
1 Einleitung

1.1 Die Suche nach der seltenen Zelle

Der Körper eines erwachsenen Menschen besteht aus ca. $4 \cdot 10^{13}$ Zellen und trägt ungefähr die gleiche Menge an Bakterien in und auf sich [1]. Die Zellen erfüllen viele hundert verschiedene Aufgaben und bilden durch die komplexen Wechselwirkungen untereinander unseren Körper.

Wenn es zu Störungen in dem Zusammenspiel dieser Vielzahl an unterschiedlichen Zellen kommt, können sich Erkrankungen ausbilden, z.B. hervorgerufen durch körpereigene oder -fremde Zellen, die sich ungebremst vermehren und durch Verdrängung oder Stoffwechselprodukte andere Zellen beeinträchtigen. Dies trifft auf Krankheitserreger bei bakteriellen Infektionen oder auf Tumorzellen einer Krebserkrankung zu.

Breit wirksame Medikamente gegen diese krank machenden Zellen sind mit Penicillin als dem ersten Vertreter der Antibiotika seit den 30er Jahren im medizinischen Gebrauch. Und mit Stickstoff-Lost wird als erstem Vertreter der Zytostatika seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts Krebs behandelt. Seitdem sind viele weitere Vertreter dieser Wirkmittelklassen hinzugekommen, welche sich durch unterschiedliche Spezifitäten und Nebenwirkungen auszeichnen. Unterschiedliche Bakterien-Spezies und -Stämme können ganz verschieden stark auf ein Antibiotikum ansprechen. Tumorzellen sind abhängig von ihrem Ursprungsgewebe unterschiedlich empfindlich auf einzelne Zytostatika. Doch nicht nur die medizinische Forschung hat sich weiter entwickelt, auch die Krankheitserreger passen sich an häufig angewendete Antibiotika an und bilden immer häufiger Resistenzen aus.

Dies stellt den behandelnden Arzt vor größer werdende Probleme. Ist die Sensitivität der Krankheit hervorrufenden Zellen nicht bekannt, werden zu hohe Konzentrationen der Wirkmittel verabreicht mit den damit verbundenen unnötig starken Nebenwirkungen oder die Wirkung ist nicht ausreichend und wertvolle Zeit geht verloren, bis die richtige Konzentration oder ein wirksames Mittel ermittelt ist.

Um eine geeignete Medikation vor der Behandlung auszuwählen, wäre es daher optimal, wenn im Labor die Wirksamkeit der zur Auswahl stehenden Medikamente in verschiedenen Konzentrationen an den Zellen vorher untersucht würde. Für diese Untersuchung müssen allerdings Proben dieser Zellen gewonnen werden, was sich schwierig gestaltet, wenn der Ort des Krankheitsherds nicht bekannt ist.

Eine gängige Methode zur Gewinnung bakterieller Krankheitserreger ist die Entnahme von Blutproben. Ist die Infektion fortgeschritten, treten die Erreger aus dem befallenen Organ in die Blutbahn ein, es entsteht eine Sepsis oder umgangssprachlich Blutvergiftung. Durch Entnahme einer Blutprobe und anschließende Anzucht in Blutkulturflaschen für weitere Untersuchungen können nun Erreger gewonnen werden. Das Heranwachsen einer Blutkultur dauert durchschnittlich 48h und gelingt bei Sepsis-Patienten nur bei jeder 10.

Blutprobe [2]. Für den Großteil der Patienten kann daher keine spezifische Wirkmittel-Empfehlung gegeben werden.

Die gesuchten Zellen in der Blutprobe sind selten. Bei Sepsispatienten kommen auf die gewöhnlichen $5 \cdot 10^{10}$ Blutzellen pro Milliliter manchmal weniger als 10 Krankheitserreger. Wäre es möglich, diese Zellen aus der Blutprobe zu isolieren, bestünde die begründete Hoffnung, dass Anzucht, Identifikation und Untersuchung der Zellen häufiger gelänge und schneller durchzuführen wäre.

