



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 07 487 A1** 2004.09.09

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 07 487.2**
(22) Anmeldetag: **21.02.2003**
(43) Offenlegungstag: **09.09.2004**

(51) Int Cl.7: **A61M 25/06**
A61M 5/158, A61B 10/00, A61B 16/00,
A61B 17/34, C12M 1/26, C12Q 1/00

(71) Anmelder:
**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80686 München, DE**

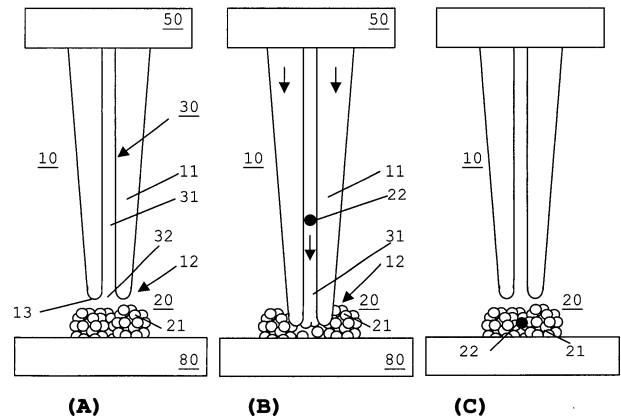
(72) Erfinder:
Fuhr, Günter R., Prof. Dr., 13187 Berlin, DE;
Zimmermann, Heiko, Dr., 66113 Saarbrücken, DE

(74) Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Vorrichtungen zur verletzungsfreien Bewegung einer Sonde durch biologisches Zellmaterial**

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Bewegung einer Sonde (10) durch ein Zellmaterial (20) beschrieben, das aus biologischen Zellen (21) gebildet ist, wobei die Sonde (10) die Zellen (21) verletzungsfrei verdrängt. Es werden auch eine Sonde (10) zur Durchführung des Verfahrens und ein Zellmanipulator, der mit mindestens einer derartigen Sonde ausgestattet ist, beschrieben.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Bewegung einer Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung, insbesondere einer Sonde durch ein biologisches Zellmaterial, das aus biologischen Zellen gebildet ist, Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtungen, die zur Durchführung derartiger Verfahren eingerichtet sind, Zellmanipulatoren, die mindestens eine derartige Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung aufweisen, und Anwendungen der genannten Verfahren.

[0002] In der Medizin, Biotechnologie und Biochemie gibt es zahlreiche Verfahren, bei denen biologische Zellen untersucht oder bearbeitet oder zur Untersuchung oder Bearbeitung biologischen Materials verwendet werden. Beispielsweise werden zur medizinischen Zelltherapie einem tierischen oder menschlichen Probanden Zellen entnommen, außerhalb des Probandenkörpers behandelt, gesammelt, sortiert und/oder kultiviert, um anschließend bestimmte Zellen oder Zellgruppen in den Probanden zurückzuführen. Besondere Vorteile erwartet man von der medizinischen Zelltherapie mit Stammzellen, da diese die Fähigkeit zur Differenzierung zu nahezu allen Zelltypen des Körpers besitzen und daher Kandidaten für individuelle Zelltherapien und für die in vitro Regenerierung von Gewebe darstellen. Heute geht man davon aus, dass adulte oder embryonale Stammzellen unter geeigneten Bedingungen zu nahezu allen Zelleistungen des Körpers und damit auch zur Bildung oder Regeneration verschiedener Gewebe geeignet sind. Es besteht ein starkes Interesse an einer sicheren und reproduzierbaren Handhabung biologischer Zellen.

[0003] Wesentliche Aufgaben bei der Untersuchung oder Manipulation biologischer Zellen, insbesondere in Zusammenhang mit der medizinischen Zelltherapie und der Gewebearbeitung (Tissue Engineering) bestehen darin, dass an vorbestimmten Orten bspw. im Gewebe oder in einem Zellverband mit einer Genauigkeit im μm -Bereich einzelne, vorher auswählbare Zellen oder Zellgruppen eingefügt oder entnommen oder definierte Messungen durchgeführt werden können. Diese Aufgaben müssen ohne Beeinträchtigung oder Schädigung der Zellen oder des Gewebes mit hoher Reproduzierbarkeit, Steuerbarkeit und Genauigkeit lösbar sein. Diese Anforderungen werden bisher nicht befriedigend erfüllt. Beispielsweise wurden bei Tierversuchen trotz gleichartig durchgeführter Verfahren, z. B. zur Injektion von Zellen in erkranktes Gewebe widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Es wurde festgestellt, dass der positive Verlauf einer Geweberegeneration empfindlich von den Verfahrensbedingungen, insbesondere von der Art der Injektion, der Zahl der eingebrachten Zellen oder Substanzen und der verwendeten Injektionswerkzeuge abhängt. Bei zahlreichen, in der Praxis bekannt gewordenen Experimenten trat nicht die gewünschte Regeneration oder Neubildung eines

Zell- oder Gewebetyps ein, sondern bspw. eine Induktion von Tumoren. Es wird davon ausgegangen, dass die Induktion von Tumoren als unkontrollierte Zellvermehrung von Stammzellen durch physikalische, chemische oder mechanische Fremdeinflüsse am Injektionsort befördert wird. Diese Einflüsse können mit den herkömmlichen Injektionstechniken nicht reproduzierbar eingestellt oder wenigstens erfasst werden.

[0004] Bisher werden als Injektionswerkzeuge Kanülen oder Spritzenadeln verwendet. Beispielsweise zeigt **Fig. 7** die Spitze einer herkömmlichen Injektionskanüle **10'** in vergrößerter Seitenansicht. Die Injektionskanüle **10'** besitzt einen hohlen Kanülenkörper **11'**, dessen freies Ende **12'** zur Bildung einer Spitze angeschrägt und ggf. geschliffen ist. Um einen möglichst geraden und reproduzierbaren Injektionskanal bspw. in einem Gewebe zu bilden, sind der Kanülenkörper **11'** möglichst dünn und das Ende **12'** spitz und scharf ausgeführt. Obwohl die herkömmliche Injektionskanüle **10'** für Präzisionsanwendungen einen extrem geringen Durchmesser im Sub-mm-Bereich hat und das Ende **12'** in eine Sub- μm -Spitze ausläuft, ist eine verletzungsfreie Einführung in ein Gewebe grundsätzlich ausgeschlossen. Sobald die Spitze mit der bisher verwendeten hohen Einstichgeschwindigkeit in einem Gewebe auf Zellen trifft, werden diese mechanisch verletzt, zum Beispiel zerdrückt oder zerrissen.

[0005] Aus der Medizintechnik ist allgemein bekannt, subkutane Endoskopie durch Einschleiben von Endoskopen oder Hilfsgeräten in subkutanes Gewebe durchzuführen. Die subkutane Endoskopie ist jedoch immer mit einer Verletzung von Gewebe und Blutgefäßen verbunden und daher für die biotechnologische Bearbeitung von Zellmaterialien ungeeignet.

[0006] Die genannten Probleme bei der Zelltherapie und die bisher zum Teil unbefriedigenden Ergebnisse beim Tissue Engineering stellen gegenwärtig die wichtigsten Beschränkungen und Verzögerungen vor einer breiten Anwendung dieser Verfahren in der Biotechnologie und der Medizin dar.

Aufgabenstellung

[0007] Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Bewegung eines Fremdkörpers, insbesondere einer Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung (oder: Sonde) durch ein Zellmaterial, das aus biologischen Zellen gebildet ist, bereitzustellen, mit denen den Problemen der herkömmlichen Injektionsverfahren begegnet wird und die grundsätzlich geeignet sind, die oben aufgeführten Anforderungen an die Zelltechniken zu erfüllen. Die Aufgabe der Erfindung ist es insbesondere, verbesserte Verfahren zur Einführung einer Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung in Zellgewebe oder Zellhaufen bereitzustellen, mit denen in das Zellmaterial Zellen oder andere Substanzen einführbar, aus dem Zellmaterial Zellen oder Zellbestandtei-

le entnehmbar und/oder im Zellmaterial Messungen durchführbar sind. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtungen zur Durchführung derartiger Verfahren und mit mindestens einer derartigen Einrichtung ausgestattete Injektionseinrichtungen bereitzustellen, mit denen die Nachteile herkömmlicher Injektionswerkzeuge überwunden werden. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, neue Anwendungen der Einführung von Sonden in Zellmaterial anzugeben.

[0008] Diese Aufgaben werden mit Verfahren, Sonden und Zellmanipulatoren mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 13 oder 23 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

[0009] Verfahrensbezogen basiert die Erfindung auf der allgemeinen technischen Lehre, eine Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung (im folgenden: Sonde) derartig durch ein Zellmaterial mit biologischen Zellen zu bewegen, dass die Sonde die Zellen verletzungsfrei verdrängt. Die Sonde wird so im Zellmaterial betätigt, dass die Zellen von der Oberfläche der Sonde auseinander geschoben oder voneinander getrennt werden; so dass Raum für die Sonde geschaffen wird, wobei die Zellen bei der Verschiebung oder Trennung in ihrem physikalischen und chemischen Zustand unverändert bleiben. Eine verletzungsfreie Verdrängung von Zellen ist insbesondere dann gegeben, wenn bei der Bewegung der Sonde die Zellen in direktem Kontakt mit dem Sondenkörper oder tiefer im Zellmaterial liegende Zellen zwar deformiert werden oder ihre räumliche Lage verändern, dabei jedoch keine chemischen Signale in Form von Botenstoffen oder Substanzabsonderungen abgeben.

