend auf einem neuartigen mikrotechnischen Verfahren, dem Mikrothermoformen, und einem etablierten Verfahren der Mikroperforation, der Ionenspurtechnologie, bildete die zweite, **langfristige Strategie**. Folgende schematische Darstellung (siehe Abb. 6-1) zeigt die schrittweise Vereinfachung des Grundkörpers des Zellkulturträgers, ausgehend von der herkömmlichen spritzgegossenen und laserperforierten Form (a), über den spritzgegossenen und Membran-gebondeten Zellkulturträger (kurzfristige Strategie, b), bis schließlich zur Realisierung eines Zellkulturträgers, der im Wesentlichen nur noch aus einer mikrostrukturierten und mikroperforierten Folie (langfristige Strategie, c) besteht.

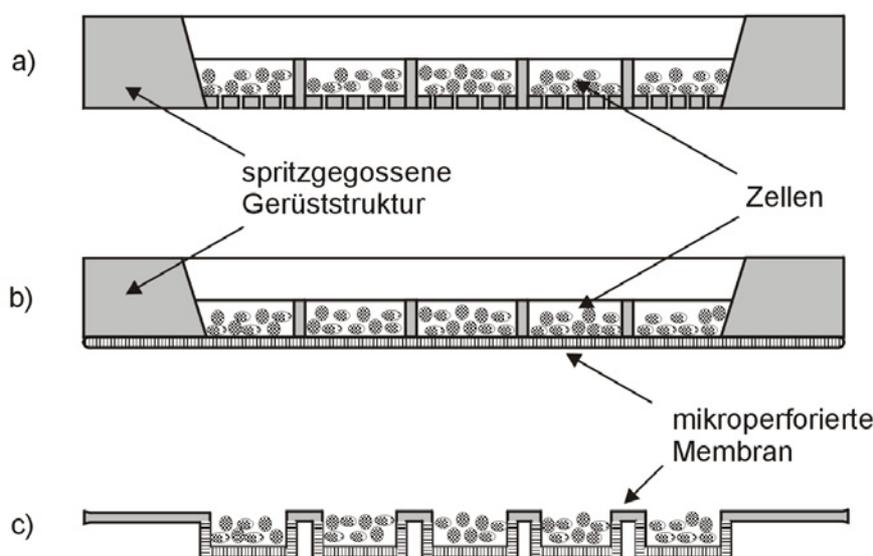


Abb. 6-1 Schematische Darstellung des bisherigen mikrostrukturierten Zellkulturträgers und der beiden neu entwickelten Prototypen im Querschnitt (verwendete Herstellungsverfahren: **a)** Spritzguss und Lasermikroperforation, **b)** Spritzguss und Lösungsmittelschweißprozess, **c)** Mikrothermoformen und Ionenspurtechnologie).

Als Basisverfahren der **kurzfristigen Strategie** wurde der Mikrospritzguss beibehalten, da dieser eine sehr kostengünstige und schnelle Replikation des Zellkulturträgers in Kunststoff ermöglicht. Dagegen wurde der bisher spritzgegossene und laserperforierte Containerboden durch eine vorkonfektionierte (Kernspur-) Membran aus Polycarbonat ersetzt. Hierfür wurde der Zellkulturträger mit flachen unstrukturierten Containerböden und einem Vorhalt von etwa

100 µm in der Containersteghöhe abgeformt. Durch den anschließenden mechanischen Abtrag der Restschicht inklusive dem Vorhalt wurde ein vollständiges Öffnen der Mikrocontainer von der Rückseite sichergestellt, während die ursprüngliche Containerhöhe von 300 µm nicht verändert wurde. Für die Verbindung der spritzgegossenen und beidseitig geöffneten Gerüststruktur mit einer mikroporösen Membran wurde ein neuartiges Lösungsmittelschweißverfahren in der Gasphase für diese Anwendung adaptiert. Zunächst wurde in einer bereits bestehenden Versuchsanlage, anhand einfacher plattenförmiger Prüfkörper, die prinzipielle Machbarkeit einer flächigen und zuverlässigen Verbindung zwischen gleichen und auch unterschiedlichen Thermoplasten, PMMA und PC, gezeigt. Der Zellkulturträger konnte in dieser Anlage mit dem Lösungsmittel Aceton und einer Lösungsmittelkontaktzeit von etwa 2–4 min sowohl in einer homogenen (PC/PC) als auch in einer heterogenen Kombination (PMMA/PC) flächig verschweißt werden. Mit sehr einfach ausgelegten Presswerkzeugen konnten an dieser Versuchsanlage zudem mehrere Zellkulturträger parallel, nicht nur in einer flächigen, sondern auch in einer gestapelten Form, gebondet werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde eine teilautomatisierte Anlage für den Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase entwickelt und aufgebaut. Die Prozesszeit konnte im Vergleich zur Versuchsanlage, im Wesentlichen aufgrund des reduzierten Volumens des Rezipienten und der PC-gesteuerten Prozessführung, deutlich reduziert werden. Die Anlage ermöglichte in einem Batch-Verfahren die parallele Verschweißung von 4 Zellkulturträgern mit Lösungsmittelkontaktzeiten von unter 15 s und erreichte somit annähernd vergleichbare Zykluszeiten, wie sie mit anderen, industriell genutzten, schnellen Verbindungsverfahren, z. B. dem Ultraschallschweißen, erzielt werden. Aufgrund der sehr kurzen Lösungsmittelkontaktzeiten konnte eine Beeinträchtigung der Geometrie der Mikrostrukturen, z. B. in Form von Kantenverrundungen, vermieden werden. Im Hinblick auf die Biokompatibilität konnte mit mikrogravimetrischen und gaschromatografischen Verfahren nachgewiesen werden, dass bereits nach einer sehr kurzen Auslagerungszeit (ca. 20 min) bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck nahezu kein Lösungsmittel mehr aus verschweißten Zellkulturträgern abgegeben wurde. Dieses modifizierte Fertigungsverfahren des Zellkulturträgers ermöglichte im Vergleich zum bisherigen Verfahren eine Reduktion der Herstellungskosten im Labormaßstab um mehr als die Hälfte.