Auch Krebszellen können im Blut gefunden werden. Ist der Krebs fortgeschritten, treten einzelne Krebszellen in die Blutbahn ein und verteilen sich im Körper. Diese zirkulierenden Tumorzellen, engl. *circulating tumor cells* (CTC), kommen typischer Weise in Konzentrationen von 1 - 10 Zellen pro Milliliter Blut vor und sind somit auch selten. Wenn es in der Routinediagnostik gelingen würde, diese CTCs zu isolieren, könnten genetische Untersuchungen oder auch direkte Anwendungen von Krebsmedikamenten Aussagen über eine geeignete Medikation geben.

Nicht nur zur Diagnostik auch für neuartige Behandlungsverfahren kann das Abtrennen seltener Zellen genutzt werden. In der Blutbahn kommen ganz natürlich Endotheliale Vorläuferzellen, engl. *endothelial progenitor cells* (EPC), noch nicht ausproliferierte Epithelzellen der Gefäßwand, vor. Diese Zellen sind bei der Regeneration und Neubildung von Gefäßen beteiligt. Eine Transplantation von EPC ist daher vielversprechend als Therapie, um durchblutungsgeschädigtes Gewebe zu heilen oder beim Tissue Engineering die Gefäßversorgung von neugebildetem Gewebe zu erzielen.

Voraussetzung hierfür sind Verfahren zum Durchmustern von Blutproben nach diesen seltenen Zellen mit einem Sortierprozess, welcher die gefundenen Zellen abtrennen kann, ohne deren Lebensfähigkeit negativ zu beeinflussen. Die Anforderung an ein Schaltverfahren, um diese Zellen aus einem Fluidstrom abzutrennen, liegt hierbei weniger bei der Schaltgeschwindigkeit – die Schaltereignisse sind ja schließlich selten – sondern bei den durch die zu sortierenden Zellen bestimmten Rahmenbedingungen. Die zirkulierenden Tumorzellen und Endothelzellen sind als eukaryotische Zellen eher empfindlich auf Scherkräfte. Bakterielle Krankheitserreger sind gefährdend für das Umfeld, wenn diese z.B. als Aerosol entweichen können.

Etablierte Geräte zum Durchmustern und Sortieren von Zellsuspensionen sind Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer, engl. *fluorescence-activated cell sorter* (FACS). Die Probe wird mit einer Düse in einen Strom aus Tröpfchen in Luft so vereinzelt, dass jedes Tröpfchen maximal eine Zelle beinhaltet. Abhängig von dem Messsignal der Zelle im Tröpfchen, wird dieses dann durch elektrische Felder vom Strom der restlichen Tröpfchen getrennt und separat aufgefangen. Diese FACS erreichen in der flexiblen Laborversion Preise im sechsstelligen Euro-Bereich und können eine Probe zur Zeit analysieren. Neben der Gefahr der keimbelasteten Aerosolbildung und der für menschliche Tumorzellen starken Beanspruchung durch Scherkräfte bei der Tröpfchenerzeugung, werden außerdem zu viele Ressourcen für eine einzelne Diagnose gebunden, als dass es für die Standarddiagnostik in der Klinik Anwendung finden könnte.

Eine mikrofluidische Umsetzung eines FACS könnte diese Widerstände überwinden, indem kompakte, zellschonende und geschlossene mikrofluidische Sortierkammern verwendet werden, von denen parallelisierbar in einem Gerät mehrere gleichzeitig zum Einsatz kommen können. In diesem Zusammenhang wird vom mikrofluidischen Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer, engl. *microfluidic fluorescence-activated cell sorter* (μ FACS), gesprochen.