[0010] Unter Zellmaterial wird hier allgemein eine Anhäufung von Zellen verstanden, die über Adhäsionskontakte (makromolekulare chemische Verbindungen, keine van der Waals-Bindungen) mit ihrer Umgebung in Verbindung stehen. Das Zellmaterial ist bspw. ein Verbund oder Zusammenschluss von Einzelzellen, ein Gewebe (Verband gleichartig differenzierter Zellen) oder ein Organ. Der Verbund von Einzelzellen kann zusätzliche synthetische Komponenten, zum Beispiel ein synthetisches Matrixmaterial enthalten. Vorteilhafterweise ergibt sich damit ein breiter Anwendungsbereich der Erfindung. Die Sonde ist allgemein ein Fremdkörper oder Objekt aus einem in Bezug auf das Zellmaterial abgrenzbaren Material, vorzugsweise mit einer festen Oberfläche. Die Sonde kann insbesondere eine Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung wie eine Injektionskapillare oder wie elektrische Leitungen umfassen, die in das Zellmaterial (zum Beispiel Gehirn) eingeführt werden.

[0011] Die Erfindung basiert insbesondere auf den folgenden Überlegungen der Erfinder. Es wurde erstens erkannt, dass die bisher verschiedenartig aus-

fallenden Reaktionen bspw. injizierter Zellen in einem Gewebe oder einen Zellverband darin begründet liegen, dass durch die Einführung eines Injektionswerkzeugs Zellen im vorhandenen Zellmaterial verletzt oder zerstört und damit Wundeffekte hervorgerufen werden. Bei einer Zell- oder Gewebeverwundung werden chemische Signale (Aussendung molekularer Botenstoffe) oder zellulär getragene Prozesse, wie z. B. eine Fibroplasteneinwanderung, eine Fibronektinaussonderung oder dgl. erzeugt. Die Reaktion verletzter Zellen beeinflusst die Wirkung der injizierten Zellen oder Zusatzstoffe. Beispielsweise verhalten sich Stammzellen in der Umgebung einer Zellverwundung anders als Stammzellen in einem intakten Zellmaterial. Zweitens haben die Erfinder festgestellt, dass entgegen bisherigen Vorstellungen selbst adhäsiv gebundene Zellen verletzungsfrei räumlich verdrängt werden können. Dies ermöglicht die mechanische Einführung von Sonden in Zellmaterial. Die Zellen bleiben bei der Bewegung der Sonde durch das Zellmaterial unverletzt, wenn die Vortriebsgeschwindigkeit genügend klein ist, dass sich die Adhäsionskontakte zwischen den Zellen auf natürliche, d. h. die Zellen nicht beeinflussende oder zerstörende Weise lösen und in der sich verändernden Umgebung neu bilden lassen.

[0012] Durch die Bewegung der Sonde mittels verletzungsfreier Verdrängung von Zellen können die o. g. Anforderungen vollständig erfüllt werden. Weder das Zielgewebe noch die einzusetzenden individuellen Zellen oder Substanzen werden geschädigt oder beeinträchtigt. Der physikalische, chemische und mechanische Zustand der Zellen kann vollständig charakterisiert werden. Schädliche Kontakte zwischen Zellen und Oberflächen von Fremdkörpern werden vermieden, zelluläre Signale durch Oberflächenberührungen werden unterbunden. Durch die verletzungsfreie Bewegung erfolgt die Zellmanipulation ideal schonend. Die Sonde kann zielgenau an einen bestimmten Ort im Zellmaterial geführt werden. Besonders vorteilhaft ist auch, dass Beschränkungen an die Größe der Sonde, wie sie bei herkömmlichen Injektionskanülen bestanden; überwunden werden. Ein erfindungsgemäß durch das Zellmaterial bewegtes Werkzeug ermöglicht eine genaue und reproduzierbare Erfassung der Zahl und Art der in das Zellmaterial eingebrachten Zellen oder Zusatzstoffe.

[0013] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Sonde mit einer Vortriebsgeschwindigkeit bewegt, die kleiner oder gleich einer Bezugsgeschwindigkeit ist, die durch die physiologische Bindungsrate biologischer Zellen bestimmt wird (Bindungsgeschwindigkeit der Zellen). Bei Einstellung dieser Vortriebsgeschwindigkeit kann die Sonde vorteilhafterweise verletzungsfrei durch Zellen in einem natürlich gegebenen Verbund bewegt werden. Die Vortriebsgeschwindigkeit wird an die permanent im Gewebe stattfindende Zellbewegung angepasst. Es ist bspw. bekannt, dass sich bestimmte Typen von Immunzellen (z. B. Makrophagen) durch Verdrän-

gung vorhandener Zellen selbst durch dichtes Gewebe bewegen. Die Erfinder haben festgestellt, dass überraschenderweise diese Verdrängungsbewegung auch mit Sonden, die erheblich größer als Immunzellen sind und makroskopische Dimensionen im Sub-Millimeter- bis Zentimeterbereich besitzen, bei Einstellung der genannten Vortriebsgeschwindigkeit realisierbar ist. Während der Sondenbewegung werden laufend makromolekulare Bindungen (zum Beispiel membranständige Makromoleküle der Integrin- und Catherinfamilie) zwischen den Zellen getrennt und zum Beispiel mit der Sondenoberfläche neu geknüpft.

[0014] Die physiologische Bezugsgeschwindigkeit ist an sich bekannt (siehe z. B. G. Fuhr et al. in "Biol. Chem.", 1998, Bd. 379, S. 1161-1173) oder an tierischen oder humanen Zellen messbar. Die interessierende Bindungsrate ist bspw. durch Messung der Dynamik von Adhäsionsmustern einzelner Zellen auf künstlichen Oberflächen ableitbar.

[0015] Wenn die Sonde einer permanent wirkenden Vortriebskraft ausgesetzt wird, kann die Bewegung der Sonde mit der gewünschten Vortriebsgeschwindigkeit vorteilhafterweise selbst bei geringstem Kraftaufwand durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Verwendung von Antriebseinrichtungen mit geringer Leistung. Wenn die Vortriebskraft durch eine mechanische Druckkraft gebildet wird, können sich Vorteile für die Übertragung der Vortriebskraft auf die Sonde ergeben. Wenn die Vortriebskraft durch Kräfte in elektrischen oder magnetischen Feldern gebildet wird, können sich Vorteile für den Aufbau einer Injektionseinrichtung ergeben, da die Vortriebskräfte über eine Fernwirkung ausgeübt werden können.

[0016] Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung kann die Vortriebskraft durch interzelluläre Kräfte gebildet werden. Die Sonde kann unter der Wirkung der im Zellmaterial bestehenden Adhäsionsbindungen durch das Zellmaterial ohne einen äußeren Antrieb hindurch wandern. Wenn beispielsweise durch eine Oberflächenbehandlung der Sonde diese an einer Seite eine stärkere Neigung zur Bildung von Adhäsionsbindungen als an einer anderen Seite besitzt, kann die Sonde durch die Erzeugung der Adhäsionsbindungen vorwärtsgetrieben werden, was ggf. noch durch die Form der Sonde und/oder die anderen o. g. Vortriebskräfte unterstützt wird.

[0017] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Sonde in einer Richtung bewegt, die parallel zur Ausrichtung einer langgestreckten Form der Sonde verläuft. Dabei können sich Vorteile in Bezug auf die verletzungsfreie Verdrängung der Zellen ergeben. Die Verdrängung muss lediglich an der Vorderseite der Sonde erfolgen, die im Vergleich zur übrigen Oberfläche einen sehr kleinen Flächenausschnitt darstellt. Des Weiteren besitzt diese Ausführungsform den Vorteil, mit herkömmlichen Injektionstechniken unter Verwendung von Spritzen, Kanülen oder Kapillaren kompatibel zu sein. Die Sonde kann mit an sich verfügbaren Einrichtungen zur

Manipulation von Zellen oder Zellsuspensionen kombiniert werden. Es wird insbesondere ermöglicht, dass mit der Sonde eine Substanz in das Zellmaterial zugeführt wird. Vorteilhafterweise können hierzu an sich bekannte Flüssigkeitsfördereinrichtungen, wie z. B. Pumpen oder dgl. verwendet werden.

[0018] Alternativ kann eine seitliche Bewegung der Sonde vorgesehen sein, bei der eine Bewegungsrichtung eingestellt wird, die von der z. B. langgestreckten Form der Sonde abweicht. Eine seitliche Bewegung der Sonde kann allgemein auch eine radiale Ausdehnung des Sondenkörpers im Zellmaterial umfassen (Aufweitungsbewegung).