Das vor kurzem am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte Verfahren des Mikrothermoformens, das auf einem speziellen makroskopischen Thermoformprozess, dem so genannten Trapped-Sheet-Thermoformen basiert, bildete den zentralen Prozess der **langfristigen Strategie**. Dabei wird ein an seinen Rändern fest eingespanntes und erwärmtes, thermoplastisches Folienhalbzeug im viskoelastischen Zustand unter Ausdünnung seiner Wanddicke zu einem dreidimensionalen Formteil verstreckt. Für die Herstellung des mikrostrukturierten Zellkulturträgers durch das Mikrothermoformen wurde das kubische Design der Mikrokavitäten durch ein zylindrisches ersetzt. In zentraler Position des kreisrunden, plattenförmigen Formwerkzeuges befand sich hierzu ein mikromechanisch gefertigtes Array, bestehend aus 25 x 25 zylindrischen Mikrokavitäten (Tiefe 300 µm, Durchmesser 350 µm). Aus dieser Geometrie ergab sich ein mittleres Oberflächenverstreckverhältnis für die umgeformte Folie von etwa 4,4. Das Formwerkzeug und ein speziell entwickeltes Gegenwerkzeug wurden auf einer herkömmlichen Heißpräganlage montiert. Über die an das Gegenwerkzeug angeschlossene und hierfür entwickelte hochdrucksichere Peripherie wurde ein Gasdruck in einem Bereich von 40–60 bar angelegt, um Zellkulturträger aus Folien mit einer für die Zellkulturanwendung ausreichenden Formscharfe herzustellen. Es wurden verschiedene

thermoplastischen Materialien (PC, PS, COP) als Folien mit einer Dicke von etwa 25–50 μm verwendet. Infolge fehlender Vorstreckeinrichtungen oder Verstreckhilfen zeigten die mikrothermogeformten Kavitäten eine für das Negativformen zu erwartende und reproduzierbare inhomogene Wanddickenverteilung. Bei Verwendung sehr dünner Folienhalbzeuge (ca. 25 μm) beulten sich dadurch die dünn ausgezogenen Kavitätenböden wieder zurück. Eine Kombination aus Entformschrägen und Fasen, die in die Kavitäten eines zweiten Formwerkzeuges integriert wurden, und die Verwendung von dickeren Folienhalbzeugen ermöglichte schließlich eine reproduzierbare Fertigung von Zellkulturträgern. Die minimale Wanddicke dieser Strukturen lag in den am stärksten verstreckten Bereichen der Mikrokavitätenböden bei etwa 5–10 μm .

Um in den mikrothermogeformten Strukturen immobilisierte Zellen perfundieren zu können, wurde das formgebende Verfahren mit einer etablierten Methode der Mikroperforation kombiniert, der Ionenspurtechnologie. Dabei führt die Bestrahlung von Polymeren (z. B. PC) mit beschleunigten Ionen zur Ausbildung von annähernd geradlinigen, entlang den Trajektorien der Ionen verlaufenden, latenten Spuren, die nachträglich in geeigneten Medien zu Nano- bzw. Mikroporen definierter Größe freigeätzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Konzepte zur Kombination des Mikrothermoformens und der Ionenspurtechnologie erarbeitet und deren Machbarkeit geprüft. Im einfachsten Fall wurden mikrothermogeformte Strukturen nachträglich mit beschleunigten Ionen bestrahlt und entwickelt. Dabei besteht prinzipiell die Möglichkeit, wegen der inhomogenen Wanddickenverteilung der mikrothermogeformten Teile und über die Anpassung der Reichweite der Ionen, eine selektive Perforation nur in den sehr dünn verstreckten Folienbereichen, den Containerböden, durchzuführen. Beim zweiten Konzept wurde grundsätzlich gezeigt, dass auch eine mikroperforierte Membran, in einem so genannten ‚Sandwich‘-Mikrothermoformverfahren, mittels einer zweiten, geschlossenen Folie (eventuell mit Trennschicht) umgeformt werden kann. Die bei diesem speziellen Design auftretenden hohen Verstreckungen führten jedoch zu einem Aufreißen der Poren und die ausgeprägte inhomogene Wanddickenverteilung verhinderte zudem eine zerstörungsfreie Trennung der geschlossenen Folie von der porösen Membran. Ein drittes und vollkommen neues Konzept bestand darin, allein die Bestrahlung des noch flachen Folienhalbzeuges vor dem Mikrothermoformen durchzuführen und erst abschließend nach dem Formprozess zu ätzen. Im Gegensatz zu anderen, gängigen mikrotechnischen Replikationsverfahren, wie z. B. dem Mikrospritzguss oder dem Heißprägen, erfolgt das Mikrothermoformen nicht in einer Schmelzphase, sondern in einer viskoelastischen Phase des Polymers, so dass es durch den Umformprozess nicht zu einem thermischen Ausheilen der Ionenspuren kommt. Die anschließende nasschemische Entwicklung der latenten Spuren zu Poren führte zu allseitig mikroperforierten Kavitäten, deren Poren in allen Bereichen senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet waren. Dabei wurde festgestellt, dass der Verstreckprozess nicht nur die Porendichte, sondern auch die Porengröße annähernd proportional beeinflusst.

