

Zwei-Photonen Nanolithographie zur Herstellung künstlicher Erythrozyten

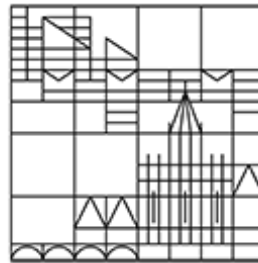
Bachelorarbeit

vorgelegt von

Nicole Barth

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Physik

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Maret
2. Gutachter: PD. Dr. Christof Aegerter

Konstanz, September 2012

**Unser Wissen ist ein Tropfen.
Was wir nicht wissen, ist ein Ozean.**
Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Theorie	5
2.1. Erythrozyten	5
2.1.1. Biologische Erythrozyten	5
2.2. Direct Laser Writing	6
2.2.1. Fotolithografie	6
2.2.2. Fotolack	7
2.2.3. Zwei-Photonen-Lithografie	9
2.2.4. Prozedur des DLW	9
2.2.5. Auflösungsvermögen	10
2.2.6. Der Voxel	11
3. Experiment	13
3.1. 3D-Lithografiesystem	13
3.1.1. Aufbau eines 3D-Lithografiesystems	13
3.1.2. Software	13
3.2. Herstellung der Erythrozytenmodelle	16
3.2.1. Modellsystem	16
3.2.2. Präparation der Probe	16
3.2.3. Voxel Ausmessung	17
3.2.4. Datenverarbeitung	18
3.2.5. Schreibvorgang und Extraktion der Teilchen	20
3.2.6. Formanalyse der hergestellten Erythrozytenmodelle	24
4. Ergebnisse und Diskussion	25
4.1. Mögliche Fehler während des Schreibvorgangs	25
4.2. Auftragen der Erythrozytenmodelle nach dem Ablösevorgang	26
4.3. Charakterisierung der Erythrozytenmodelle	28
4.4. Vergleich der biologischen Erythrozyten mit dem Modell	31
5. Fazit und Ausblick	32
A. Literaturverzeichnis	33
B. Abbildungsverzeichnis	34

1. Einleitung

Die erste Entdeckung der Lichtstreuung erfolgte experimentell 1868 durch Faraday und wurde drei Jahre später von Tyndall erstmals in der Literatur erwähnt. 1871, im selben Jahr in dem Tyndall die experimentell beobachtete Lichtstreuung niederschrieb, erklärte Rayleigh das Phänomen auch theoretisch [1]. Dabei versuchte er hauptsächlich das ‘Phänomen des blauen Himmels’ durch die Rückführung der stärkeren Streuung des hochfrequenten Lichtes an den Gasmolekülen in der Atmosphäre zu erklären.

Auch heute ist die Lichtstreuung noch von großer Bedeutung. Sie ist eine wichtige analytische Methode, unter anderem zur Bestimmung von Masse, Dynamik und Struktur mesoskopischer Systeme. In der Biologie wird sie zum Beispiel zur Aufklärung komplexer Systeme wie Zellen, Viren oder Proteinen verwendet [1].

Auch in der Biophysik sind Lichtstreuexperimente von großer Bedeutung. So finden in der aktuellen Forschung unter anderem Lichtstreuexperimente an Erythrozyten statt. Dabei wird Lichtstreuung sowohl theoretisch am Computer simuliert, als auch praktisch an Erythrozyten gemessen. Ziel ist es, den Einfluss von Form, Größe und Verformbarkeit auf das Diffusionsverhalten zu erklären. Im Vergleich zu den Erwartungen, welche sich aus der Diffusion von Flüssigkeiten ergeben würden, zeigen aktuelle Ergebnisse jedoch Unstimmigkeiten im Fließverhalten von Blut im Gewebe. Diese Unstimmigkeiten könnten zum Beispiel auf die Verformbarkeit der Erythrozyten zurückzuführen sein. Lichtstreuexperimente an künstlich hergestellten, polymerbasierten Erythrozyten könnten Aufschluß über den Einfluß der Verformbarkeit auf das Diffusionsverhalten geben. Diese Modelle sollten ein möglichst genaues Abbild der biologischen Erythrozyten darstellen, jedoch im Gegensatz zu dem biologischen Vorbild formstabil sein. Ziel dieser Arbeit ist es mittels Lithografie künstliche Erythrozyten herzustellen und diese in hinreichender Menge ($\approx 10^5$) in wässriger Lösung bereitzustellen um Lichtstreuexperimente zu ermöglichen.

Die Herstellung der Erythrozytenmodelle erfolgt mittels eines Zwei-Photonen-Laserlithografie-systems mit welchem dreidimensionale Polymerstrukturen mit hoher Auflösung hergestellt werden können. Um die Oberflächendaten des Erythrozytenmodells möglichst genau darzustellen, dienen als Vorbild die theoretischen Daten einer Simulationsstudie der Forschungsgruppe von G. Gompper [2].

2. Theorie

Dieses Kapitel soll sich mit den Grundlagen, welche für die Experimente mit einem 3D Lithografiesystem nötig sind, beschäftigen. Dabei wird auf die Methode des direkten Laserschreibens (DLW) und deren Eigenschaften wie das Auflösungsvermögen und der Voxel des Lasers eingegangen. Auch sollen hier die Grundlagen des DLW wie die Zwei-Photonen Lithografie und die Fotolithografie mit den Fotolacken betrachtet werden. Dabei bezieht sich dieser Teil der Theorie hauptsächlich auf die Veröffentlichungen von Fischer *et al.* [3–5] sowie auf eine Veröffentlichung von Maruo *et al.* [6].

2.1. Erythrozyten

Ein erwachsener Mensch besitzt eine Gesamtblutmenge von ca. 5 Liter Blut. 45% dieses Blutvolumens setzt sich aus Blutzellen zusammen, der Rest besteht aus Blutplasma [7]. Blutzellen können wieder in die Untergruppen Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten (rote Blutkörperchen) eingeteilt werden. In dieser Arbeit werden künstliche Erythrozyten mittels Zwei-Photonen Laserlithografie hergestellt. Der folgende Abschnitt wird sich deshalb mit den Eigenschaften, insbesondere den für die künstliche Herstellung relevanten Ausmessungen der Erythrozyten beschäftigen und mit dem Modell vergleichen.

2.1.1. Biologische Erythrozyten

Da Erythrozyten nur eine begrenzte Lebensdauer von ca. 100-120 Tagen [7] besitzen, werden sie ständig im roten Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen neu gebildet. Betrachtet man 1 μl Blut, besteht dieses beim Mann aus ca. 5-6 Mio. Erythrozyten und bei der Frau aus ca. 4,5 Mio. [7].

Erythrozyten lassen sich als runde, bikonkave Scheiben beschreiben, welche in der Mitte eine leichte Einbuchtung aufweisen. Verformungen im Aussehen der Erythrozyten sind krankheitsbedingt möglich (z.B. Sichelzellanämie). In dieser Arbeit sollen jedoch nur ‘gesunde’ Erythrozyten betrachtet werden. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und sind organellenfrei. Außerdem besitzen rote Blutkörperchen ein Membranskelett aus Spektrin und Aktinfilamenten, welches die Eigenschaft der stark elastischen Verformbarkeit hervorruft.

Der mittlere Durchmesser eines Erythrozyts beträgt ca. $(7,82 \pm 0,62) \mu\text{m}$ [8]. Die Dicke beträgt am Rand ca. $(2,58 \pm 0,27) \mu\text{m}$ [8], während es im Inneren nur noch ca. $(0,81 \pm 0,35) \mu\text{m}$ [8] dick ist. Für Experimente mittels Lichtstreuung ist jedoch hauptsächlich die größte charakteristische Länge des roten Blutkörperchens relevant. Für diagnostische Zwecke ist oft das mittlere Volumen relevant, welches bei ca. 81-100 fl (Femtoliter) liegt [8]. Typische Erythrozyten eines gesunden Menschen sind in Abb. 2.1 zu sehen.

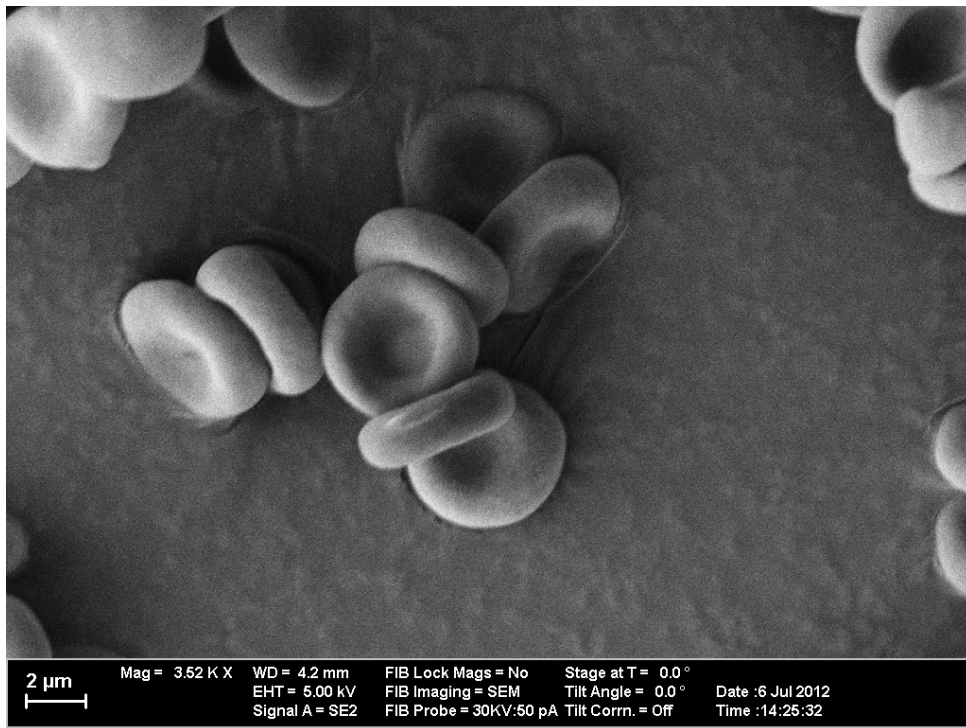


Abbildung 2.1.: Rote Blutkörperchen unter dem Elektronenmikroskop [9].