[0019] Besondere Vorteile für die beabsichtigten Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin können sich ergeben, wenn mit der Sonde mindestens eine Zelle in das Zellmaterial zugeführt wird, da die Zelle bei Injektion in das Zellmaterial dieses in einem physiologischen unverletzten Zustand vorfindet. Die mindestens eine Zelle wird in das Innere des unverletzten Zellmaterials eingebettet. Es können insbesondere Stammzellen in Gewebe eingepflanzt werden, um eine gewebespezifische Differenzierung der Stammzellen zu bewirken. Degenerationen oder Tumorbildungen können unterdrückt werden.

[0020] Vorteilhafterweise ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren auch die Injektion biologischer Zellen in einem gefrorenen Zustand. Nach einer Kryokonservierung können eine oder mehrere Zellen im gefrorenen Zustand in das Zellmaterial eingebettet und dort aufgetaut werden. Unmittelbar während des Auftauens werden die zellulären Prozesse unter den physiologischen Bedingungen im Zellmaterial gestartet.

[0021] Gemäß einer alternativen Ausführungsform der Erfindung wird mit der Sonde mindestens eine Zelle aus dem Zellmaterial entnommen. Die Sonde bildet ein Biopsiewerkzeug. Bei dieser Ausführungsform können sich Vorteile für die Gewinnung nicht-modifizierter, physiologischer Zellen ergeben.

[0022] Das erfindungsgemäße Prinzip der verletzungsfreien Verdrängung von Zellen ermöglicht die Verwendung von Sonden mit Dimensionen, die auch eine Integration von Sensoren ermöglichen. Gemäß einer Variante der Erfindung ist daher vorgesehen, dass mit der Sonde Eigenschaften des Zellmaterials, von injizierten Zellen oder von extrahierten Zellen erfasst werden.

[0023] Besondere Vorteile der Erfindung ergeben sich, wenn die Vortriebsgeschwindigkeit der Sonde in einem Geschwindigkeitsbereich von 0.1 $\mu\text{m}/\text{h}$ bis 1 mm/h, vorzugsweise im Bereich von 1 $\mu\text{m}/\text{h}$ bis zu 500 $\mu\text{m}/\text{h}$ gewählt wird. In diesem Geschwindigkeitsbereich liegen die Bindungsraten des Aufbaus und des Abbaus von makromolekularen Bindungen, die typischerweise durch membranständige Makromoleküle der Integrin- und Catherinfamilie vermittelt werden. Die bevorzugten Geschwindigkeitsbereiche entsprechen den Geschwindigkeiten der Zellbewegung von insbesondere Fibroblasten, Makrophagen, Lym-

phozyten, Chondrozyten oder Tumorzellen. Vorteilhafterweise kann bei Einstellung einer derart geringen Vortriebsgeschwindigkeit die Position der Sonde mit einer hohen Genauigkeit von bis zu $\pm 1 \mu\text{m}$ eingestellt werden. Die Vortriebsgeschwindigkeiten in den genannten Bereichen entsprechen den aktiven endogenen Bewegungsgeschwindigkeiten von Zellen in und auf Gewebe. Die Bewegung der Sonde bewirkt damit einen permanenten An- und Umbau der Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Sondenoberfläche, wobei durch die permanent wirkende Vortriebskraft eine Verdrängung der Zellen gefördert wird.

[0024] Vorteilhafterweise können je nach Anwendungsfall verschiedene Bewegungstypen der Sonde, insbesondere Bewegungen mit einem Netto-Vorschub oder einem Netto-Rückzug, diskontinuierliche oder in Teilabschnitte zerlegte Bewegungen, oszillatorische, gleichförmige oder beschleunigte Bewegungen realisiert werden.

[0025] Besondere Vorteile können sich ergeben, wenn das erfindungsgemäße Verfahren an Zellmaterial ausgeführt wird, das sich außerhalb eines tierischen oder menschlichen Organismus befindet. Das Zellmaterial kann unter geeigneten Kultivierungsbedingungen auf einem festen Träger angeordnet werden, der die Gegenkraft zur Ausübung der Vortriebskraft aufbringt. Das Zellmaterial und die Sonde können mit hoher Präzision positioniert werden.

[0026] Alternativ kann sich das Zellmaterial im Verbund in einem lebenden Organismus befinden. Die Sonde kann bspw. als Untersuchungs- sonde, Biopsiewerkzeug oder Injektionswerkzeug in Gewebe eingeführt werden. Die Einführung erfolgt wegen der geringen Vortriebsgeschwindigkeit in einem Zustand, in dem das betroffene Gewebe fixiert, z. B. mit dem umliegenden Teil des Organismus ortsfest auf einem Träger gehalten ist. Die Verwendung eines Narkosemittels ist für die Ruhstellung bevorzugt, mit Blick auf die Verletzungsfreiheit des Verfahrens jedoch nicht zwingend erforderlich.

[0027] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Manipulations- und/oder Untersuchungseinrichtung, insbesondere eine Sonde oder ein Untersuchungs-, Biopsie- und/oder Injektionswerkzeug, die dazu eingerichtet ist, zumindest teilweise in das Zellmaterial eingeführt zu werden. Die Sonde besitzt einen Sondenkörper, der durch das Zellmaterial beweglich ist und an mindestens einer Vorderseite, die bei einer Bewegung der Sonde durch das Zellmaterial ein relativ zur Bewegungsrichtung vorderes Ende, Frontende oder vorderes Verdrängungs- oder Trennteil bildet, eine abgerundete Oberfläche aufweist. Die Vorderseite besitzt eine Kontur, die frei von Spitzen, Stufen, Kanten, Schneiden und dgl. ist. Die Vorderseite besitzt eine mathematisch stetige Krümmungskontur, die als Ausschnitt einer Oberfläche einer Kugel, eines Ellipsoiden, eines Toroiden oder eine Überlagerung aus diesen beschrieben werden kann. Die Bereitstellung der abgerundeten Oberfläche an min-

destens einer Vorderseite besitzt den Vorteil, dass beim Einführen der Sonde entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren im Zellmaterial Verletzungen vermieden werden, da die Vortriebskraft gleichmäßig über die gesamte Abrundung der Vorderseite wirkt. Lokale Druckerhöhungen auf einzelne Zellen, die bspw. durch Spitzen oder Stufen verursacht werden, können mit dem erfindungsgemäßen Werkzeug ausgeschlossen werden. Damit unterscheidet sich die Sonde grundsätzlich von herkömmlichen Injektionswerkzeugen, wie z. B. Spritzenadeln, bei denen die Verletzung notwendig durch die Führung eines Schnittes durch das Zellmaterial gegeben ist.

[0028] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besitzt die Sondenvorderseite in einzelnen Bereichen der abgerundeten Oberfläche einen lokalen Krümmungsradius, der größer als $10 \mu\text{m}$ ist. Damit ist die abgerundete Oberfläche größer als die Zellarten in den typischerweise behandelten Zellmaterialien, insbesondere Zellarten in Gewebe. Damit wird die Verletzungswahrscheinlichkeit bei der Bewegung der Sonde vermindert. Besondere Vorteile können sich mit einem lokalen Krümmungsradius ergeben, der größer als $20 \mu\text{m}$, vorzugsweise größer als 0.1 mm ist. Für die Anwendung bei Zellkulturen ist der Krümmungsradius kleiner als 5 mm , vorzugsweise kleiner als 2 mm .

[0029] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die abgerundete Oberfläche durch ein Material (Bindungsmaterial) gebildet, das ein adhärenthes Anhaften von Zellen auf der Oberfläche fördert. Das Bindungsmaterial bildet den Sondenkörper, mindestens die Vorderseite des Sondenkörpers oder eine Beschichtung mindestens auf der Vorderseite des Sondenkörpers. Es besteht bspw. aus Fibronektin oder Kollagen. Diese Ausführungsform der Erfindung kann Vorteile in Bezug auf eine Erhöhung der Bindungsgeschwindigkeit bei der verdrängenden Bewegung der Sonde durch das Zellmaterial besitzen. Das Bindungsmaterial kann alternativ durch eine Aufrauung mit charakteristischen Strukturgrößen im Sub- μm -Bereich besitzen, so dass die Anbindung des Zellmaterials an die Sonde gefördert wird. Ebenso wie die Abrundung mindestens einer Oberfläche stellt auch die Verwendung eines adhäsionsfördernden Materials einen wesentlichen und grundsätzlichen Unterschied des erfindungsgemäßen Werkzeugs gegenüber herkömmlichen Injektionsadeln dar.

[0030] Gemäß einer vorteilhaften Variante der Erfindung ist in den Sondenkörper mindestens ein Funktionsteil integriert. Das Funktionsteil stellt allgemein eine strukturelle Komponente des Sondenkörpers dar, die für eine bestimmte technische Funktion der Sonde eingerichtet ist. Vorteilhafterweise ist das Funktionsteil in den Sondenkörper integriert, so dass die verletzungsfreie Verdrängungsbewegung nicht gestört wird.