Im Vergleich zum bisherigen Prozess erlauben beide neu entwickelten Herstellungsstrategien eine im Hinblick auf die Porosität und Materialeigenschaften schnellere und einfachere Anpassung des Zellkulturträgers an spezielle Aufgaben im Bereich der Zellkultur. Die Modulbauweise des Membran-gebondeten Zellkulturträgers ermöglicht nicht nur einen Aufbau aus gleichen, sondern je nach Verschweißbarkeit auch aus unterschiedlichen Materialien. Die Verwendung unterschiedlicher Membranen bzw. Membrantypen gestattet es zudem die

Porosität der Containerböden schnell und unkompliziert zu verändern. Darüber hinaus können beide Module, Membran und spritzgegossene Gerüststruktur, zwecks Materialmodifikation unabhängig voneinander vor dem Fügeverfahren einer unterschiedlichen Vorbehandlung, z. B. einer UV-Bestrahlung oder Plasmabehandlung, unterzogen werden. Im Fall einer UV-basierten Oberflächenmodifikation wurde sowohl nasschemisch als auch zellbiologisch gezeigt, dass diese zum Lösungsmittelschweißprozess in der Gasphase kompatibel ist.

Da beim Mikrothermoformen dünne Folien in einem viskoelastischen Zustand umgeformt werden und damit ein permanenter, materieller Zusammenhalt gewährleistet ist, lässt sich dieses Verfahren mit einem breiten Spektrum an Kunststoffmodifikationsverfahren kombinieren. So konnte gezeigt werden, dass flache Folienhalbzeuge vor dem Umformprozess (1) mit einer Oberflächentopologie bzw. Textur, (2) mit physikochemischen Oberflächenmodifikationen und (3) mit Materialmodifikationen im Volumen ausgestattet werden können und diese spezifischen Eigenschaften durch das Mikrothermoformen nicht verloren gehen, sondern im dreidimensionalen, dünnwandigen Formteil infolge des Verstreckvorgangs verzerrt verfügbar bleiben. Dies eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich des Tissue Engineerings häufig benötigte, aber bisher in der Regel auf planare Substrate beschränkte, masken- und stempelbasierte Methoden der Materialmodifikation auch auf dreidimensional mikrostrukturierte Formteile anzuwenden.

Die aus unterschiedlichen Polymeren und mit verschiedenen Methoden gefertigten Zellkulturträger-Prototypen wurden mit verschiedenen Zelllinien (Hep G2, L929) und mit primären Rattenhepatozyten validiert. Die Haftung der Hep G2-Zellen und der primären Zellen auf den unbehandelten Polymeren war durchweg gering, konnte aber durch eine flächige Beschichtung mit Faktoren der extrazellulären Matrix deutlich verbessert werden. Die Beschichtung mit Kollagen hatte auf die gemessenen zellphysiologischen Parameter (z. B. Albuminsynthese bei den Hep G2) keinen Einfluss. Eine moderate Fluorierung in der Gasphase von Membran-gebundenen Zellkulturträgern führte hingegen zur Ausbildung eines sichtbaren Randspaltes zwischen Zellen und den fluorierten Containerseitenwänden, so dass so genannte ‚Cuboide‘, kubisch-geformte Zellaggregate, mit definierten Abmessungen entstanden. Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Hep G2 auf unbehandelten Polycarbonatfolien, einem für das Mikrothermoformen und die Ionenspurtechnologie geeignetem Material, ergab eine im Vergleich zu Standardkulturschalen ähnliche und nur geringfügig längere Generationszeit der Zellen. Auch die mittels eines alamarBlueTM-Assays ermittelte gleich bleibende Zellviabilität von Hep G2-Zellen in Membran-gebundenen und in mikrothermogeformten Zellkulturträgern gab einen weiteren Hinweis auf die Biokompatibilität der verwendeten Polymere und Herstellungsverfahren. Um zusätzliche Einflüsse aufgrund einer unterschiedlichen Porosität der Zellkulturträger zu vermeiden, wurden mikrothermogeformte und Membran-gebundene Zellkulturträger mit der bisherigen, laserperforierten Form des Zellkulturträgers in einer statischen Kultur miteinander verglichen, das heißt sie wurden nicht perfundiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit den neu entwickelten Designs und verwendeten polymeren Materialien vergleichbar gute Werte hinsichtlich der Albuminsekretion der Zellen erzielt wurden. Messungen im Bioreaktorsystem an perfundierten dreidimensionalen Zellkulturen (Hep G2) ergaben zwar eine zur statischen Kultivierung verringerte Albuminsekretion, es konnten aber erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden neu entwickelten Prototypen im Hinblick auf diesen Differenzierungsmarker festgestellt werden. Dabei zeigte sich jedoch auch, insbesondere im Vergleich zu Monolayerkulturen, dass das Ge-

samtsystem bezüglich der Kultivierungsbedingungen (Volumenstrom, Sauerstoffversorgung etc.) noch weiter optimiert werden muss.