2.2. Direct Laser Writing

In diesem Kapitel soll auf einen neuen Zweig der Lithografie eingegangen werden, die Lithografiemethode des DLW. Im Allgemeinen kann DLW als dreidimensionales Analogon zur zweidimensionalen Elektronenstrahlolithografie gesehen werden. Mit der Methode des DLW sollen in dieser Arbeit die Erythrozytenmodelle hergestellt werden.

2.2.1. Fotolithografie

Allgemein handelt es sich bei der Fotolithografie um die Technik des Auftragens von Strukturen in einen fotoempfindlichen Lack. Die Belichtung des Fotolacks geschieht durch Bestrahlung. Da das Abbe Kriterium besagt, dass die optische Auflösung proportional zur Wellenlänge ist, wird häufig möglichst kurzwellige Strahlung wie zum Beispiel UV Licht verwendet. Die Fotolithografie, wie zum Beispiel UV-Lithografie oder Elektronenstrahlolithografie, findet bereits Anwendungen in der Industrie, wie zum Beispiel bei der Computerchipproduktion.

Grundsätzlich kann zwischen zwei verschiedenen Arten der verwendeten Strahlung unterschieden werden. Der elektromagnetischen Strahlung und der Teilchenstrahlung. Unter Teilchenstrahlung versteht man Elektronen- und Ionenstrahlung, während man bei der elektromagnetischen Strahlung meistens von Röntgenstrahlung oder optischer Strahlung spricht. Die Zwei-Photonen-Lithografie, welche in dieser Arbeit verwendet wird, fällt unter den Gesichtspunkt der optischen Strahlung. Im Bereich der Nanolithografie haben sich verschiedene Methoden etabliert, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit verwendete DLW Verfahren. Eine weitere bekannte Methode in der Nanolithografie wäre Atomgruppen mit Hilfe eines Tunnelmikroskopes zu gruppieren.

2.2.2. Fotolack

Bei den Fotolackverfahren, welche in der Lithografie verwendet werden, unterscheidet man allgemein zwischen zwei Arten, den negativen und den positiven Fotolackverfahren. Die beiden Lackarten unterscheiden sich dadurch, dass beim Positivlack die belichteten Stellen durch das Entwickeln abgelöst werden, während beim Negativlack die belichteten Stellen aushärten. Vorteile eines Positivlackes sind unter anderem eine sehr gute Auflösung und ihre Stabilität beim Entwickeln. Ein Nachteil ist jedoch, dass sie meist nicht sehr resistent gegen Ätzung und Implantationsprozesse sind. Dagegen sind die Vorteile eines Negativlackes, dass der entwickelte Lack eine gute Haftung aufweist, resistent gegen Ätzung und Implantationsprozesse ist, eine höhere Lichtempfindlichkeit hat und kostengünstiger als ein Positivlack ist. Jedoch weisen Negativlacke eine geringere Auflösung auf als Positivlacke.

Die chemische Zusammensetzung von Fotolacken besteht meist aus drei Hauptkomponenten: dem Bindemittel, dem Sensibilisator und einem Lösemittel. Das Bindemittel bestimmt hauptsächlich die thermischen Eigenschaften des Fotolacks und besteht aus Kunstharzen bzw. Kunststoff. Für die Lichtempfindlichkeit des Fotolacks sind die Sensibilisatoren zuständig, welche aus Molekülen bestehen, die bei Belichtung ihre Löslichkeit verändern. Das Lösemittel hat den Hauptanteil im Fotolack, es bestimmt die Viskosität des Lacks [10].

In dieser Arbeit wird zum Schreiben der Erythrozyten ein Negativlack verwendet. Es handelt sich hierbei um den kommerziell verfügbaren Fotolack IP-L 780 [11]. Im ausgehärteten Zustand besitzt der Lack eine Dichte von (1,16 - 1,19) g/cm³ bei 20°C und ist hitzebeständig bis ca. 200°C [11]. In Abbildung 2.2 sind verschiedene mögliche Fotolacke und ihre Absorptionsspektren zu sehen, welche auch bezüglich der Auflösung gute Ergebnisse erzielen.

Das Aushärten des verwendeten Fotolacks beruht auf radikalischer Polymerisation. Für die Polymerisation werden zwei Startmoleküle innerhalb des Fotolacks benötigt. Das eine Molekül bildet die freien Radikale mit Hilfe von Zwei-Photonen-Absorption, während das andere Molekül anschließend polymerisiert und Verlinkungen zwischen den Molekülen untereinander bildet. Dieses Molekül bildet im entwickelten Zustand die eigentliche Struktur der Probe. Weiterhin ist zu sagen, dass die Wahrscheinlichkeit den Fotolack außerhalb des Fokus zu belichten sehr gering ist, da nur innerhalb des Belichtungsfokus die nötige Energie für die Belichtung mittels Zwei-Photonen-Lithografie vorhanden ist.

In Abb. 2.3 ist das Reaktionsschema des Lackes zu sehen. Jedes Molekül, welches die Reaktion veranlasst, absorbiert zwei Photonen und bildet somit ein Radikal. Dieses Radikal löst ein Monomer. Dadurch entsteht ein neues Radikal am Ende des Monomers. Dieses Monomer verlinkt sich mit dem nächsten Monomer, welches wiederum ein neues Radikal ausbildet. Somit ist der Fotolack am Ende der Reaktion polymerisiert.

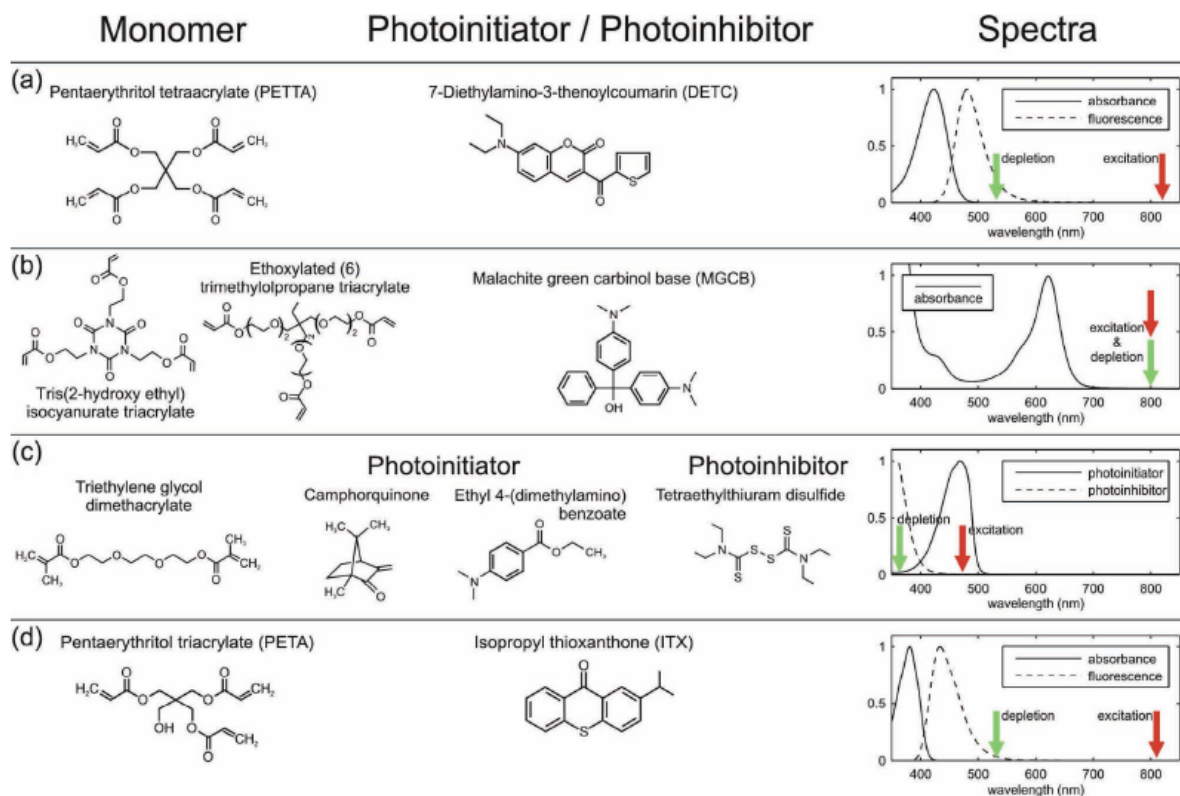


Abbildung 2.2.: Verschiedene zur Verwendung von Zwei-Photonen-Lithografie geeignete Fotolacke mit ihren Absorptionsspektren. Links sind die Strukturformeln der zu belichtenden Monomere zu sehen, welche sich mit Hilfe von Zwei-Photonen-Prozessen und Fotoinitiatoren (Mitte) zu einem festen Fotolack umwandeln können. Rechts sind die Absorptionsspektren des jeweiligen Fotolacks zu sehen, wobei die zur Zwei-Photonen-Lithografie gebrauchte Wellenlänge mit einem roten Pfeil (excitation) und die Wellenlänge zur Voxelperbesserung mittels Auslöschung mit einem grünen Pfeil (depletion) markiert sind [3].