[0031] Das Funktionsteil umfasst gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung einen

Hohlraum der zur Aufnahme und/oder Leitung von Zellen oder Zusatzstoffen in oder aus dem Zellmaterial eingerichtet ist. Der im Sondenkörper gebildete Hohlraum besitzt einerseits mindestens eine Öffnung, die in einer Oberfläche des Werkzeugkörpers gebildet ist. Andererseits kann ein Anschluss des Hohlraums an ein externes Probenreservoir vorgesehen sein.

[0032] Des Weiteren kann das Funktionsteil mindestens einen Sensor im Sondenkörper umfassen, der zur Erfassung von chemischen oder physikalischen Eigenschaften von Zellen oder Substanzen im Zellmaterial oder im Inneren des Sondenkörpers eingerichtet ist. Wenn der mindestens eine Sensor im Hohlraum des Sondenkörpers angeordnet ist, können sich Vorteile für die Überwachung einer Injektion oder einer Biopsie ergeben.

[0033] Das Funktionsteil kann ferner mindestens einen elektrischen Leiter umfassen, der bis in die abgerundete Vorderseite der Sonde verläuft. Der Leiter kann zum Beispiel in die Sonde eingeschmolzen sein und eine Messelektrode bilden. Es kann auch mindestens ein Lichtleiter zum Beispiel für spektroskopische Messungen im Zellmaterial vorgesehen sein.

[0034] Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Sondenkörper eine gerade, langgestreckte Form entlang einer geraden Achse (Kapillare, Rohr, Hohlzylinder) mit einem ersten Ende, das die abgerundete Vorderseite ist, und einem zweiten Ende gebildet wird, das mit einer Reservoireinrichtung verbunden ist. Das erste Ende kann eine Abrundung der Kapillarwand (ringförmige Abrundung) oder des Ende des Sondenkörpers (kugelförmige Abrundung) umfassen. Bei diesen Gestaltungen ist der Sondenkörper vorzugsweise eine Spritzennadel mit einem freien Ende, an dem die Wand der Spritzennadel abgerundet ist. Diese Ausführungsform der Erfindung kann wegen ihrer Kompatibilität mit herkömmlichen Injektionswerkzeugen Vorteile besitzen.

[0035] Alternativ kann der Sondenkörper durch einen Formkörper gebildet werden, dessen gesamte Oberfläche abgerundet wie die o. g. Vorderseite ist. Vorteilhafterweise kann der Sondenkörper somit vollständig vom Zellmaterial umhüllt ohne mechanische Verbindung mit zusätzlichen äußeren Einrichtungen durch das Zellmaterial bewegt werden.

[0036] Wenn der Sondenkörper mit mindestens einem Kraftelement ausgestattet wird, können sich Vorteile für die gezielte und gerichtete Einwirkung einer äußeren Vortriebskraft ergeben. Wenn das Kraftelement eine mechanische Halterung ist, ergeben sich Vorteile in Bezug auf die Zuverlässigkeit und Präzision der Kraftübertragung. Wenn das Kraftelement ein Magnetelement umfasst, wird vorteilhafterweise eine berührungsfreie Manipulation der Sonde im Zellmaterial ermöglicht.

[0037] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Zellmanipulator (insbesondere ein Arbeitsgerät wie zum Beispiel eine Injektions-, Biopsie- und/oder

Untersuchungseinrichtung für die Bearbeitung von Zellmaterial, wobei der Zellmanipulator mindestens eine erfindungsgemäße Sonde und mindestens eine Antriebseinrichtung zur Bewegung der mindestens einen Sonde umfasst. Der Zellmanipulator besitzt den besonderen Vorteil, dass die Sonde mit der Antriebseinrichtung mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit im Zellmaterial manipuliert werden kann. Wenn die Antriebseinrichtung einen piezoelektrischen Antrieb umfasst, ergeben sich Vorteile für die Steuerbarkeit der Sondenbewegung. Alternativ kann die Antriebseinrichtung durch einen Magnetantrieb gebildet werden, wodurch sich Vorteile in Bezug auf eine berührungslose Übertragung der Vortriebskraft ergeben. Des Weiteren kann die Antriebseinrichtung einen Federantrieb umfassen, so dass sich Vorteile in Bezug auf einen besonders einfachen Aufbau der Manipulationseinrichtung ergeben.

[0038] Gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist der Zellmanipulator mit einer Positioniereinrichtung zur Steuerung der Antriebseinrichtung, einer Detektoreinrichtung zur Erfassung der Position des mindestens einen Werkzeugs und/oder einer Trägereinrichtung zur Aufnahme von Zellmaterial ausgestattet.

[0039] Bevorzugte Anwendungen der Erfindung sind die in vitro Zellkultur, das Tissue Engineering in der Biotechnologie, die Schaffung von Gewebemodellen für die Pharmakologie und die medizinische Therapie.

[0040] Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

[0041] **Fig. 1:** den Ablauf einer Zellinjektion entsprechend einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens,

[0042] **Fig. 2:** verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Sonden,

[0043] **Fig. 3:** eine abgewandelte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Sonde,

[0044] **Fig. 4:** eine schematische Illustration eines erfindungsgemäßen Zellmanipulators,

[0045] **Fig. 5:** eine Illustration von weiteren Einzelheiten einer Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Zellmanipulators,

[0046] **Fig. 6:** eine Illustration einer radialen Aufweitungsbewegung einer Sonde, und

[0047] **Fig. 7:** die Spitze einer herkömmlichen Injektionsnadel.

[0048] Die erfindungsgemäße Bewegung einer Sonde durch ein Zellmaterial ist in **Fig. 1** am Beispiel der Injektion einer Zelle in eine Gewebeprobe gezeigt. Im linken Teil A von **Fig. 1** ist eine erfindungsgemäße Sonde **10** in schematischer Schnittansicht illustriert. Die Sonde **10** umfasst einen Sondenkörper **11**, der durch eine Hohlzylinder oder Pipettenspitze gebildet wird. Das freie Ende **12** des Sondenkörpers **11** stellt die Vorderseite **13** mit der erfindungsgemäß abgerundeten Oberfläche dar. Im Innern des Sondenkörpers **11** verläuft als Funktionsteil **30** ein Hohlkanal

31 mit einer Öffnung **32** am Ende **12**. Das entgegengesetzte Ende des Sondenkörpers **11** ist mit einer piezoelektrischen Antriebseinrichtung **50** verbunden.

[0049] In einer Ausgangsposition (A) befindet sich die Sonde **10** mit Abstand von einem Zellmaterial **20**, das auf einem Träger **80** angeordnet ist. Das Zellmaterial **20** ist bspw. ein Zellhaufen oder Sphäroid aus 50 bis 500 Zellen **21**, die über Adhäsionskontakte miteinander verbunden sind. In dieses Zellmaterial **20** sollen mit der nachfolgend beschriebenen Prozedur eine Stammzelle injiziert werden, um diese im Zellmaterial zu einer zellspezifischen Differenzierung zu veranlassen.

[0050] Gemäß dem mittleren Teilbild B von **Fig. 1** wird die Sonde **10** in das Zellmaterial **20** geschoben, wobei die Zellen **21** des Zellmaterials verdrängt werden. Sobald das Ende **12** auf dem Zellmaterial **20** aufsitzt, bilden sich Adhäsionskontakte mit den Zellen **12**. Unter der Wirkung der permanent wirkenden Vortriebskraft der Antriebseinrichtung **50** werden die Adhäsionskontakte laufend umgeordnet, so dass zunächst das Ende und mit fortschreitendem Vortrieb auch der sich anschließende Teil der Sondenkörpers **11** von den Zellen **21** umgeben werden. Während der Bewegung der Sonde durch das Zellmaterial erfolgt ein laufendes Umwachsen der Werkzeugoberfläche mit den Zellen **21**.

[0051] Wenn das Ende **12** einen vorbestimmten Abstand (z. B. halbe Dicke des Zellhaufens) vom Träger **80** besitzt, wird die Vortriebsbewegung gestoppt. Von einer (nicht dargestellten) Reservoirereinrichtung wird eine Stammzelle **22** durch den Hohlkanal **31** in das Zellmaterial **20** bewegt. Diese Bewegung erfolgt bspw. durch Einspülen mit einer Suspensionsflüssigkeit.

[0052] Nach der Injektion der Stammzellen in das Zellmaterial wird die Sonde **10** zurückgezogen. Die Rückzugsbewegung erfolgt ebenfalls mit einer derart geringen Geschwindigkeit, dass sich die Zellen **21** verletzungsfrei umordnen können, bis der verdrängte Raum um die injizierte Stammzelle **22** wieder gefüllt ist (Teilbild C von **Fig. 1**).

[0053] Alternativ zur Gestaltung gemäß **Fig. 1** kann vorgesehen sein, dass die Antriebseinrichtung **50** am Träger **80** angebracht ist und die Relativbewegung zwischen dem Zellmaterial **20** und der Sonde **10** trägerseitig erzeugt wird, während die Sonde **10** fest positioniert ist.