7 Literatur

- [1] Langer R. & Vacanti J. P.: Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926, 1993.
- [2] Nash K. L. & Gimson A. E.: Liver transplantation. *Hosp Med* **64**, 200-204, 2003.
- [3] Hipp J. & Atala A.: Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *J Exp Clin Assist Reprod* **1**, 2004.
- [4] Abbott A.: Cell culture: Biology's new dimension. *Nature* **424**, 870-872, 2003.
- [5] Watt F. M. & Hogan B. L. M.: Out of eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430, 2000.
- [6] Minuth W. W., Strehl R. & Schumacher K.: *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [7] Mueller-Klieser W.: Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* **273**, C1109-1123, 1997.
- [8] Kunz-Schughart L. A., Freyer J. P., Hofstaedter F. & Ebner R.: The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* **9**, 273-285, 2004.
- [9] Lanza R. P., Langer R. & Vacanti J. (eds.): *Principles of tissue engineering*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2000.
- [10] Eckert K. L., Blum J. & Wintermantel E.: in *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren* (eds. Wintermantel E. & Ha S. W.), 3. Aufl., 327-337, Springer, Berlin, 2002.
- [11] Yang S., Leong K. F., Du Z. & Chua C. K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* **7**, 679-689, 2001.
- [12] Weibezahn K.-F., Knedlitschek G., Dertinger H., Schubert K., Bier W. & Schaller T.: DE-OS 41 32 379, Substrat für Zellkulturen und Kultur von Zellen oder Zellaggregaten, 1993.
- [13] Weibezahn K.-F., Gottwald E., Welle A., Augspurger C. & Giselbrecht S.: Der Cell-Chip als vielseitiges Werkzeug für Anwendungen in der Regenerativen Medizin und für das Tissue Engineering. 12. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt", Heiligenstadt, 195-200, September 27-29, 2004.
- [14] Menz W., Mohr J. & Paul O.: *Microsystem technology*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [15] Ehrfeld W. (ed.) *Handbuch Mikrotechnik*, Hanser, München, 2002.

- [16] Madou M. J.: *Fundamentals of microfabrication*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [17] Guber A. E., Saile V. & Weibezahn K.-F.: in *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren* (eds. Wintermantel E. & Ha S. W.), 3. Aufl., 361-376, Springer, Berlin, 2002.
- [18] Manz A., Graber N. & Widmer H. M.: Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1**, 244-248, 1990.
- [19] Ziaie B., Baldi A., Lei M., Gu Y. & Siegel R. A.: Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 145-172, 2004.
- [20] Bashir R.: BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1565-1586, 2004.
- [21] Yannas I. V. & Burke J. F.: Design of an artificial skin I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* **14**, 65-81, 1980.
- [22] Yannas I. V., Burke J. F., Gordon P. L., Huang C. & Rubenstein R. H.: Design of an artificial skin II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* **14**, 107-132, 1980.
- [23] Pachence J. M. & Kohn J.: in *Principles of Tissue Engineering* (eds. Lanza R. P., Langer R. & Vacanti J.), 2nd ed., 263-277, Academic Press, San Diego, 2000.
- [24] Bhatia S. N. & Chen C. S.: Tissue engineering at the micro-scale. *Biomed Microdevices* **2**, 131-144, 1999.
- [25] Singhvi R., Kumar A., Lopez G. P., Stephanopoulos G. N., Wang D. I., Whitesides G. M. & Ingber D. E.: Engineering cell shape and function. *Science* **264**, 696-698, 1994.
- [26] Xia Y. & Whitesides G. M.: Soft Lithography. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **37**, 550-575, 1998.
- [27] Brock A., Chang E., Ho C. C., LeDuc P., Jiang X., Whitesides G. M. & Ingber D. E.: Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* **19**, 1611-1617, 2003.
- [28] Takayama S., Chapman R. G., Kane R. S. & Whitesides G. M.: in *Principles of Tissue Engineering* (eds. Lanza R. P., Langer R. & Vacanti J.), 2nd ed., 209-220, Academic Press, San Diego, 2000.
- [29] Bhatia S.: *Microfabrication in tissue engineering and bioartificial organs* (ed. Senturia S. D.), Kluwer, Boston, 1999.