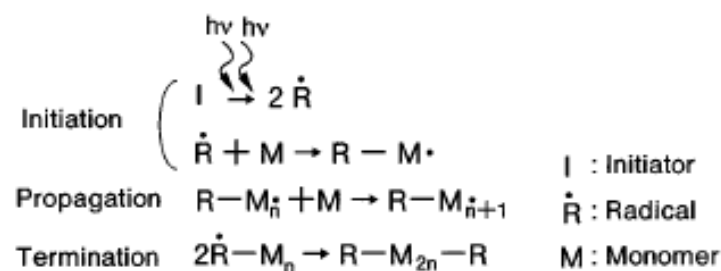


Abbildung 2.3.: Reaktionsschema der im Fotolack ablaufenden Reaktion. Mit Hilfe von zwei Photonen bildet der Initiator des Fotolacks zwei Radikale aus. Diese Radikale gehen nun Bindungen mit einem Monomer ein. Anschließend bildet sich in diesem Monomer wieder ein Radikal und es findet eine Kettenreaktion (Propagation) statt, welche durch eine zweite Radikalbindung abgebrochen wird (Termination) [6].

2.2.3. Zwei-Photonen-Lithografie

Bei der Zwei-Photonen-Lithografie absorbiert ein Molekül zwei Photonen der gleichen Frequenz, und wird in ein höheres Niveau angehoben (in Abb. 2.4 rot). Hierbei unterscheiden sich die Auswahlregeln für die Anhebung von der Ein-Photonen-Absorption. Die Zwei-Photonen-Absorption wird meist durch Jablonski-Diagramme dargestellt. Eine gute Übersicht der Zwei-Photonen Lithografie im Fall der DLW Methode ist in dem Jablonski-Diagramm in Abb. 2.4 zu sehen.

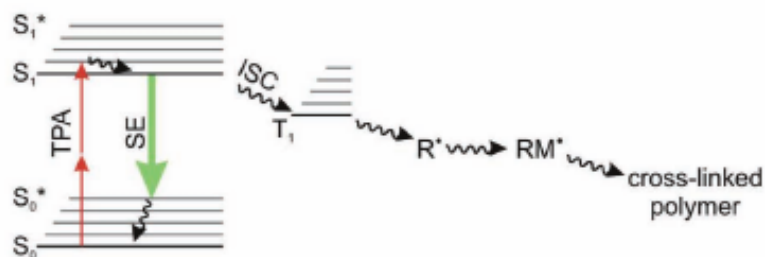


Abbildung 2.4.: Jablonski Diagramm zur Zwei-Photonen-Lithografie: Moleküle im Fotolack werden mittels Zwei-Photonen-Prozessen in das nächst höhere Niveau angehoben (roter Pfeil). Anschließend fällt ein Teil der angeregten Moleküle wieder mittels stimulierter Emission ins Grundniveau zurück (grüner Pfeil). Der andere Teil kann durch Intersystemcrossing (ISC) in einen Triplettzustand (schwarzer ISC Pfeil) wechseln, in welchem die eigentliche Reaktion des Fotolacks ablaufen kann [3].

Damit der Voxel eine möglichst genaue Form aufweisen kann, wird nun mittels stimulierter Emission (STED) ein Teil der Moleküle wieder in ihren Grundzustand versetzt (in Abb. 2.4 grün). Ein kleiner Teil der Moleküle kann jedoch durch Intersystemcrossing (ISC) in einen Triplettzustand übergehen (in Abb. 2.4 schwarz ISC). In diesem Triplettzustand bilden sich nun Radikale aus. Diese Radikale veranlassen ein weiteres Molekül dazu sich zu polymerisieren und Verlinkungen zu bilden. Diese umstrukturierten Moleküle sind als belichtete Stellen im Fotolack zu finden. Das Problem bei dieser Methode liegt jedoch darin, dass Radikale auch bereits im Singletzustand ausgebildet werden können und durch die stimulierte Emission ungewünschte Reaktionen eingehen. Somit limitiert die Wechselwirkung zwischen Anregung und Abregung der Moleküle die Auflösung stark.

2.2.4. Prozedur des DLW

DLW beruht auf der Technik der Zwei-Photonen-Lithografie, bei der ein Laser über ein Objektiv in einen Fotolack fokussiert wird. Der Fotolack wird nun mit Hilfe von Zwei-Photonen-Absorption im Fokus des Lasers belichtet. Die Belichtung erfolgt dann in zwei Schritten. Das Fotolackmolekül wird vom ersten Photon angeregt, fällt jedoch ohne sofortige weitere Anregung durch das zweite Photon wieder in den Grundzustand zurück. Somit müssen beide Photonen das Molekül anregen. Diese Art von Belichtung ist beim DLW sehr wichtig. Bei gleichmäßiger Beleuchtung durch einen Laser würde der gesamte Fotolack, unabhängig von der z-Position, belichtet werden. Somit wäre als Resultat ein dicker Block des Materials belichtet anstelle einer dünnen Linie, welche nur durch 'Einschränkung' des Beleuchtungsvoxels durch die Methode der Zwei-Photonen-Lithografie zustande kommt.

Beim DLW besteht die größte Herausforderung darin, die Linienbreite des Voxels so genau wie möglich aufzulösen. Eine bekannte Methode ist hierbei die STED ('stimulated-emission-depletion') Lithografie. Diese beruht auf der Idee durch Auslöschung, zum Beispiel mit Hilfe eines zweiten Lasers möglichst wenig Fotolack-Moleküle zu belichten. Dies geschieht durch stimulierte Emission der mittels Zwei-Photonen-Lithografie angeregten Moleküle. Einzigst die Moleküle die belichtet werden sollen, werden nicht zur Emission stimuliert. STED besitzt den Vorteil einer schnellen Schreibgeschwindigkeit bei hoher Auflösung.

Weitere Methoden zur Auflösungsverbesserung sind die RAPID-Lithografie ('Resolution Argumentation through Photo-Induced Deactivation'), welche auf einem speziellen Fotolackverfahren beruht und die 2PII-Lithografie ('two color photo initiation/inhibition'). Diese beruht jedoch nicht direkt auf der 'Auslöschung' eines angeregten Zustandes, sondern auf einer bestimmten Anregungsweise eines speziellen Fotolacks.

2.2.5. Auflösungsvermögen

Betrachtet man das Auflösungsvermögen der Zwei-Photonen-Lithografie oder insbesondere der DLW, muss beachtet werden, dass die Linienbreite nicht mit der Auflösung gleichgesetzt werden darf. Die Größe eines Lichtflecks, welcher durch eine Linse fokussiert wird, ist normalerweise durch das Abbe Kriterium begrenzt. Gleiches gilt somit auch für die Auflösung in der optischen Mikroskopie und der optischen Lithografie.

Das **Abbe Kriterium** besagt, dass der kleinste Abstand d zweier Punkte, die gerade noch aufgelöst werden können, begrenzt ist durch [3]

$$a_{xy} \geq d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} . \quad (2.1)$$

Wobei a_{xy} die Auflösung in der x,y Ebene ist, n die Brechzahl, α den halben Öffnungswinkel des Objektivs und λ die Wellenlänge darstellen. Somit ist die kleinst mögliche Auflösung des Abstandes zwischen zwei Punkten immer durch die Wellenlänge begrenzt.

Überträgt man das Abbe Kriterium auf die Zwei-Photonen-Lithografie ist der kritische Abstand der Abstand zwischen zwei Punktbeleuchtungen. Hierbei ist zu beachten, dass sich bei der Zwei-Photonen Absorption folgendes Abbe Kriterium ergibt [4] :

$$d_{horizontal} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA \cdot \sqrt{2}} , \quad (2.2)$$

$$d_{vertikal} = \frac{\lambda \cdot 2,5}{2 \cdot NA \cdot \sqrt{2}} . \quad (2.3)$$

Das Abbe Kriterium erweitert sich durch die Gauss Kurve der Zwei-Photonen-Absorption also um den Faktor $\sqrt{2}$. Spricht man von der Auflösung der Zwei-Photonen-Lithografie muss man zusätzlich zwischen der horizontalen (a_{xy}) und der vertikalen (a_z) Auflösung unterscheiden. Das Abbe Kriterium macht keine direkte Aussage über die vertikale Auflösung. Diese ist im Schnitt ca. 2,5 mal schlechter als die horizontale [4]. Die genaue Auflösungsformel für die minimale vertikale Periode (Δk_z) kann durch die Konstruktion eines 3D Gitters mit Hilfe von mehreren Laserstrahlen hergeleitet werden und ist gegeben durch [3]

$$a_z = \frac{2\pi}{\Delta k_z} \geq \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}} . \quad (2.4)$$

Somit ist es in der Technik des DLW schwieriger die vertikale Auflösung zu verbessern als die horizontale, welche direkt durch das Abbe Kriterium festgelegt ist.