[0054] In **Fig. 2** sind weitere Einzelheiten des freien Endes **12** bei verschiedenen Ausführungsformen erfindungsgemäßer Sonden **10** illustriert. Teilbild (A) zeigt einen sich konisch verjüngenden Sondenkörper **11**. Durch diese Form wird vorteilhafterweise die Verdrängung von Zellen im Zellmaterial begünstigt. Die Vorderseiten **13** sind entsprechend den oben erläuterten Prinzipien abgerundet. Der Sondenkörper **11** besteht bspw. aus Glas, einem inerten Metall (z. B. Platin) oder einem inerten Kunststoffmaterial (z. B. Polyimid). Die charakteristischen Dimensionen a (Innendurchmesser des Hohlkanals **31** an der Öffnung

32) und b (Außendurchmesser des Sondenkörpers **11** am Ende **12**) sind typischerweise in den Bereichen a = 10 µm bis 100 µm und b = 10.5 µm bis 200 µm gewählt. Es können kleinere Maße im Bereich a = 0.1 µm bis 10 µm für die Injektion von besonders kleinen Zellen oder von synthetischen Partikeln oder größere Maße von z. B. a = 100 µm bis 5 mm für die Injektion z. B. von embryonalen Stammzellen gewählt werden, wobei das Maß b entsprechend der Wandstärke des Sondenkörpers **11** entsprechend größer gewählt ist.

[0055] Die Sonde **10** kann mit einem Sensor **33** ausgestattet sein. Gemäß Teilbild (A) ist ein Impedanzsensor **33** am Ende **12** vorgesehen. Der Impedanzsensor **33** umfasst zwei halbkreisförmige Elektroden (Impedanzelektroden), die auf der Oberfläche der Vorderseite **13** bspw. durch Aufdampfen angebracht sind. Alternativ können die Impedanzelektroden auf der Außenseite des Sondenkörpers **11** an dessen Ende **12** angebracht sein. Über elektrische Verbindungsleitungen (nicht gezeigt) entlang dem Sondenkörper **11** sind die Elektroden des Impedanzsensors **33** mit einer Steuereinrichtung verbunden. Beim Durchströmen einer Zelle **22** durch den Hohlkanal **31** wird durch die Verstimmung der Impedanz zwischen den Impedanzelektroden ein Impedanzsignal generiert, das in an sich bekannter Weise Auskunft über die Zahl, Größe und die elektrischen Eigenschaften der vorbeitretenden Zelle gibt.

[0056] Gemäß Teilbild (B) können Impedanzsensoren **33** alternativ oder zusätzlich auf der Innenseite des Hohlkanals **31** vorgesehen sein. Des Weiteren zeigt Teilbild (B) am Ende **12** des mit einem konstanten Durchmesser gebildeten Sondenkörpers **11** eine sich auswölbende Vorderseite **13**.

[0057] Gemäß Teilbild (C) kann der Sondenkörper **11** sich zum Ende **12** hin konisch erweitern. Teilbild (C) von **Fig. 2** illustriert schematisch eine adhäsionsfördernde Beschichtung **14** auf dem Ende **12** des Sondenkörpers **11**. Diese Verbindungsbeschichtung ist vorzugsweise nur auf der abgerundeten, verdrängenden Vorderseite der Sonde **10** vorgesehen, während die Oberfläche des übrigen Sondenkörpers **11** vorzugsweise adhäsionsmindernd beschichtet ist, um ein Gleiten zwischen den verdrängten Zellen zu fördern. Die Verbindungsbeschichtung besteht zum Beispiel aus Fibronectin. Zur Adhäsionsminderung kann eine Silanisierung oder eine Belegung mit biologischen Makromolekülen (zum Beispiel PolyHema) vorgesehen sein. Auch die innere Oberfläche des Hohlkanals kann in dieser Weise adhäsionsmindernd beschichtet sein.

[0058] Die Querschnittsform der kapillarförmigen Sondenkörper ist vorzugsweise rund. Alternativ kann eine abgeflachte Ellipsenform vorgesehen sein, die eine Vorzugsrichtung zur seitlichen Bewegung in einer Bewegungsrichtung senkrecht zur Längsachse des Sondenkörpers **11** ermöglicht.

[0059] **Fig. 3** zeigt eine abgewandelte Ausführungsform der Erfindung, bei der die Sonde **10** (oben vergrößert dargestellt) ohne eine mechanische Verbindungs-

zung nach außen vollständig vom Zellmaterial **20** umgeben wird. Das Zellmaterial **20** ist auf dem Träger **80** positioniert, in dem als Antriebseinrichtung eine Magneteinrichtung **51** integriert ist. Die Sonde **10** besitzt einen kegelförmigen Sondenkörper **11** mit Abrundungen **13** an den aneinander grenzenden Oberflächen. Die Abrundungen bilden in diesem Fall mehrere Vorderseiten. In den Sondenkörper **11** ist als Krafftelement ein Permanentmagnet **15** integriert. Durch Ausbildung geeignet geformter Magnetfelder mit der Magneteinrichtung **51**, die bspw. eine Spulen-anordnung zur Magnetfelderzeugung enthält, kann die Sonde **10** durch das Zellmaterial **20** gerichtet bewegt werden. Des Weiteren kann ein Driften der Sonde **10** unter der Wirkung interzellulärer Kräfte vorge-sehen sein.

[0060] Das Bezugszeichen **31** bezieht sich auf einen Hohlraum im Sondenkörper **11**, der bspw. mit einem Wirkstoff gefüllt ist. Durch eine Öffnung oder eine durchlässige Wand des Sondenkörpers **11** kann der Wirkstoff an den gewünschten Positionen im Zellmaterial **20** austreten. Das Bezugszeichen **33** bezieht sich auf einen Sensor, der in die Sonde **10** integriert ist. Der Sensor **33** umfasst bspw. einen pH-Sensor, Glukosesensor oder einen anderen Sensor für biologisch relevante Eigenschaften (Biosensor).

[0061] Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, dass die Sonde **10** gemäß **Fig. 3** zeitweilig mit einem externen Reservoir in Verbindung gesetzt wird, um bspw. den Hohlraum **31** mit einem Wirkstoff nachzu-füllen. Hierzu wird entsprechend den oben erläuterten Prinzipien eine kapillarförmige Sonde durch das Zellmaterial **20** bis zur Sonde **10** bewegt und an diese angekoppelt. Analog kann in der Sonde **10** als Funktionseinheit ein elektrischer Stimulator mit einem elektrischen Energiereservoir angeordnet sein, das bei Bedarf über elektrische Leitungen mit einer externen Spannungsquelle verbunden wird. Diese Verbindung erfolgt durch Einführung elektrischer Leitungen entsprechend der erfindungsgemäßen Verdrängungsbewegung.

[0062] Ein erfindungsgemäßer Zellmanipulator umfasst gemäß der Blockdarstellung in **Fig. 4** mindestens eine Sonde **10** und mindestens eine Antriebseinrichtung **50** zur Ausübung einer Vortriebskraft an der Sonde **10**. Die Antriebseinrichtung **50** enthält z. B. Piezokristalle, mit denen die Sonde **10** analog zu an sich bekannten Mikromanipulatorsystemen in verschiedenen Raumrichtungen mit einer Genauigkeit von < 100 nm positionierbar und bewegbar sind. Der Arbeitsweg der Sonde **10** kann zwischen 0,1 mm und einigen Zentimetern liegen.

[0063] Die Antriebseinrichtung **50** ist mit einer Positioniereinrichtung **60** verbunden. Die Positioniereinrichtung **60** ist ein mechanisch stabil und Mikrometer-genau relativ zu dem Zielzellsystem (Zellmaterial) fixierbares Bauteil, das es gestattet, die erforderlich langsam Bewegung der Sonde in das Zielzellsystem hinein oder heraus zu bewerkstelligen. Seine

Aufgabe ist die stabile Lage des gesamten Injektions-systems gegenüber dem Zielzellsystem über die Dauer der Manipulation (Stunden, Tage oder auch Wochen) zu garantieren. Dies kann über eine justierbare Dreipunkt-lagerung auf dem Kultursystem (siehe **Fig. 5**) oder eine Verankerung z.B. am Knochen des Schädels bei Zellinjektion ins Gehirn erreicht werden. Alternativ kann, wenn die Antriebseinrichtung **50** zur Bewegung des Trägers **80** des Zellmaterials eingerichtet ist, auch die Positioniereinrichtung **60** mit dem Trägers **80** verbunden sein (siehe gestrichelte Pfeile). Der Träger **80** ist bspw. eine Kulturschale (siehe **Fig. 5**) oder ein Substrat in einem Kultivierungssystem.

[0064] Die Positioniereinrichtung **60** ist des Weiteren mit einer Steuereinrichtung **61** und einer Mess- und Anzeigeeinrichtung **62** verbunden. Die Steuereinrichtung **61** dient der Steuerung des Gesamtsystems und enthält einen Prozessor oder Computer. Die aktuellen und geplanten Positionen werden über Sensoren (Dehnungsmessstreifen an Aktoren, 4-Quadrantendetektion mittels Laserstrahl wie beim der Atomkraftmikroskopie oder in analoger Weise) erfolgen. Die Information wird Software-basiert verarbeitet und so dargestellt, dass die reale und geplante Bewegung auf einem Monitor zusammen mit zweck-dienlichen Parametern dargestellt wird. Hierzu kann ein Kamerasystem mit mikroskopischer Vergröße-rung und einer Zoom-Funktion vorgesehen sein.