- [30] Park S., Wolanin P. M., Yuzbashyan E. A., Lin H., Darnton N. C., Stock J. B., Silberzan P. & Austin R.: Influence of topology on bacterial social interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13910-13915, 2003.
- [31] Berry C. C., Campbell G., Spadicino A., Robertson M. & Curtis A. S. G.: The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. *Biomaterials* **25**, 5781-5788, 2004.
- [32] Zinger O., Anselme K., Denzer A., Habersetzer P., Wieland M., Jeanfils J., Hardouin P. & Landolt D.: Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* **25**, 2695-2711, 2004.
- [33] Flemming R. G., Murphy C. J., Abrams G. A., Goodman S. L. & Nealey P. F.: Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* **20**, 573-588, 1999.
- [34] Lu H. W., Lu Q. H., Chen W. T., Xu H. J. & Yin J.: Cell culturing on nanogrooved polystyrene petri dish induced by ultraviolet laser irradiation. *Materials Letters* **58**, 29-32, 2004.
- [35] Duncan A. C., Weisbuch F., Rouais F., Lazare S. & Baquey C.: Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 413-426, 2002.
- [36] Li H. & S. Huck W. T.: Polymers in nanotechnology. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **6**, 3-8, 2002.
- [37] Wilkinson C. D. W., Riehle M., Wood M., Gallagher J. & Curtis A. S. G.: The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering. *Materials Science and Engineering: C* **19**, 263-269, 2002.
- [38] Dalby M. J., Gadegaard N., Riehle M. O., Wilkinson C. D. W. & Curtis A. S. G.: Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2005-2015, 2004.
- [39] Jungbauer S., Kemkemer R., Gruler H., Kaufmann D. & Spatz J. P.: Cell shape normalization, dendrite orientation, and melanin production of normal and genetically altered (haploinsufficient NF1)-melanocytes by microstructured substrate interactions. *ChemPhysChem* **5**, 85-92, 2004.
- [40] Charest J. L., Bryant L. E., Garcia A. J. & King W. P.: Hot embossing for micropatterned cell substrates. *Biomaterials* **25**, 4767-4775, 2004.

- [41] Yeong W.-Y., Chua C.-K., Leong K.-F. & Chandrasekaran M.: Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology* **22**, 643-652, 2004.
- [42] Hutmacher D. W., Sittinger M. & Risbud M. V.: Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology* **22**, 354-362, 2004.
- [43] Leong K. F., Cheah C. M. & Chua C. K.: Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* **24**, 2363-2378, 2003.
- [44] Yang S., Leong K. F., Du Z. & Chua C. K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* **8**, 1-11, 2002.
- [45] Belloy E., Sayah A. & Gijs M. A. M.: Powder blasting for three-dimensional microstructuring of glass. *Sensors and Actuators A: Physical* **86**, 231-237, 2000.
- [46] Pypen C. M., H P. J., Ebel M. F., Svagera R. & Wernisch J.: Characterization of microblasted and reactive ion etched surfaces on the commercially pure metals niobium, tantalum and titanium. *J Mater Sci Mater Med* **8**, 781-784, 1997.
- [47] Citeau A., Guicheux J., Vinatier C., Layrolle P., Nguyen T. P., Pilet P. & Daculsi G.: In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* **26**, 157-165, 2005.
- [48] Lee S. J., Choi J. S., Park K. S., Khang G., Lee Y. M. & Lee H. B. H. B.: Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. *Biomaterials* **25**, 4699-4707, 2004.
- [49] Evans M. D., Taylor S., Dalton B. A. & Lohmann D.: Polymer design for corneal epithelial tissue adhesion: pore density. *J Biomed Mater Res A* **64**, 357-364, 2003.
- [50] Stepien E., Stanisz J. & Korohoda W.: Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biology International* **23**, 105-116, 1999.
- [51] Wintermantel E. & Ha S. W. (eds.): *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*, 3. Aufl., Springer, Berlin, 2002.
- [52] Hallgren C., Reimers H., Gold J. & Wennerberg A.: The importance of surface texture for bone integration of screw shaped implants: an in vivo study of implants patterned by photolithography. *J Biomed Mater Res* **57**, 485-496, 2001.

- [53] Sauer I. M., Kardassis D., Zeillinger K., Pascher A., Gruenwald A., Pless G., Irgang M., Kraemer M., Puhl G., Frank J., Muller A. R., Steinmuller T., Denner J., Neuhaus P. & Gerlach J. C.: Clinical extracorporeal hybrid liver support - phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* **10**, 460-469, 2003.
- [54] Gloeckner H. & Lemke H. D.: New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products. *Biotechnol Prog* **17**, 828-831, 2001.
- [55] Jonsson E., Friberg L. E., Karlsson M. O., Hassan S. B., Nygren P., Kristensen J., Tholander B., Binderup L. & Larsson R.: In vivo activity of CHS 828 on hollow-fibre cultures of primary human tumour cells from patients. *Cancer Letters* **162**, 193-200, 2001.
- [56] Hollingshead M. G., Alley M. C., Camalier R. F., Abbott B. J., Mayo J. G., Malspeis L. & Grever M. R.: In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sciences* **57**, 131-141, 1995.
- [57] Karamuk E., Mayer J. & Wintermantel E.: in *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren* (eds. Wintermantel E. & Ha S. W.), 3. Aufl., 377-386, Springer, Berlin, 2002.
- [58] Shin M., Matsuda K., Ishii O., Terai H., Kaazempur-Mofrad M., Borenstein J., Detmar M. & Vacanti J. P.: Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane). *Biomed Microdevices* **6**, 269-278, 2004.
- [59] Petronis S., Eckert K. L., Gold J. & Wintermantel E.: Microstructuring ceramic scaffolds for hepatocyte cell culture. *J Mater Sci Mater Med* **12**, 523-528, 2001.
- [60] Fromherz P.: Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chem-PhysChem* **3**, 276-284, 2002.
- [61] Hutzler M. & Fromherz P.: Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **19**, 2231-2238, 2004.
- [62] 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. & Griffith L. G.: A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* **78**, 257-269, 2002.
- [63] Kaihara S., Borenstein J., Koka R., Lalan S., Ochoa E. R., Ravens M., Pien H., Cunningham B. & Vacanti J. P.: Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* **6**, 105-117, 2000.
- [64] Nagel A., Koch S., Valley U., Emmrich F. & Marx U.: Membrane-based cell culture systems - an alternative to in vivo production of monoclonal antibodies. *Dev Biol Stand* **101**, 57-64, 1999.