Über die Beleuchtungsdosis ist nur schwer eine Aussage zu treffen. Man nimmt an, dass die Beleuchtungsdosis proportional ist zur Dichte der Moleküle, welche durch Absorption angeregt wurden. Bei linearer Beleuchtung, also bei Ein-Photon-Absorption ist die Beleuchtungsdosis proportional zur Beleuchtungsintensität und zur Beleuchtungszeit. Bei Zwei-Photonen-Prozessen, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, liegt keine lineare Beleuchtung vor. Trotzdem bleibt die Proportionalität der Beleuchtungsdosis erhalten, auch wenn sie jetzt proportional zum Quadrat der Beleuchtungsintensität ist, was jedoch die mögliche ‘Liniendicke’ reduziert. Somit hat die resultierende Linienbreite (FWHM = full width at half maximum) die Hälfte des Maximums der Beleuchtungsdosis [3]:

$$FWHM = a_{xy} \times \frac{2a \cos(\sqrt[4]{0.5})}{\pi} \approx \frac{a_{xy}}{2.75} = \frac{\lambda}{5.5NA} . \quad (2.5)$$

Die Breite der mittels Zwei-Photonen-Lithografie geschriebenen Linien kann trotz der Auflösungsbeschränkung durch das Abbe Kriterium weiter reduziert werden. Praktisch wird die Auflösung der Linienbreite insofern weiter verbessert, indem man das Maximum der räumlichen Intensität des Lasers so dicht wie möglich an die Polymerisationsschwelle des Fotolacks annähert. Dadurch erfolgt die Belichtung nur an der Stelle, an welcher der Laser genug Energie zur Anhebung der Moleküle liefert. Dies ist nur in der innersten Region des Laservoxels der Fall. Randeffekte durch einen zu breiten Laservoxel können, wie bereits in 2.2.4 beschrieben, mittels Auslöschung mit Hilfe eines zweiten Laserstrahls umgangen werden. Es folgen Linienbreiten mit einer Auflösung von bis zu 80 nm, welche also zehn mal kleiner sind als die typische verwendete Wellenlänge von 0,8 μm . Außerdem kann die Linienbreite noch weiter durch die Eigenschaften des Fotolacks beeinflusst werden, indem man die Belichtungsdosis möglichst dicht an die Grenzdosis zur Zwei-Photonen Absorption heranbringt. Dies geschieht entweder durch Verringerung der Belichtungsintensität oder der Belichtungszeit. Jedoch wird das System mit der Verbesserung der Linienbreite auch anfälliger auf Fluktuationen des Lasers. Ein weiteres Problem stellt die Stabilität der Verlinkungen der Monomere des Fotolacks dar, wodurch die Herstellung eines mechanisch stabilen Lackes sehr schwierig wird.

Abschließend kann also gesagt werden, dass die Auflösung der Zwei-Photonen-Lithografie weiterhin durch das Abbe Kriterium direkt beschränkt ist, jedoch die Linienbreite, welche der Voxel schreibt, unabhängig vom Abbe Kriterium stark beeinflusst werden kann. Dies erklärt sich dadurch, dass das Abbe Kriterium nur bei gleichmäßiger Belichtung gültig ist. Wird jedoch nicht linear belichtet, wie es beim DWL Prozess zum Beispiel der Fall ist, orientiert sich die Auflösungsgrenze hauptsächlich nach der Linienbreite, welche im optimalen Fall geschrieben werden kann. Somit ist es der Zwei-Photonen-Lithografie gelungen, das Abbe Kriterium zu umgehen. Die hauptsächliche Auflösungsbeschränkung liegt nun in dem Wachstum der Polymerketten und der Streuung der bei der Reaktion beteiligten Radikale.

2.2.6. Der Voxel

Bei der Zwei-Photonen Absorption wird der Fotolack mit Hilfe eines zentrierten Brennpunktes belichtet. Dieses Zentrum wird ‘Voxel’ (volume pixel) genannt. Der Name kommt vom 2D Analogon Pixel. Dreidimensionale Objekte können in den Fotolack geschrieben werden, indem man die Probe verfährt. Der Voxel besitzt eine ellipsenähnliche Form. Die genauen Ausmessungen

werden im Experimentaltail erläutert. Wichtig ist, zu beachten, dass der Voxel vertikal deutlich größer ist als horizontal.

Die Ausmessungen des Voxels sollen möglichst dicht an die Größe des Beleuchtungsvolumens angepasst werden. Hier besteht die Problematik darin, Randbeugungseffekte des Lasers möglichst auszuschalten. Dies kann durch die in Kapitel 2.2.3 diskutierten Methoden erreicht werden. Weitere Ideen zur Begrenzung von Beugungseffekten des Voxels können aus der Flureszenzmiroskopie übernommen werden. Es seien kurz zwei Ideen aufgeführt:

'Donut-Fokus' Diese Art Voxel kann erreicht werden, indem man eine spiralförmige Maske in den Strahl einbringt. Jedoch wird dadurch nur die horizontale Auflösung des Voxels beeinflusst, während die vertikale nahezu gleich bleibt. Somit ist diese Methode für die DLW-Lithografie uninteressant.

'Flaschen-Fokus' Diese Methode ist weit interessanter für die DLW-Lithografie als der 'Donut-Fokus'. Sie kann durch einbauen einer zylinderförmigen Maske mit einem außenlaufenden Ring erreicht werden.

Der in der Abb. 2.5 zu sehende Voxel entsteht aus einer Kombination der bereits erwähnten Möglichkeiten.

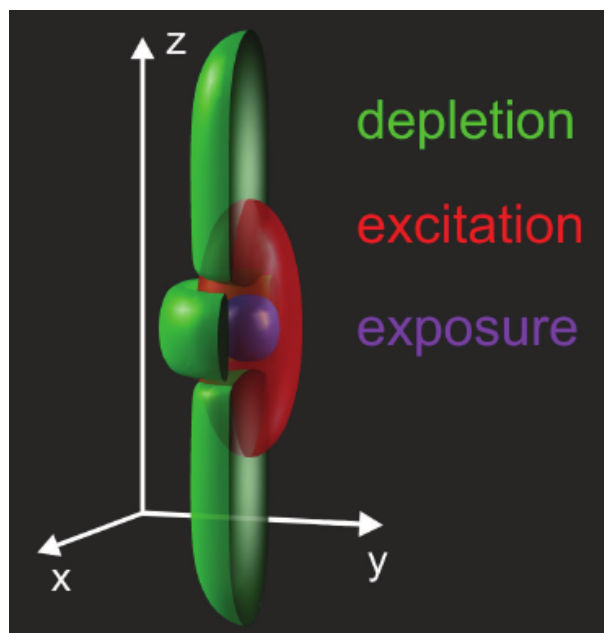


Abbildung 2.5.: Voxel des Laserstrahls. Die volle Voxelgröße (grün) wird durch Auslöschung (depletion) weiter dezimiert bis auf den roten Bereich, welcher den angeregten Bereich (excitation) darstellt. Die Hauptbelichtung (exposure) findet mit dem 'Kern' des Lasers (violett) statt [3].

Eine genaue Kenntnis des verwendeten Voxels ist von Vorteil, da man somit die zu schreibenden Objekte besser kontrollieren kann. Jedoch ist die genaue Kontrolle des Voxels sehr schwierig, da dieser je nach Lasereinstellung und Einstellungsänderungen im Aufbau variieren kann.

3. Experiment

In diesem Kapitel wird auf die Herstellung der Erythrozytenmodelle eingegangen. Dabei sollen zuerst alle wichtigen Komponenten des Herstellungsprozesses, wie das verwendete 3D-Lithografiesystem und die dazu benötigte Software kurz vorgestellt werden. Die abschließenden Abschnitte widmen sich dann dem eigentlichen Herstellungsprozess der Modelle der roten Blutkörperchen.

3.1. 3D-Lithografiesystem

Bei dem kommerziell erhältlichen Gerät der Firma *nanoscribe* [11], handelt es sich um ein Laserlithografiesystem, welches mittels Zwei-Photonen Prozessen dreidimensionale Strukturen mit einer Linienbreite von 150 nm polymerisieren kann.

3.1.1. Aufbau eines 3D-Lithografiesystems

Das System besteht aus einem Laser, optischen Elementen zur Strahlengangführung, Mikroskop, elektronischer Steuerung, Temperaturkontrolle und Probenhalterplatte.

Laser und optischer Aufbau: Es wird ein gepulster Titan-Saphir Laser mit einer Wellenlänge von 780 nm verwendet. Der Laser wird über Spiegel auf die Probe projiziert. Die Laserintensität wird über einen akustischoptischen Regler (acousto optic modulator ‘AOM’), gesteuert.

Mikroskop: Das Mikroskop fokussiert den ankommenden Laserstrahl als Voxel in ein sehr kleines Volumen, um somit den Fotolack zu belichten. Sowohl die Verschiebung der Probe über den Motor, als auch über die Piezoelemente, sind am Mikroskop angebracht. Außerdem befindet sich am Mikroskop eine Kamera und eine LED zur Beleuchtung der Probe, damit der Schreibvorgang beobachtet werden kann.