1.2 Multifunktionswerkzeuge μ TAS und μ FACS*

Zunächst findet eine Durchmusterung der Zellen statt. Hierbei sind verschiedene charakterisierende Messgrößen erfassbar, wie z.B. Lichtstreuung, Brechungsindexänderung, Oberflächenplasmonenresonanzen, dielektrische Polarisierbarkeit und laserinduzierte Fluoreszenzemission, wobei die Fluoreszenzemission aufgrund ihrer kurzen Messdauer und Sensitivität sowie der Flexibilität die am häufigsten genutzte Methode darstellt. Flexibel ist sie, da unterschiedlichste Methoden beim Färben angewandt werden können. Fluoreszenzfarbstoffe können verwendet werden, welche z.B. intrinsisch das gefragte Merkmal, z.B. die Zellmembran oder das Erbgut, einfärben. Andere Farbstoffe werden erst von der Zelle selbst gebildet und zeigen die Aktivität, die Transkription, von Genabschnitten an. Weitere Farbstoffe erreichen als Konjugat mit Antikörpern durch Koppeln an Markermoleküle nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip hohe Spezifitäten und färben z.B. ganz bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen an. Bleibt es bei der Durchmusterung ohne Abtrennung von Zellen wird das System mikrofluidisches umfängliches Analysesystem, engl. *microfluidic total analysis system* (μ TAS), genannt.

Folgt auf die Messung von Fluoreszenz ein Sortierschritt, wird das mikrofluidische System als μ FACS bezeichnet. Die Funktion ist ganz ähnlich zu den Namensgebern FACS, welche schon seit Ende der 60er Jahre kommerziell vertrieben werden. Durch die Jahrzehnte lange Nutzung von FACS-Systemen sind die Methoden in der biologischen Forschung etabliert, jedoch bleiben manche Anwendungen unerschlossen, da der hohe Wartungs- und Bedienungsaufwand geschultes Personal voraussetzt, ein hoher Analytvolumenbedarf von mehreren hundert Mikrolitern besteht, aufgrund der Komplexität eine Parallelisierung nicht sinnvoll ist und der hohe Investitions- und Betriebsaufwand für manche Anwendung nicht wirtschaftlich ist, wie in der Routinediagnostik z.B. bei Sepsispatienten.

Die Nutzung von mikrofluidischen Systemen verspricht, diese Nachteile durch einen kompakten, einfach zu justierenden Aufbau, einen geringen Probenvolumenbedarf und die Möglichkeit der Parallelisierung zu beseitigen. Durch weitere mikrofluidische Komponenten, wie z.B. Mischer oder Kulturgefäße, ist eine funktionale Erweiterung möglich, womit bestehende Anwendungen effizienter zu erfüllen sind und neue Methoden realisierbar werden [3].

Das erste μ TAS wurde 1993 von Sobek et. al. vorgestellt [4]. Seitdem gibt es mehrere Arbeitsgruppen, welche an μ TAS und μ FACS forschen und arbeiten. Eine im Oktober 2019 in Web of Science durchgeführte Suche [5] mit den UND-verknüpften Suchbegriffen „microfluidic“, „cell“ und „sorting“ in Titel, Zusammenfassung und Schlüsselwörtern ergab alleine für das Veröffentlichungsjahr 2018 eine Gesamtzahl von 114 Veröffentlichungen, was die rege Aktivität auf dem Feld der mikrofluidischen Durchmusterungs- und Sortiermethoden für Zellen widerspiegelt.

Zur Realisierung von μ FACS wurden verschiedene Methoden zum Aktuieren des Sortiervorgangs entwickelt. Bisher hat sich jedoch noch keine der Methoden als stark bevorzugt herausgestellt und gegenüber den anderen durchsetzen können. Ein Grund kann der häufig komplexe Aufbau der mikrofluidischen Systeme sein. Diese haben für das Schalten beim Sortieren z.B. Piezo-Aktoren oder Elektroden in das Kanalsystem integriert. Dies erschwert die Fertigung und erhöht den Ausfall des Systems bei längerem Betrieb. Daher

* μ TAS = mikrofluidisches umfängliches Analysesystem, engl. *microfluidic total analysis system*, μ FACS = mikrofluidischer Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer, engl. *microfluidic fluorescence activated cell sorter*

besteht Bedarf an einem μ FACS, welches einen robusten Aufbau besitzt, um ohne hohen Betriebsaufwand zuverlässig zu arbeiten.