- [65] Goldstein A. S., Juarez T. M., Helmke C. D., Gustin M. C. & Mikos A. G.: Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**, 1279-1288, 2001.
- [66] Freyman T. M., Yannas I. V. & Gibson L. J.: Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science* **46**, 273-282, 2001.
- [67] De Bartolo L., Jarosch-Von Schweder G., Haverich A. & Bader A.: A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Prog* **16**, 102-108, 2000.
- [68] Wang Y. J., Liu H. L., Guo H. T., Wen H. W. & Liu J.: Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World J Gastroenterol* **10**, 699-702, 2004.
- [69] Dunn J. C., Tompkins R. G. & Yarmush M. L.: Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J Cell Biol* **116**, 1043-1053, 1992.
- [70] Wallace D. G. & Rosenblatt J.: Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1631-1649, 2003.
- [71] Wenger A., Stahl A., Weber H., Finkenzeller G., Augustin H. G., Stark G. B. & Kneser U.: Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* **10**, 1536-1547, 2004.
- [72] Drury J. L., Dennis R. G. & Mooney D. J.: The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* **25**, 3187-3199, 2004.
- [73] Drury J. L. & Mooney D. J.: Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337-4351, 2003.
- [74] Uludag H., De Vos P. & Tresco P. A.: Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* **42**, 29-64, 2000.
- [75] Lu M. Z., Lan H. L., Wang F. F., Chang S. J. & Wang Y. J.: Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). *Biotechnol Bioeng* **70**, 479-483, 2000.
- [76] John G. & Morita M.: Synthesis of polymer network scaffolds and microspheres based on poly([epsilon]-caprolactone-co-glycolic acid-co-serine). *Materials Science and Engineering: C* **13**, 91-95, 2000.
- [77] Borden M., Attawia M., Khan Y. & Laurencin C. T.: Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation. *Biomaterials* **23**, 551-559, 2002.

- [78] Knedlitschek G., Schneider F., Gottwald E., Schaller T., Eschbach E. & Weibezahn K. F.: A tissue-like culture system using microstructures: influence of extracellular matrix material on cell adhesion and aggregation. *J Biomech Eng* **121**, 35-39, 1999.
- [79] Gottwald E., Welle A., Augspurger C. & Giselbrecht S.: 3D-Zellkultur in CellChips. *BIOforum* **5**, 34-36, 2004.
- [80] Giselbrecht S., Gottwald E., Knedlitschek G., Weibezahn K. F., Welle A., Guber A. E., Herrmann D., Muslija A. & Schomburg W. K.: Further development of microstructured culture systems and their use in tissue engineering. *Biomed Tech (Berl)* **47**, 373-376, 2002.
- [81] Chin V. I., Taupin P., Sanga S., Scheel J., Gage F. H. & Bhatia S. N.: Microfabricated platform for studying stem cell fates. *Biotechnol Bioeng* **88**, 399-415, 2004.
- [82] Hui T., Rozga J. & Demetriou A. A.: Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **8**, 1-15, 2001.
- [83] Redlich A., Perka C., Schultz O., Spitzer R., Haupl T., Burmester G. R. & Sittering M.: Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *J Mater Sci Mater Med* **10**, 767-772, 1999.
- [84] Perka C., Schultz O., Spitzer R.-S., Lindenhayn K., Burmester G.-R. & Sittering M.: Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* **21**, 1145-1153, 2000.
- [85] Mayer J., Karamuk E., Akaike T. & Wintermantel E.: Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system. *Journal of Controlled Release* **64**, 81-90, 2000.
- [86] Boland T., Mironov V., Gutowska A., Roth E. A. & Markwald R. R.: Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **272**, 497-502, 2003.
- [87] Wilson W. C., Jr. & Boland T.: Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **272**, 491-496, 2003.
- [88] Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs G. & Markwald R. R.: Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology* **21**, 157-161, 2003.
- [89] Knedlitschek G., Anderer U., Weibezahn K. F. & Dertinger H.: Radioresistance of rat glioma cell lines cultured as multicellular spheroids. Correlation with electrical cell-to-cell-coupling. *Strahlenther Onkol* **166**, 164-167, 1990.