In Abb. 3.1 sind die Hauptkomponenten des Systems dargestellt. Des Weiteren enthält das Lithografiesystem Komponenten, welche zur Präparation der Probe benötigt werden. Die Objektträger, auf welche die Probe geschrieben werden soll, werden in einem Probenhalter angebracht. Dieser kann im oberen Teil des Mikroskops angebracht werden. Der Halter kann dann über Piezoelemente, welche sich auf den drei Achsen befinden, angesteuert werden. Für den Schreibprozess werden die Piezoelemente und der Laser mit Hilfe des Computers aufeinander abgestimmt. Auch besitzt der Aufbau verschiedene Objektive um den Laser zu fokussieren. Es handelt sich hierbei um ein Luft- und ein Ölobjectiv. Mit dem Ölobjectiv ist eine Linienbreite von 120 nm erreichbar. Während des Schreibvorgangs kann mit Hilfe der Piezoelemente ein Volumen von $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ abgedeckt werden.

3.1.2. Software

Das Lithografiesystem, welches im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, wird über eine Software angesteuert. Dabei existiert eine Vielzahl an Einstellmöglichkeiten. In den folgenden Abschnitten sollen die in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen kurz erläutert werden.

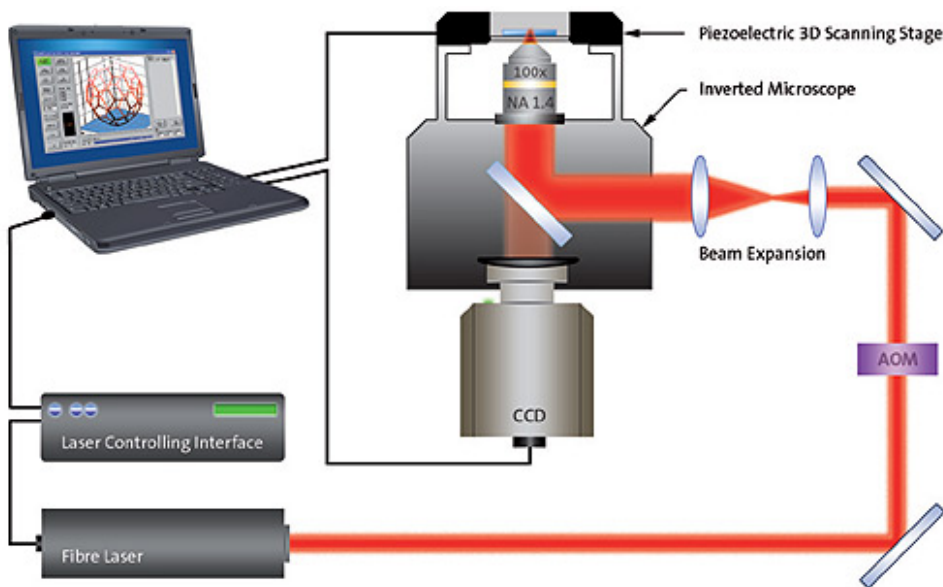


Abbildung 3.1.: Aufbau des Lithographiesystems der Firma *nanoscribe* [11]. Aufgezeigt ist der Weg des Laserstrahls über verschiedene optische Bauelemente zum Mikroskop (Inverted Microscope) und schließlich auf die Platte (Piezoelectric 3D Scanning Stage), welche die Probe beinhaltet. Der Aufbau wird über den Computer und der dazugehörigen Software gesteuert.

Laserpower: Die Laserpower kann von 25% bis ca. 90% variiert werden, wobei die 100% Leistung manuell festgelegt wird. Bei zu hoher Laserpower (mit dem Öbobjektiv bei ca. 95%) verbrennt der verwendete Fotolack. Bei zu tiefer Laserpower (mit dem Öbobjektiv bei ca. 15%) reicht die Energie zum Belichten des Fotolacks nicht mehr aus. Die Stärke der Laserpower beeinflusst die Größe des Voxels und somit die Linienbreite. Auch ist die Laserpowereinstellung für eine konstante Linienbreite für die beiden Objektive unterschiedlich.

Lasermodus: Der verwendete Laser kann in zwei verschiedenen Modi betrieben werden: dem ‘gepulsten’ Modus und dem ‘durchgängigen’ Modus. Im gepulsten Modus wird die Struktur, welche hergestellt werden soll, Punkt für Punkt belichtet. Die Belichtung erfolgt direkt nachdem der Piezo die angegebene Position angefahren hat. Dagegen verbindet der Laser beim ‘durchgängigen’ Modus, welcher in dieser Arbeit angewendet wird, zwei angegebene Punkte miteinander, ohne dabei abzusetzen. Dieser Modus ist schneller als der gepulste Modus. Im durchgängigen Modus kann die Software selbstständig weitere Punkte zwischen den Start und Zielpunkt setzen um die Schreibgeschwindigkeit des Lasers konstant zu halten. Die Verbindung der Punkte erfolgt über das aktivieren des ConnectPoint Befehls. Die Anzahl dieser Zwischenpunkte kann mit Hilfe des Befehls ‘PointDistance’, mit dem der Abstand, der zwischen den Punkten angegeben wird, geregelt werden.

Ein weiterer Befehl ist der ‘offset’ Befehl des Lasers. Dieser bestimmt indirekt die ‘Startposition’ des Lasers in einer Raumrichtung. Wird der offset Befehl auf 0 gesetzt, fokussiert der Laser auf eine zu kalibrierende Anfangsposition. Wird in den GWL-Daten (Textfile) in eine Raumrichtung keine Position angegeben, behält der Laser die offset Einstellung bei. Zu Anfang des Schreibvorgangs für die Erythrozytenmodelle wird der z-offset auf 0 gesetzt.

Schreibgeschwindigkeit: Die Schreibgeschwindigkeit des Lasers hängt von verschiedenen Fakto-

ren ab, zum Beispiel, wie oft der Laser während des Schreibvorgangs absetzen muss. Auch ist die Anzahl der Zwischenpunkte welche beleuchtet werden sollen relevant. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Schreibgeschwindigkeit des Lasers ist die Frequenz mit der die Daten an die Piezoelemente weitergegeben werden. Diese kann mit dem Befehl 'UpdateRate' gesteuert werden, welche in Hz angegeben wird. Beim Einstellen der UpdateRate ist zu beachten, dass der Wert nicht zu hoch gewählt wird, da ab einem bestimmten Wert, der stark von der Geometrie der zu schreibenden Struktur abhängt, der Piezomotor anfängt einzelne Punkte auszulassen. Um eine symmetrische Form der Erythrozytenmodelle zu gewährleisten wird mit einer maximalen Updaterate von 300 Hz geschrieben. Das Absetzen des Lasers zwischen den Belichtungseinheiten kann mit Hilfe des Befehls 'DwellTime' gesteuert werden.

Positionsbefehle: Die Piezoplatte, welche für das Abfahren der einzelnen Punkte mit dem Laser zuständig ist, ist am Mikroskop angebracht. Um die verschiedenen Punkte mit dem Laser zu verbinden, befindet sich der Laser im Piezomode. Dabei wird der Probenhalter während dem Schreiben allein durch die Piezoelemente bewegt. Bei größer zu beschreibenden Flächen als $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$, muss man den 'MoveStage'-Befehl im Piezomode verwenden oder in den Stagemode wechseln. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Genauigkeit nicht mehr wie im Piezomode im nm Bereich liegt, sondern im μm Bereich.

FindInterface: Viele wichtige Einstellungen, welche für den Schreibvorgang beachtet werden müssen, können von der Software automatisch eingestellt werden. Eine wichtige Prozedur ist dabei das Fokussieren auf die Grenzfläche Substrat/Fotolack, welche über den Befehl 'FindInterface' initiiert wird. Dabei wird ausgenutzt, dass die beiden Materialien an der Grenzfläche unterschiedliche Brechungsindizes haben. Um die Interface zu finden, wird ein Objektiv benötigt, welches mit Hilfe der Software oder manuell bewegt werden kann. Das Autofokussystem der Software arbeitet mit einem in den Strahlengang plaziertem Gitter, welches an der Grenzfläche reflektiert und auf einen CCD-Chip abgebildet wird. Der CCD-Chip ist schräg in den Strahlengang eingebracht, um einen größeren Bereich (in z-Richtung) gleichzeitig auszumessen. Der genaue Aufbau ist in Abb. 3.2 zu sehen. Das eingehende Signal wird anschließend ausgewertet. Dabei kann die Position des Fokus über die Position des Signales auf dem CCD Chip berechnet werden.

Die Fokussuche erfolgt zuerst über den 'Approach Sample'-Befehl, welcher das Objektiv langsam an die Probe heran fährt, während das reflektierte Signal des Gitters direkt ausgewertet wird, sobald das Signal eine bestimmte Stärke erreicht. Mit dem 'FindInterface'-Befehl wird nun das Objektiv über die Piezos in z-Richtung so weit bewegt, bis die vorderste Brennebene mit einer manuell zu kalibrierenden Null-Position der Interface übereinstimmt.

Zusätzlich zu der Fokussierung der Probe wird eine Messung der Signalstärke der Interface vorgenommen. Diese wird in Form des Befehls 'Interface found x@y' ausgegeben. Dabei gibt der erste Wert die Signalstärke an, während der zweite Wert proportional zur inversen Belichtungszeit der CCD Kamera ist. Die Größe der Werte ist abhängig von dem Brechungsindexunterschied Substrat/Fotolack und dem verwendeten Objektiv.

Da die reflektierten Signale für verschiedenen Grenzflächen unterschiedlich stark sind, kann mit dem Befehl 'Interfacemin/max' eine bestimmte Grenzfläche herausgefiltert werden. Zum Beispiel ist beim Luftobjektiv die Stärke des reflektierten Signals an der Luft/-Glas Grenzfläche höher, als die an der Glas/Fotolack Grenzfläche.