[0065] Die Sonde **10** ist vorzugsweise mit einem Probenreservoir **40** verbunden, das ein Transportsystem **41** zur Bewegung einer Probe vom Reservoir **40** in die Sonde **10** enthält. Die in das Zellmaterial zu injizierende Probe ist bspw. eine Zellsuspension. Das Transportsystem **41** ist eine an sich bekannte Förder-einrichtungen wie z. B. eine Präzisions-Spritzenpumpe. Das Probenreservoir **40** für die Aufnahme der zu injizierenden Zellen kann eine Hamiltonspritze oder ein über ein totvolumenarmes 3-Wegesystem ange-schlossenes Behältnis sein. Das Transportsystem **41** drückt beispielsweise über mechanische Kompression eine Zellsuspension in die Injektionswerkzeuge (Sonde **10**). Dabei sind sehr geringe Volumina zu bewegen (Geschwindigkeit wenige $\mu\text{m}/\text{min}$). Es könne auch Spülvorgänge mit Waschlösungen (Geschwindigkeit **1** bis zu einigen 100 $\mu\text{m}/\text{s}$) ausgeführt werden. Dies kann über programmierbare Spritzenpumpen erreicht werden.

[0066] In **Fig. 5** sind weitere Einzelheiten des Zell-manipulators am Beispiel eines in vitro Systems für die Biotechnologie (Tissue Engineering) gezeigt. Ziel ist es, in einen Zellgewebeverband **20** mittels einer Mikrokapillare (Sonde **10**) eine oder mehrere Zellen **22** aus einem Zellreservoir **40** zu injizieren. Die Sonde **10** ist über ein Kanalsystem mit dem Zellreservoir **40** verbunden. Gleichzeitig ist die Sonde **10** an eine Hamiltonspritze (Transportsystem **41** für die Zellsuspension (**22**)) angeschlossen, die über einen Prozessor oder eine Computersteuerung angesprochen wird (nicht dargestellt). Das gesamte System befin-

det sich auf einer Arbeitsplattform **61**, die sich nicht relativ zum Gewebeverband **20** bewegen kann, da sie über die Positioniereinrichtung **60** fest mit der Kulturschale (**28**) verbunden ist.

[0067] Die Grundjustage der Arbeitsplattform **61** erfolgt mit der Positioniereinrichtung **60**. Als Vortriebsystem oder Antriebseinrichtung **50** für die Sonde **10** dient ein Piezorohr, das sich in der angegebenen Weise ausdehnen oder verkürzen kann und dadurch die Sonde **10** in den Gewebeverband **20** einführt bzw. herauszieht. Dargestellt ist ein Zielzellgebiet **23** (gepunkteter Ring), in den gerade eine Zelle **22** eingefügt wird. Am Schaft der Kapillar-Sonde **10** befindet sich ein Einzelzelldetektorsystem **33**, mit dem die Zahl der injizierten Zellen erfasst werden kann (hier als optisches System dargestellt).

[0068] Der Zellmanipulator entsprechend **Fig. 5** wird wie folgt betätigt. In einem ersten Schritt wird die Positioniereinrichtung mit dem Zielgewebe **20** in eine feste Verbindung gebracht. Dies erfolgt durch Fixieren der Positioniereinheit an der Kulturschale **80** oder an der Oberfläche eines Organismus bzw. einem geeigneten Teil des Knochengerüsts. In einem zweiten Schritt wird das Mikroinjektionswerkzeug **10** an der Arbeitsplattform **61** befestigt und grob vorjustiert, so dass es kurz vor dem Zielgewebe oder -zellsystem **20** mit seiner Spitze lokalisiert ist. Im nächsten Schritt wird die Kapillare der Sonde **10** mit der Nährlösung, einer physiologischen Lösung oder einem anderen geeigneten Fluid befüllt und an das Zielgewebe bis zu dessen Berührung herangeführt. Danach erfolgt der programmierte Vortrieb des Mikroinjektionswerkzeuges entsprechend der Geschwindigkeit von zum Beispiel weniger als 1 µm/h bis zu einigen 100 µm/h, bis der Zielbereich **23** erreicht ist. Entweder zu diesem Zeitpunkt oder früher werden die zu injizierenden Zellen aus dem Reservoir in das Mikroinjektionswerkzeug eingespült und über den Detektor beim Passieren des eingestochenen Teils erfasst, gezählt und ggf. charakterisiert. Durch Bewegen des Injektionswerkzeuges in alle drei Raumrichtungen mit der o. g. geringen Geschwindigkeit kann das System in ein neues Zielgebiet geführt werden, so dass in einer vorher bestimmbar Weise Zellen dreidimensional im Gewebe positioniert werden. Nach erfolgter Injektion wird das Mikroinjektionswerkzeug wieder aus dem Zielgewebe entfernt. Die geringe Geschwindigkeit, die auch als „physiologische Geschwindigkeit“ bezeichnet wird, erlaubt den Zellen des Gewebes an der Spitze des Injektionswerkzeuges das Lösen der Zelladhäsionskontakte, so dass es zu einer geordneten Verdrängung der Zellen kommt, nicht aber deren Verletzung.

[0069] **Fig. 6** zeigt ein Beispiel einer radialen Aufweitungsbewegung einer kapillarförmigen Sonde **10**, deren Sondenkörper **11** aus einem elastischen Material (zum Beispiel Plastik, Gummi) oder einem nicht-elastisch aufweitbaren Material (zum Beispiel relativ zueinander verschiebbare Lamellen aus Stahl oder Kunststoff o. dgl.) besteht. Durch eine Drucker-

höhung im Hohlkanal **31** der Sonde **10** kann deren Durchmesser erweitert werden, wobei eine verletzungsfreie Verdrängung der Zellen erfolgt. Der Durchmesser des Sondenkörpers **11** vergrößert sich mit der oben beschriebenen Vortriebsgeschwindigkeit.

[0070] Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln oder auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bewegung einer Sonde (**10**) durch ein Zellmaterial (**20**), das aus biologischen Zellen (**21**) gebildet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Sonde (**10**) die Zellen (**21**) verletzungsfrei verdrängt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Sonde (**10**) mit einer Vortriebsgeschwindigkeit bewegt wird, die kleiner oder gleich einer molekularen Bindungsgeschwindigkeit der Zellen ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Sonde (**10**) einer permanent wirkenden Vortriebskraft ausgesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Vortriebskraft eine oder mehrere Kräfte umfasst, die aus der Gruppe von mechanischen Druckkräften, elektrischen Kräften, magnetischen Kräften und interzellulären Kräften ausgewählt sind.

5. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem die Sonde (**10**) durch Zellmaterial (**20**) bewegt wird, das ein Verbundmaterial umfasst, das aus den biologischen Zellen oder aus den biologischen Zellen und einem Matrixmaterial besteht.

6. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem die Sonde (**10**) eine langgestreckte Form mit einer Längsrichtung besitzt und in einer Richtung parallel zur Längsrichtung bewegt wird.

7. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem mit der Sonde (**10**) eine Substanz in das Zellmaterial zugeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem mit der Sonde (**10**) mindestens eine biologische Zelle (**22**) in das Zellmaterial zugeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die mindestens eine biologische Zelle (**22**) im gefrorenen Zustand in das Zellmaterial zugeführt wird.

10. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem mit der Sonde (10) mindestens eine Zelle aus dem Zellmaterial entnommen wird.

11. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem mit der Sonde (10) Eigenschaften des Zellmaterials erfasst werden.

12. Verfahren nach mindestens einem der vorgehenden Ansprüche, bei dem die Sonde mit einer Vortriebsgeschwindigkeit im Bereich von 0.1 µm/h bis 1 mm/h bewegt wird.

13. Sonde (10) zur Einführung in Zellmaterial (20), mit einem Sondenkörper (11), der durch das Zellmaterial beweglich ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Sondenkörper (11) mindestens an einer Vorderseite (13), die bei Bewegung durch das Zellmaterial (20) in eine Bewegungsrichtung des Sondenkörpers (11) gerichtet ist, eine abgerundete Oberfläche besitzt.

14. Sonde nach Anspruch 13, bei der die abgerundete Oberfläche einen Krümmungsradius besitzt, der größer als 10 µm ist.

15. Sonde nach Anspruch 13 oder 14, bei der die abgerundete Oberfläche eine Beschichtung (14) trägt, die ein Anhaften von Zellen fördert.

16. Sonde nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, bei der der Sondenkörper (11) mit mindestens einem Funktionsteil (30) ausgestattet ist.

17. Sonde nach Anspruch 16, bei der das mindestens eine Funktionsteil (30) mindestens einen Hohlraum (31) im Sondenkörper (11) mit einer Öffnung (32), die in einer Oberfläche des Sondenkörpers gebildet ist, und/oder mindestens einen Sensor (33) im Sondenkörper umfasst.