- [90] Dertinger H., Lucke-Huhle C., Schlag H. & Weibezahn K. F.: Negative pion irradiation of mammalian cells. 1. Survival characteristics of monolayers and spheroids of Chinese hamster lung cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **29**, 271-277, 1976.
- [91] Gottwald E.: Hilfsarbeiter für die Leber. *Spektrum der Wissenschaft*, 44-51, 2002.
- [92] Ha S. W., Wintermantel E. & Maier G.: in *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren* (eds. Wintermantel E. & Ha S. W.), 3. Aufl., 149-209, Springer, Berlin, 2002.
- [93] Hecke M. & Durand A.: Microstructured through-holes in plastic films by hot embossing. Precision Engineering and Nanotechnology: Proceedings of the Euspen 2nd International Conference, Bedford : euspen, 196-198, May 27-31, 2001.
- [94] Dittrich H.: *Werkzeugentwicklung für das Heißprägen beidseitig mikrostrukturierter Formteile*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 2004.
- [95] Truckenmüller R.: *Herstellung von dreidimensionalen Mikrostrukturen aus Polymermembranen*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 2002.
- [96] Herrmann D.: *Herstellung gedeckelter Mikrokapillarstrukturen*, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2000.
- [97] Truckenmüller R., Henzi P., Herrmann D., Saile V. & Schomburg W. K.: Bonding of polymer microstructures by UV irradiation and welding at low temperatures. *Microsystem Technologies* **10**, 372-374, 2004.
- [98] Saechtling H. & Oberbach K.: *Kunststoff-Taschenbuch*, 28. Ausg., Hanser, München, 2001.
- [99] Bacher W. & Saile V.: LIGA and AMANDA technologies for the fabrication of advanced micro-devices. JSME-IPP/ASME-ISPS Joint Conf.on Micromechatronics for Information and Precision Equipment, Yokohama, 133-137, June 16-18, 2003.
- [100] Shao P., Rummeler Z. & Schomburg W. K.: Polymer micro piezo valve with a small dead volume. *J.Micromech.Microeng.* **14**, 305-309, 2004.
- [101] Nentwig J.: *Kunststoff-Folien*, Hanser, München, 1994.
- [102] Mikos A. G., Sarakinos G., Leite S. M., Vacant J. P. & Langer R.: Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* **14**, 323-330, 1993.
- [103] Gnam H. & Fuchs O.: *Lösungsmittel und Weichmachungsmittel*, 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1980.

- [104] Giselbrecht S., Gietzelt T., Guber A. E., Gottwald E., Trautmann C., Truckenmüller R. & Weibezahn K.-F.: Microthermoforming as a novel technique for manufacturing scaffolds in tissue engineering (CellChips). *IEE Proc.-Nanobiotechnol.* **151**, 151-157, 2004.
- [105] Guber A. E.: Fluorination of PMMA plastics surfaces. 15th Internat.Symp.on Fluorine Chemistry, Vancouver, August 2-7, 1997.
- [106] Franck A.: *Kunststoff-Kompendium*, 4. Aufl., Vogel, Würzburg, 1996.
- [107] Menges G., Haberstroh E., Michaeli W. & Schmachtenberg E.: *Werkstoffkunde Kunststoffe*, 5. Aufl., Hanser, München, 2002.
- [108] Agari Y., Ueda A., Omura Y. & Nagai S.: Thermal diffusivity and conductivity of PMMA/PC blends. *Polymer* **38**, 801-807, 1997.
- [109] Marin N. & Favis B. D.: Co-continuous morphology development in partially miscible PMMA/PC blends. *Polymer* **43**, 4723-4731, 2002.
- [110] Welle A., Gottwald E. & Weibezahn K. F.: Patterned polymer surfaces for cell culture applications. *Biomed Tech* **1**, 401-403, 2002.
- [111] Welle A. & Gottwald E.: UV-based patterning of polymeric substrates for cell culture applications. *Biomed. Microdevices* **4**, 33-41, 2002.
- [112] Maroudas N. G.: Sulphonated polystyrene as an optimal substratum for the adhesion and spreading of mesenchymal cells in monovalent and divalent saline solutions. *J. Cell. Physiol.* **90**, 511-519, 1977.
- [113] Throne J. L., Heil M. & Beine J.: *Thermoformen*, Hanser, München, 1999.
- [114] Truckenmüller R., Rummler Z., Schaller T. & Schomburg W. K.: Low-cost production of single-use polymer capillary electrophoresis structures by microthermoforming. Proc. Micromechanics Europe Workshop (MME), Cork, Ireland, 39-42, September 16-18, 2001.
- [115] Spohr R.: *Ion tracks and microtechnology* (ed. Bethge K.), Vieweg, Braunschweig, 1990.
- [116] Strathmann H.: in *Handbook of Industrial Membrane Technology* (ed. Porter M. C.), 1-60, Noyes Publications, New Jersey, 1990.
- [117] Fleischer R. L., Price P. B. & Walker R. M.: *Nuclear tracks in solids*, University of California Press, Berkeley, 1975.
- [118] Giselbrecht S., Truckenmüller R. & Trautmann C.: Formkörper, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung (Patent angemeldet), 2004.