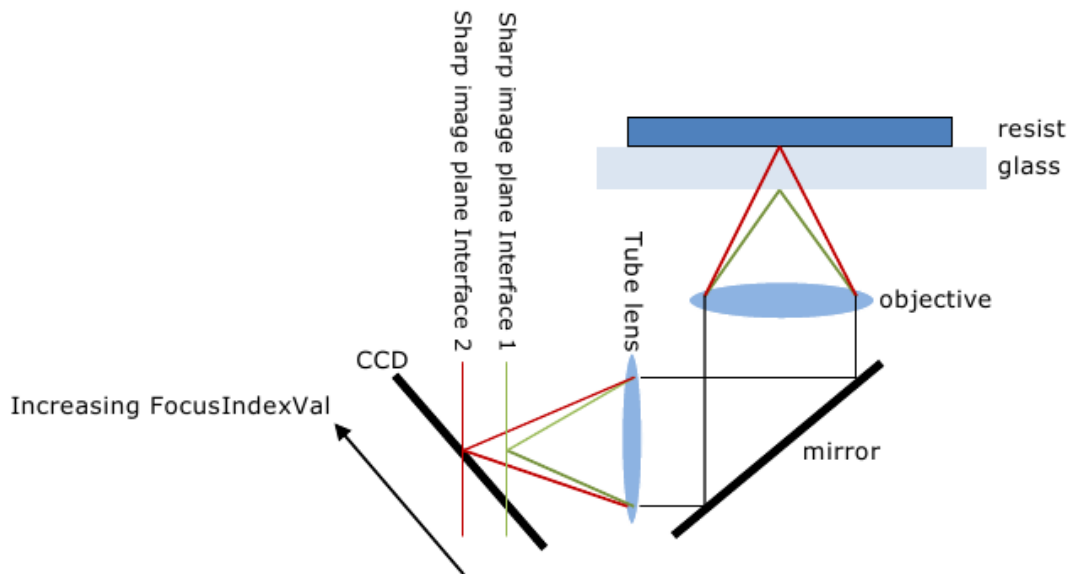


Abbildung 3.2.: Aufbau der abbildenden Komponenten im Laserlithographiesystem [11], welche unter anderem wichtig sind für die FindInterface Einstellung. Der Laser wird durch den halbdurchlässigen Spiegel (mirror) über das bewegliche Objektiv auf das Glas (glass) und den Fotolack (resist) gelenkt. Dabei wird der Strahl zurückgebrochen und mit Hilfe des CCD Chips wird die Scharfstellung in der Probe festgestellt. Bei Benutzung des Luftobjektivs existieren zwei Grenzflächen, zwischen Luft/Glas des Objekträgers (hier grün) und Glasplättchen/Fotolack (hier rot).

3.2. Herstellung der Erythrozytenmodelle

3.2.1. Modellsystem

Die Erythrozytenmodelle bestehen aus einem Fotolack, welcher während der Herstellung ausgehärtet wird. Sie sind nicht verformbar und haben eine Dichte von ca. $1,16 - 1,19 \text{ g/cm}^3$ bei 20°C [11]. Der Durchmesser der 'künstlichen' Erythrozyten liegt zwischen $7,5-8 \mu\text{m}$. Die Dicke liegt außen bei ca. $2 \mu\text{m}$ liegt und innen, bei ca. $1 \mu\text{m}$. Die Ausmessung der Erythrozytenmodelle erfolgt mittels eines Elektronenmikroskops.

3.2.2. Präparation der Probe

Der Fotolack wird zum Belichten auf einem Objektträger aufgetropft, welches anschließend im Lithographiesystem positioniert werden kann. Für das hier verwendete Ölobjektiv wird zusätzlich zu dem Fotolack auf der Unterseite des Objektträgers noch ein Öltropfen aufgetragen. Nach dem Schreiben der Probe in den Fotolack muss dieser entwickelt werden. Dies geschieht in Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, analytic reagent grade, Fisher Scientific UK, Loughborough) oder dem dafür vorgesehenen Entwickler [11] für ca. 20 min. Anschließend wird die Probe mit Isopropanol gespült und getrocknet.

3.2.3. Voxel Ausmessung

Um die Größe der Erythrozytenmodelle festlegen zu können ist die Kenntnis über die Geometrie des Voxels sehr wichtig. Dieser wird als Zylinder mit elliptischer Grundfläche charakterisiert. Genaue Ausmessungen erfolgen über den Voxelquerschnitt des Lasers zu verschiedenen Laserstärkeinstellungen. Dies geschieht über das Schreiben verschiedener Linien welche anschließend unter dem Elektronenmikroskop (1540XB, Zeiss) ausgemessen werden. Eine weitere Möglichkeit den Voxel auszumessen wäre eine Punktbelichtung des Fotolacks. Dieser 'Voxelquerschnitt' war jedoch anschließend nicht im Fotolack zu erkennen. Hier werden die künstlichen Erythrozyten mit einer Laserpower von 30 % geschrieben. Die Ausmessungen des Voxels ergeben eine Voxelhöhe von ca. $0,8 \mu\text{m}$ und einer Breite von ca. $0,3 \mu\text{m}$. Diese Ausmessungen beruhen nicht allein auf den Daten der Linienausmessung des Voxels, sondern auch auf den Ausmessungen und Größenanpassungen der bereits geschriebenen Teilchen. Abb. 3.3 zeigen die Ausmessung der Linien für Laserpower 30 %.

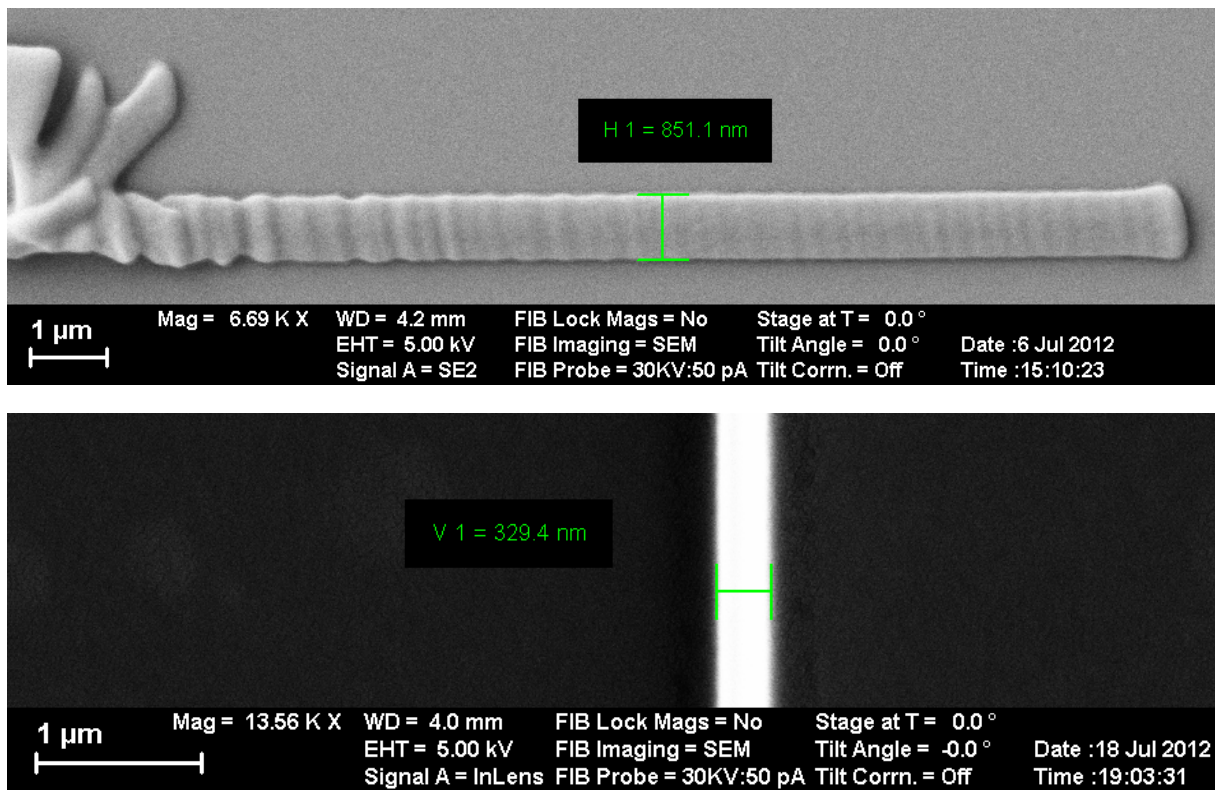


Abbildung 3.3.: Ausmessung der Linienhöhe (oberes Bild) und Linienbreite (unteres Bild) bei einer Laserpower von 30 %. Das obere Bild wurde mit Hilfe dem SE2-Detektor im Elektronenmikroskop aufgenommen. Da dieser seitlich von der Probe angebracht ist, ist die dreidimensionale Struktur der Probe gut zu erkennen. Dagegen ist das untere Bild mit dem InLens-Detektor des Elektronenmikroskops aufgenommen, welcher sich senkrecht über der Probe befindet. Somit geht die 3D-Struktur des Bildes verloren, Kanten sind aber weiterhin gut zu erkennen.