18. Sonde nach Anspruch 17, bei der der Sensor im Hohlraum (31) des Sondenkörpers (11) angeordnet ist.

19. Sonde nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 18, bei der der Sondenkörper (11) eine Kapillare mit einem ersten Ende (12), das die abgerundete Oberfläche aufweist, und einem zweiten Ende umfasst, das mit einer Reservoireinrichtung (40) verbunden ist.

20. Sonde nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 18, bei der der Sondenkörper (11) einen Formkörper aufweist, dessen Oberfläche durch die abgerundete Oberfläche gebildet ist.

21. Sonde nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 20, bei der der Sondenkörper (11) mindes-

tens ein Kraftelement (15) aufweist, das zur Einwirkung einer äußeren Vortriebskraft eingerichtet ist.

22. Sonde nach Anspruch 21, bei der das Kraftelement (15) eine mechanische Halterung oder ein Magnelement umfasst.

23. Zellmanipulator, insbesondere zur Bearbeitung von Zellmaterial, der umfasst:
– mindestens eine Sonde (10) nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 22, und
– mindestens eine Antriebseinrichtung (50) zur Bewegung der mindestens einen Sonde (10).

24. Zellmanipulator nach Anspruch 23, der eine Positioniereinrichtung (60) zur Positionierung der Antriebseinrichtung (50) und/oder eines Trägers (80) des Zellmaterials (20) aufweist.

25. Zellmanipulator nach Anspruch 24 oder 25, der eine Sensoreinrichtung zur Erfassung der Position der mindestens einen Sonde (10) aufweist.

26. Zellmanipulator nach mindestens einem der Ansprüche 23 bis 25, bei der der Träger (80) zur Aufnahme von Zellmaterial eingerichtet ist, wobei die Antriebseinrichtung dazu eingerichtet ist, die mindestens eine Sonde relativ zum Träger zu bewegen.

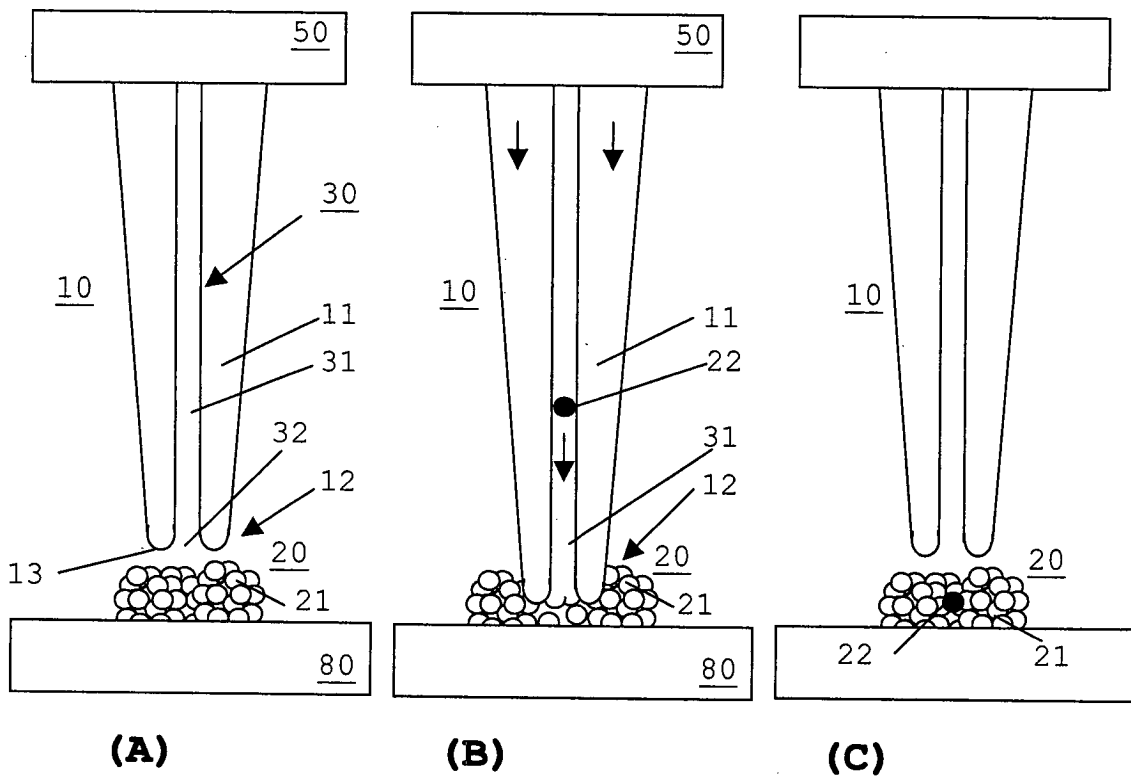
27. Zellmanipulator nach mindestens einem der Ansprüche 23 bis 26, bei dem die Antriebseinrichtung (50) einen piezoelektrischen Antrieb oder einen Magnetantrieb umfasst.

28. Zellmanipulator nach mindestens einem der Ansprüche 23 bis 27, bei dem die Antriebseinrichtung (50) zur Bewegung der Sonde (10) mit Geschwindigkeiten im Bereich von 0.1 µm/h bis 1 mm/h eingerichtet ist.

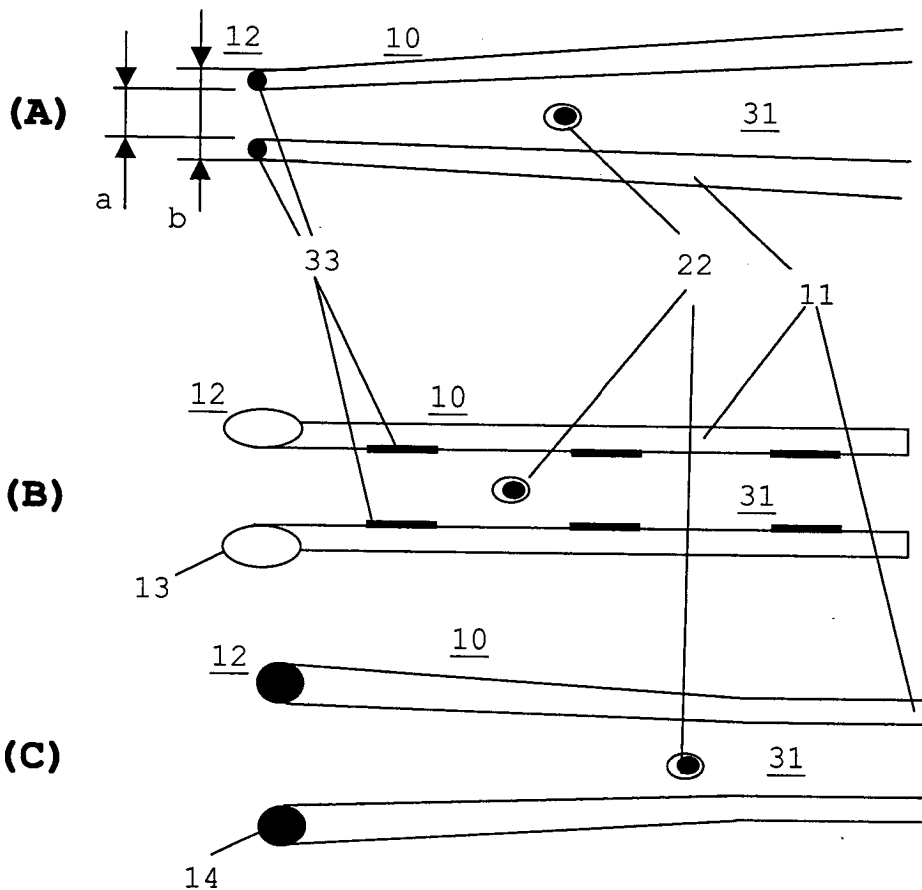
29. Verwendung einer Hohlnadel mit einem abgerundetem freiem Ende zur verletzungsfreien Bewegung in Zellmaterial.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