Gelingt es, aus einer mikrofluidischen passiven Flusszelle aus transparentem Material, einem Fluoreszenzsensor und einem optischen Schaltverfahren zum Aussortieren einzelner Zellen einen rein optisch aktuierten Sorter zu realisieren, besteht das Potential, diese Anforderungen zu erfüllen. Durch einen monolithisch umsetzbaren Aufbau des mikrofluidischen Systems kann diese Komponente getauscht werden, ohne weitere hochpreisige Komponenten – wie den Fluoreszenzsensor oder den Schaltaktuator – mitzutauschen. Durch die fertigungsbedingte hohe Maßhaltigkeit der meisten Mikrofluidiken besteht die Chance, Personalaufwand für Wartung und Betrieb zu reduzieren.

Eine Möglichkeit, ein solches rein optisches μ FACS zu realisieren, ist ein opto-kalorisches Schalt-Prinzip, das die durch Absorption optischer Strahlung hervorgerufene Erwärmung des Fluids und die damit verbundene Ausdehnung und Viskositätsänderung zum Schalten nutzt. Insbesondere die Ausnutzung der Viskositätsänderung ist hierbei ein neuartiger Ansatz. Diese Methode des optischen Aktuierens wurde bisher noch nicht untersucht. Um diese zu realisieren sind daher grundlegende Überlegungen zur Funktionsweise und Gestaltung eines solchen Schalters erforderlich. Auch wenn die einzelnen physikalischen Phänomene, wie die optische Absorption, die Temperaturabhängigkeit der Viskosität und der thermischen Ausdehnung von Fluiden hinlänglich bekannt sind, besitzt das Zusammenspiel dieser Phänomene bei dem opto-kalorischen Schalter eine Komplexität, die einer Analyse bedarf. Zu klären gilt, wie ein grundsätzlicher Aufbau beschrieben und gegliedert wird. Wie werden die Prozesse physikalisch beschrieben? Wie kann eine effiziente Energieeinkopplung für eine starke Schaltwirkung erzielt werden? Wie ist der Schaltverlauf während eines geschlossenen Schaltzyklus? Was sind die Einflussgrößen? Wie kann man den Schaltvorgang charakterisieren und die Hauptmerkmale quantifizieren? Was sind die maximal zu erreichenden Schaltfrequenzen?

Die abschließende Frage ist, ob das opto-kalorische Schalt-Prinzip das Potenzial hat, vergleichbare Werte wie die kommerziell etablierten Methoden zu erzielen.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob durch optischen Energieeintrag und die Ausnutzung der temperaturabhängigen Viskosität und der spezifischen Dichte eines Trägerstroms ein rein optisches μ FACS realisiert werden kann. Hierfür sollen die wesentlichen physikalischen Prozesse betrachtet werden: Der Energieeintrag, die Viskositätsänderung, die Änderung der spezifischen Dichte, die Kanalgeometrien, die Massenträgheit und die Reibung.

Ausgehend von den theoretischen Erkenntnissen soll ein Testsystem eines opto-kalorischen Schalters entworfen und gefertigt werden. An diesem soll der Schaltvorgang sowie das Sortieren von Partikeln demonstriert und charakterisiert werden. Anhand der Ergebnisse sollen die theoretischen Betrachtungen überprüft werden. Methoden sind zu entwickeln, welche die dynamischen Eigenschaften des Schaltvorgangs quantifizieren. Dies umfasst Merkmale zur zeitlichen Beschreibung in Form einer Schaltzeit und zur Schaltwirkung in Form einer Schaltauslenkung bzw. -amplitude.

Anschließend soll der Schaltvorgang an Test-Partikeln untersucht werden und es sollen – anhand statistischer Untersuchungen der Schaltwirkung auf die Partikel – quantitative Werte zu der Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Schaltvorgänge in Form einer Sortiersicher-

heit bestimmt werden.

Anhand der ermittelten charakteristischen Größen soll eine Einordnung dieses Schaltprinzips in den Stand der Technik und Forschung erfolgen.