3.2.4. Datenverarbeitung

Um ein 3D-Modell des Erythrozyts zu polymerisieren, müssen dem Lithografiesystem aufeinanderfolgende Koordinaten übergeben werden, welche vom Laservoxel verbunden werden. Um ein stabiles Modell zu erhalten, muss auch das Innere des Erythrozyten belichtet werden. Die Daten für das Modell der Erythrozyten wurde von der Gruppe von G. Gompper [2] übernommen. Das Modell beschreibt die Oberfläche in Form eines Netzes, wobei die Koordinaten der Knotenpunkte gegeben sind. In Abb. 3.4 sind diese Oberflächendaten dargestellt.

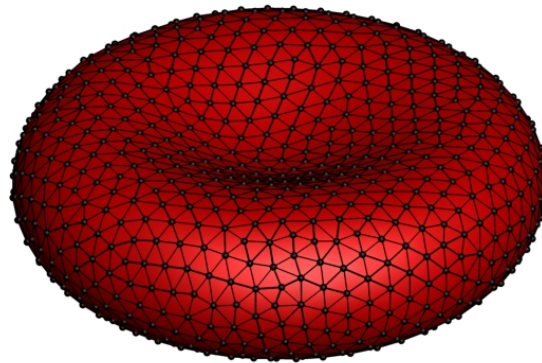
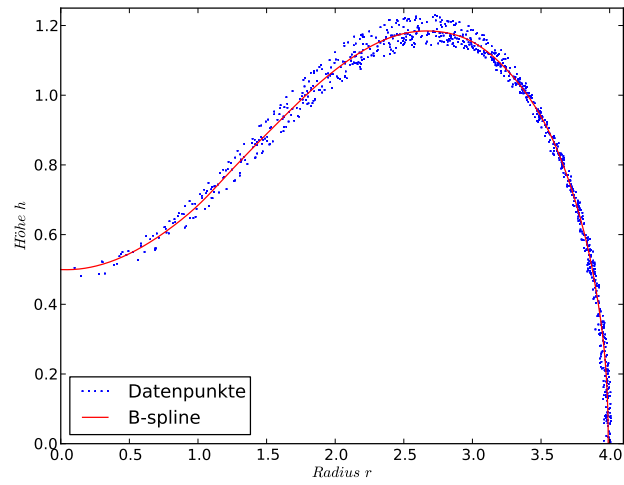
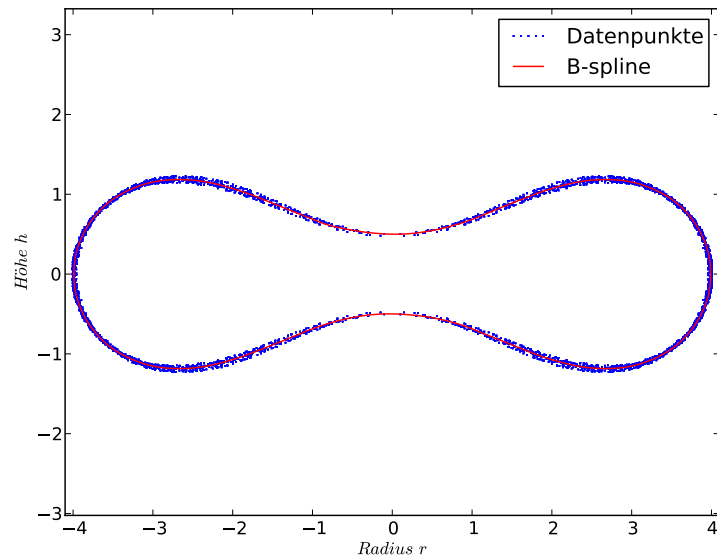


Abbildung 3.4.: Netzform der Daten für das Erythrozytenmodell [2]

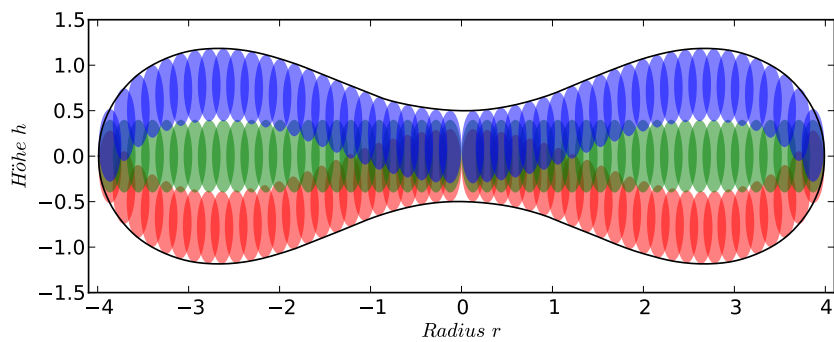
Um aus dem Oberflächenmodell die Schreibkoordinaten zu erstellen, wird dieses zuerst geglättet. Dazu werden die dreidimensionalen Daten (x, y, z) durch Ausnutzung ihrer Rotationssymmetrie auf zwei Dimensionen (r, z) reduziert. Durch diese Daten wird ein geglätteter B-Spline eingepasst. Das Oberflächenmodell soll nun von mehreren Voxelringen ausgefüllt werden. Dabei wird der Erythrozyt in drei Schichten aufgebaut. (Prinzipiell wäre ein mehrschichtiger Aufbau möglich, welcher im Rahmen dieser Arbeit auch programmiert wurde, jedoch dauert hierbei der Schreibvorgang eines einzelnen Erythrozyten zu lange (ca. 5 min).) Das Erythrozytenmodell besteht aus einer Bodenplatte, einer Mittelplatte und einer Deckplatte. Abb. 3.5 (c) zeigt einen Querschnitt durch die einzelnen Ringe. Die Einpassung der einzelnen Voxelringe erfolgte nur über die Länge der beiden Ellipsenachsen. Dabei entstehen kleine Überlappungsfehler. Der Schreibvorgang beginnt mit dem tiefsten Ring in der untersten Schicht, welche auf dem Glasplättchen aufliegt. Die einzelnen Voxelringe werden durch Verbinden von einzelnen Eckpunkten als ringförmig angenähert und mit konstantem Abstand aufgebaut. Dabei erhöht sich die Anzahl der Eckpunkte im Voxelring mit dem Radius. Der Abstand wurde so gewählt, dass die Oberfläche genügend glatt ist und nicht kantig erscheint. Der radiale Abstand zwischen den einzelnen Voxelringen wurde konstant und überlappend gewählt.



(a) rotationssymmetrischer Teil der Modelldaten mit B-Spline



(b) Modelldaten mit B-Spline



(c) Dreischichtiges Modell des Erythrozyten

Abbildung 3.5.: Daten des Erythrozytenmodells: (a) rotationssymmetrische Modulation mit Hilfe eines B-Splines, (b) Drehen und Spiegeln des Splines ergibt das Erythrozytenmodell, (c) dreischichtiger Aufbau des künstlichen Erythrozyten, welcher vom Laser zur Herstellung belichtet wird.

3.2.5. Schreibvorgang und Extraktion der Teilchen

Schreibvorgang

Für den Schreibvorgang wird das Ölobjektiv verwendet. Das Verwenden des Luftobjektivs wäre prinzipiell auch möglich, Messungen mit beiden Objektiven haben jedoch ergeben, dass die Größe der Erythrozyten mit Hilfe des Ölobjektivs besser zu realisieren ist, als mit dem Luftobjektiv. Der Schreibvorgang ist mit dem Luftobjektiv langsamer, als mit dem Ölobjektiv. Da die Erythrozytenmodelle später für die Lichtstreuung verwendet werden sollen und dafür mindestens 10^4 Erythrozyten gebraucht werden, ist der Zeitfaktor durchaus zu berücksichtigen.

In Abb. 3.7 sind Erythrozytenmodelle zu sehen, welche mit dem Öl- und mit dem Luftobjektiv geschrieben wurden. Bei den Modellen, welche mit dem Luftobjektiv geschrieben sind, ist deutlich zu erkennen, dass die Modelle höher sind als ein biologischer Erythrozyt. Damit die Höhe des Erythrozytenmodelles angepasst werden kann, muss die Laserpower für das Luftobjektiv deutlich tiefer eingestellt werden. Dies erweist sich jedoch als schwierig, da die eingestellte Laserpower für das Luftobjektiv nur schwer unter 60% eingestellt werden kann, da für tiefere Einstellungen die Intensität im Fokus zu klein ist um den Fotolack zu belichten. Beim Ölobjektiv hingegen, kann die Laserpower von ca. 20% - 90% variiert werden. Dies ist damit zu erklären, dass Öl einen größeren Brechungsindex besitzt als Luft und deshalb besser in den Fotolack fokussiert werden kann.

Da der verwendete Laser im Femtosekundenbereich gepulst ist, kann der Voxel relativ genau mit Hilfe von computerüberwachten Scan Methoden und Piezoelementen in den Fotolack 'zentriert' werden. Zur Einstellung der Laserpower für das Ölobjektiv wurden mehrere Erythrozytenmodelle mit verschiedenen Einstellungen geschrieben und daraufhin der Voxel ausgemessen. Ein Beispiel ist in Abb. 3.6 zu sehen. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich durch die hohe Anzahl der herzustellenden Erythrozytenmodelle. Durch diese Forderung wird die Zeitspanne, welche für einen Erythrozyten zum Schreiben zur Verfügung steht stark eingeschränkt. Wie in Abschnitt 3.2.4 bereits beschrieben, wurden dabei zwei Arten von Schreibvorgängen getestet. Dabei erwies sich die Art des 'drei Schichten Schreibens' als die zeitlich kürzere Variante. Hierbei liegt die Zeit eines einzelnen Erythrozyten bei ca. 32 s. Zum Schreiben von 10000 Teilchen wird demnach eine Zeit von ca. 3,7 Tagen benötigt, diese Angabe kann jedoch variieren, da der Laser zum Absetzen zwischen den Teilchen ebenfalls Zeit benötigt.