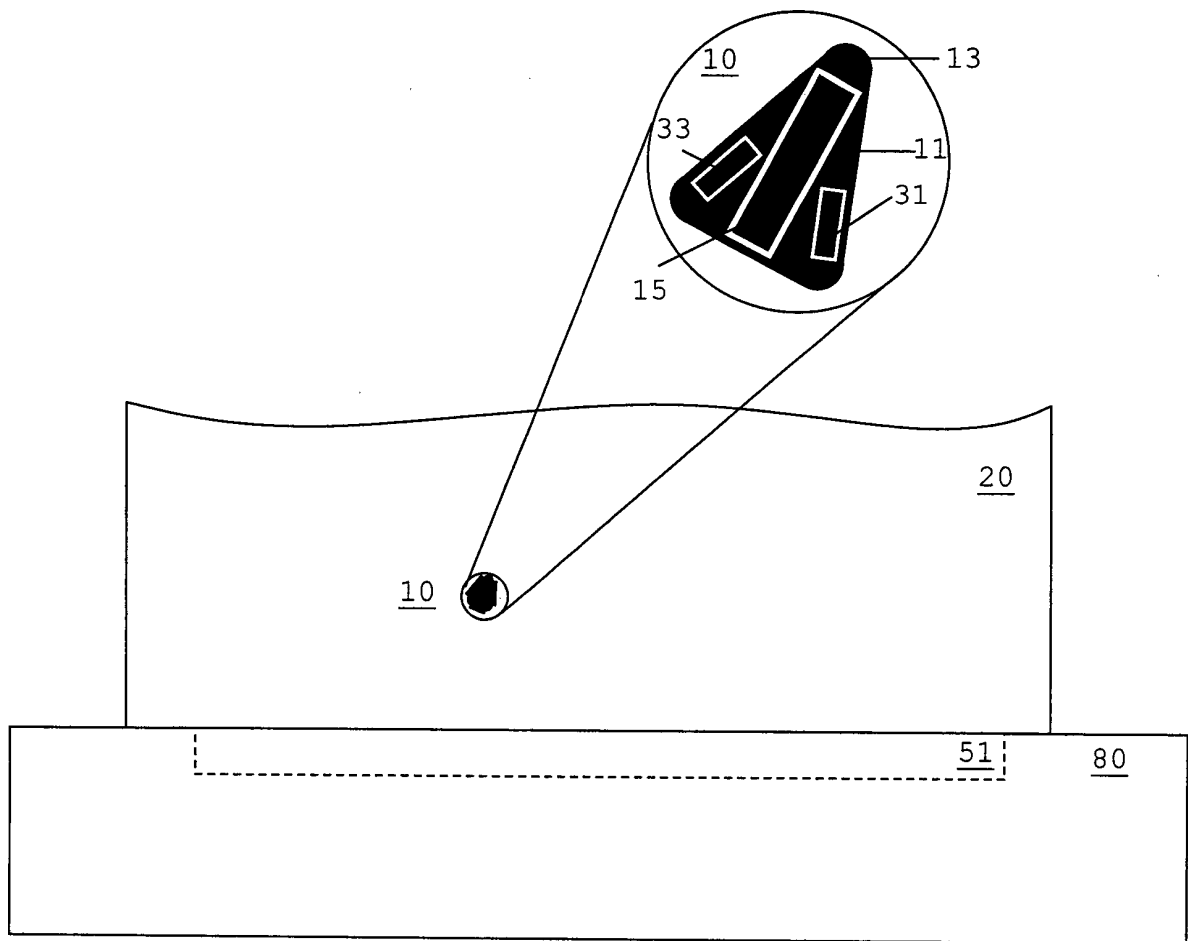
Anhängende Zeichnungen



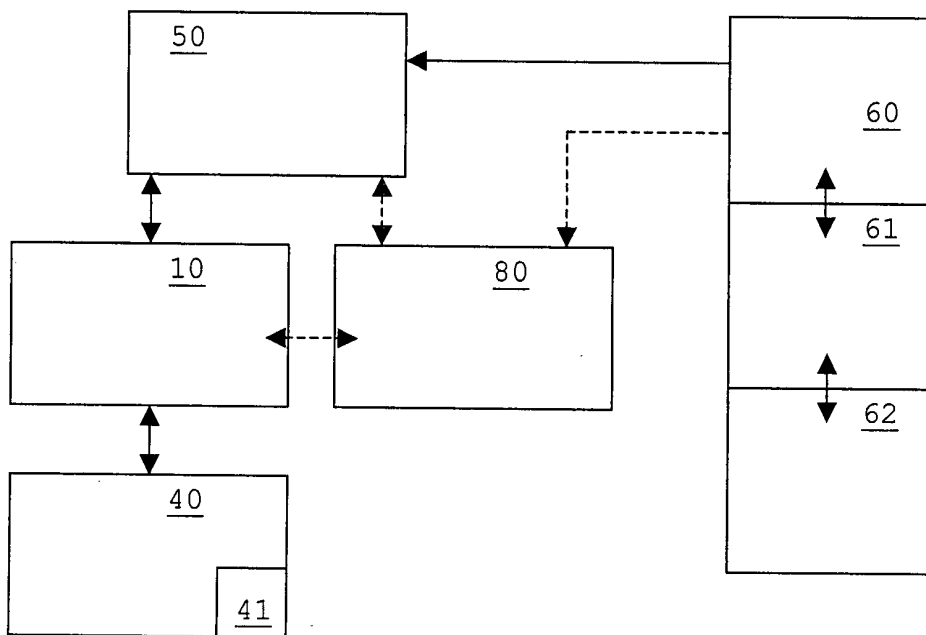
Figur 1



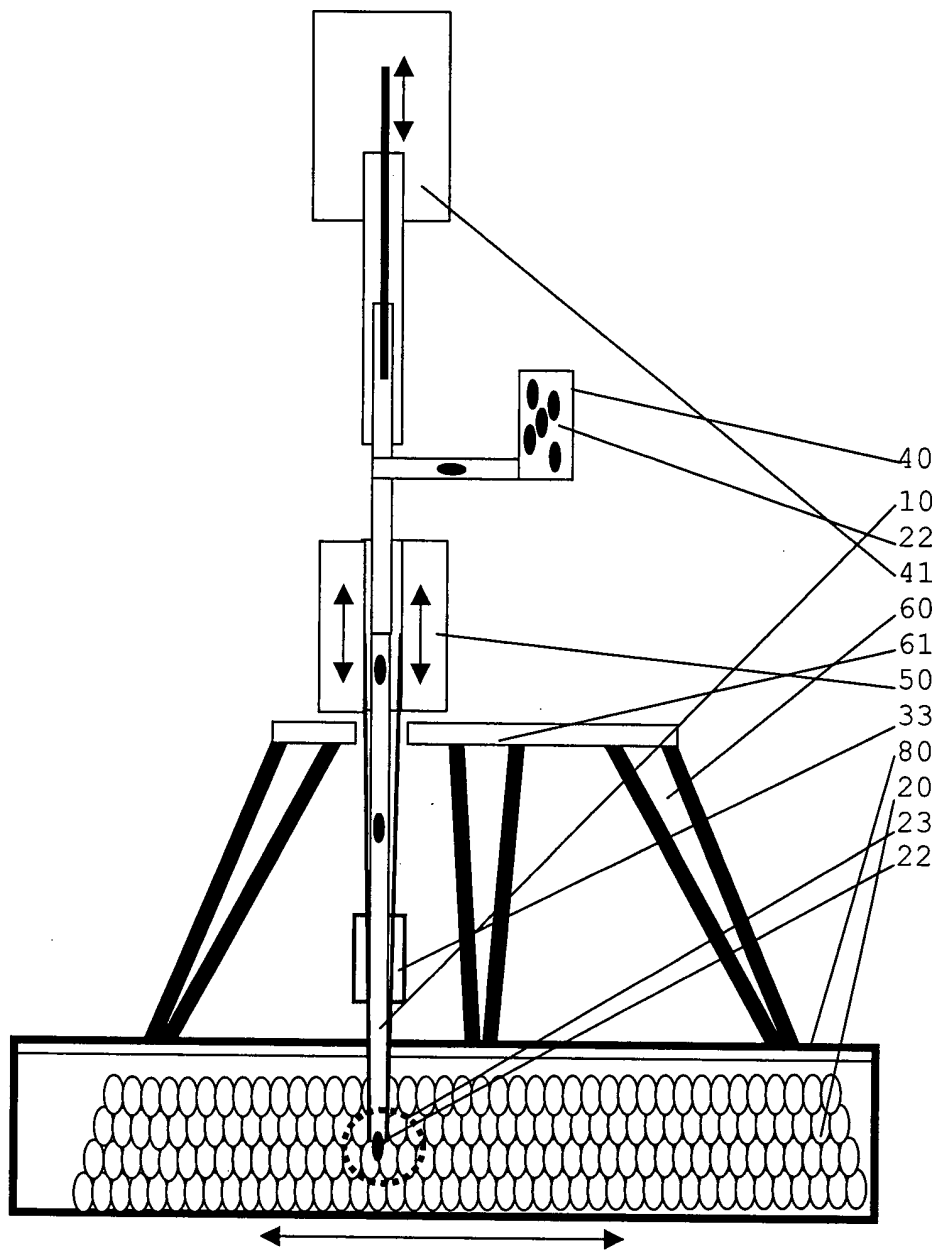
Figur 2



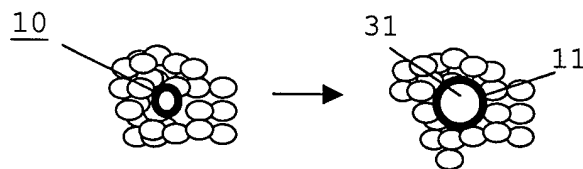
Figur 3



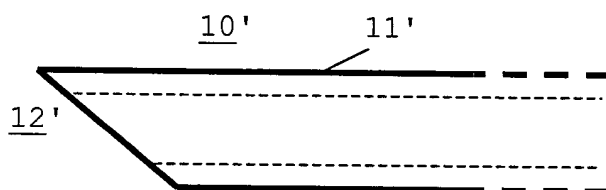
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7
(Stand der Technik)