- [119] Staude E.: *Membranen und Membranprozesse*, VCH, Weinheim, 1992.
- [120] Carbonell L., Whelan C. M., Kinsella M. & Maex K.: A thermal stability study of alkane and aromatic thiolate self-assembled monolayers on copper surfaces. *Superlattices and Microstructures* **36**, 149-160, 2004.
- [121] Sung M. M. & Kim Y.: Self-assembled monolayers of alkanethiols on clean copper surfaces. *Bull. Korean Chem. Soc.* **22**, 748-752, 2001.
- [122] Parker B. & Gellman A. J.: Orientation and chemistry of alkyl thiolates on the Ni(100) surface. *Surface Science* **292**, 223-234, 1993.
- [123] Rufael T. S., Koestner R. J., Kollin E. B., Salmeron M. & Gland J. L.: Adsorption and thermal decomposition of CH₃SH on the Pt(111) surface. *Surf. Sci.* **297**, 272-285, 1993.
- [124] Truckenmüller R., Giselbrecht S., Schaller T. & Schomburg W. K.: Manufacturing of flexible polymer film capillary electrophoresis chips by microthermoforming. Proc. 2nd VDE World Microtechnologies Congress (MICRO.tec), München, Germany, 315-318, October 13-15, 2003.
- [125] Truckenmüller R. & Giselbrecht S.: Microthermoforming of flexible, not buried hollow microstructures for chip-based life sciences applications. *IEE Proc.-Nanobiotechnol.* **151**, 163-166, 2004.
- [126] Le Jossic C., Glaise D., Corcos L., Diot C., Dezier J. F., Fautrel A. & Guguen-Guillouzo C.: trans-Acting factors, detoxication enzymes and hepatitis B virus replication in a novel set of human hepatoma cell lines. *Eur J Biochem* **238**, 400-409, 1996.
- [127] Seglen P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**, 29-83, 1976.
- [128] Wintermantel E., Shah-Derler B., Bruinink A., Petitmermet M., Blum J. & Ha S. W.: in *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren* (eds. Wintermantel E. & Ha S. W.), 3. Aufl., 5-44, Springer-Verlag, Berlin, 2002.
- [129] Freshney R. I.: *Culture of animal cells*, 4th ed., Wiley-Liss, New York, 2000.
- [130] Giselbrecht S., Eichhorn L., Gietzelt T., Gottwald E., Guber A. E., Schomburg W. K., Truckenmüller R. & Weibezahn K.-F.: A novel fabrication method for microstructured cell culture systems. Proc. 2nd VDE World Microtechnologies Congress (MICRO.tec), München, Germany, 147-151, October 13-15, 2003.
- [131] Chu P. K., Chen J. Y., Wang L. P. & Huang N.: Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **36**, 143-206, 2002.

- [132] Chim H., Ong J. L., Schantz J. T., Hutmacher D. W. & Agrawal C. M.: Efficacy of glow discharge gas plasma treatment as a surface modification process for three-dimensional poly (D,L-lactide) scaffolds. *J Biomed Mater Res* **1**, 327-335, 2003.
- [133] Gottwald W. & Wachter G.: *IR-Spektroskopie für Anwender*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
- [134] Dewez J. L., Doren A., Schneider Y. J. & Rouxhet P. G.: Competitive adsorption of proteins: key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials* **20**, 547-559, 1999.
- [135] Detrait E., Lhoest J. B., Knoops B., Bertrand P. & van den Bosch de Aguilar P.: Orientation of cell adhesion and growth on patterned heterogeneous polystyrene surface. *J Neurosci Methods* **84**, 193-204, 1998.
- [136] Illig A. (ed.) *Thermoformen in der Praxis*, Hanser, München, 1997.
- [137] Paine A. J. & Andreakos E.: Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology in vitro. *Toxicology in Vitro* **18**, 187-193, 2004.
- [138] Allen J. W., Hassanein T. & Bhatia S. N.: Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* **34**, 447-455, 2001.
- [139] Sheil A. G. R., Sun J., Wang L., Rao N., Mears D. C., Wang C., Woodman K., Johnston B. & Watson J.: Biodialysis: a new liver support system. *Transplantation Proceedings* **31**, 3258-3259, 1999.
- [140] Yin C., Mien Chia S., Hoon Quek C., Yu H., Zhuo R.-X., Leong K. W. & Mao H.-Q.: Microcapsules with improved mechanical stability for hepatocyte culture. *Biomaterials* **24**, 1771-1780, 2003.
- [141] Legallais C., David B. & Dore E.: Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *Journal of Membrane Science* **181**, 81-95, 2001.
- [142] Gerlach J. C., Encke J., Hole O., Muller C., Ryan C. J. & Neuhaus P.: Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* **58**, 984-988, 1994.
- [143] Planchamp C., Vu T. L., Mayer J. M., Reist M. & Testa B.: Hepatocyte hollow-fibre bioreactors: design, set-up, validation and applications. *J Pharm Pharmacol* **55**, 1181-1198, 2003.
- [144] Eschbach E., Chatterjee S. S., Nöldner M., Gottwald E., Dertinger H., Weibezahn K.-F. & Knedlitschek G.: Microstructured scaffolds for liver tissue cultures of high cell density: Morphological and biochemical characterization of tissue aggregates. *Journal of Cellular Biochemistry* **95**, 243-255, 2004.

- [145] Weber L.: in *Handbuch Mikrotechnik* (ed. Ehrfeld W.), 149-150, Hanser, München, 2002.
- [146] Giselbrecht S., Gottwald E., Guber A. E., Trautmann C., Truckenmüller R., Weibezahn K.-F. & Welle A.: 3D tissue engineering scaffolds produced by micro thermoforming of pre-processed polymer films. *Lab on a Chip*, Artikel eingereicht.