Die Erythrozytenmodelle werden in der Mitte der Probe geschrieben. Dabei wird eine Fläche von 1 mm^2 genutzt. Der Abstand vom Mittelpunkt des ersten Erythrozyten bis zum Mittelpunkt des zweiten Erythrozyten beträgt $12 \mu\text{m}$. Damit werden jeweils 100 Teilchen in x- und in y-Richtung geschrieben. Somit ergibt sich eine Gesamtanzahl von 10000 Erythrozyten pro Schreibvorgang. Zusätzlich zur Ausmessung verschiedener Erythrozyten wurden die Daten der Voxelausmessung berücksichtigt. Die Erythrozytenmodelle sind schließlich mit einer Laserpower von 30 % und dem Ölobjektiv geschrieben.

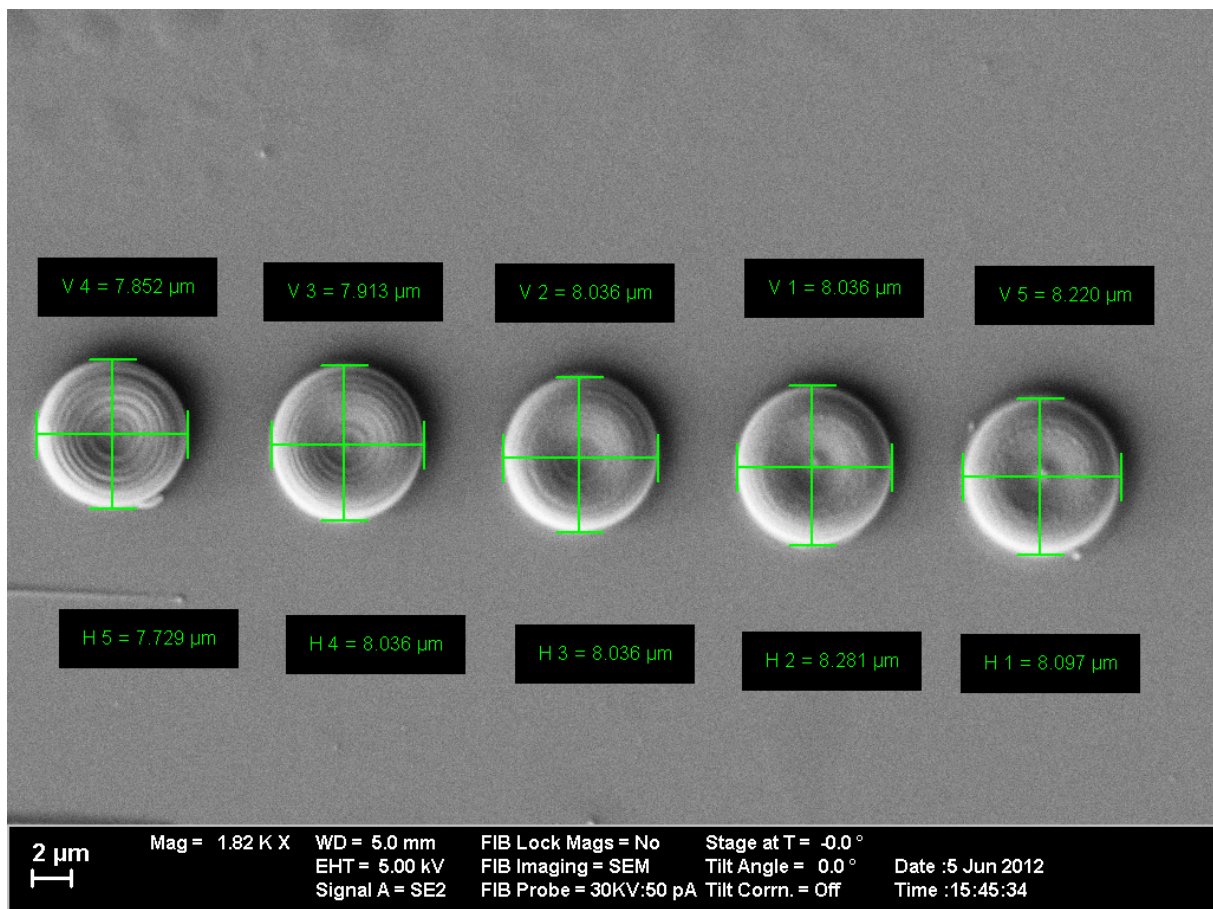
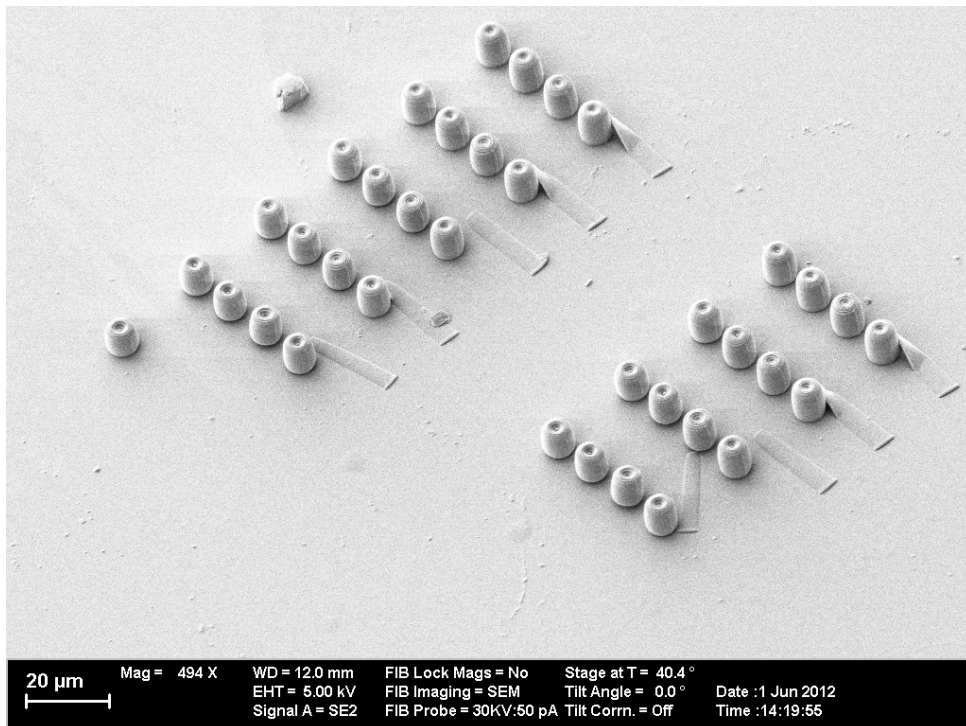
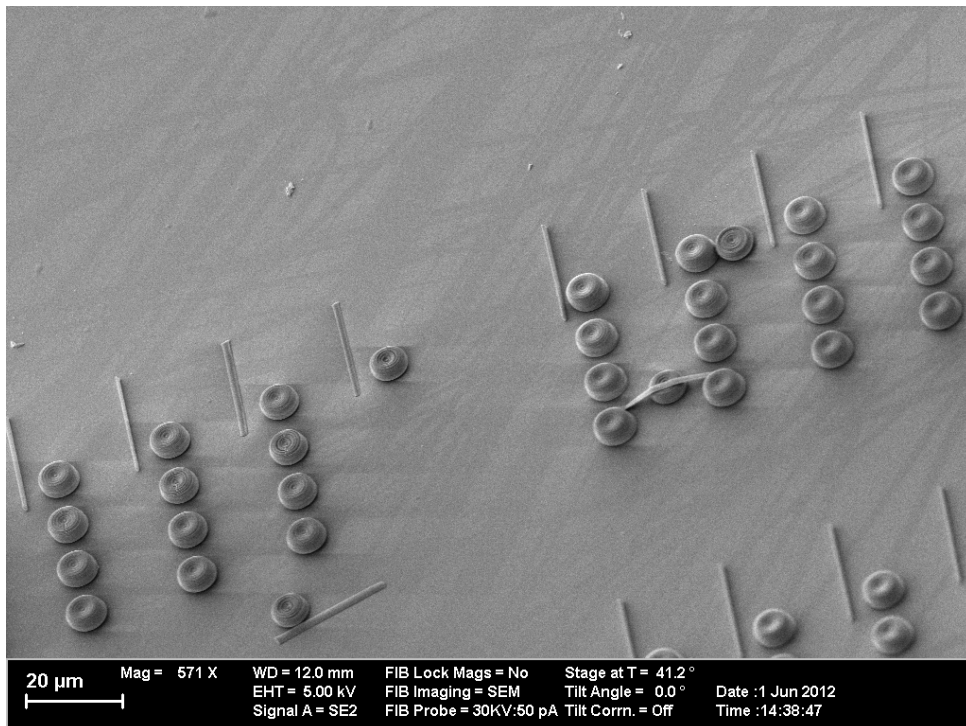


Abbildung 3.6.: Ausmessung verschiedener Erythrozyten. Auflösung der Abstände der einzelnen Beleuchtungspunkte des Lasers in μm (von links nach rechts) : 0.2, 0.15, 0.1, 0.75, 0.5.



(a) Luftobjektiv



(b) Ölobjektiv

Abbildung 3.7.: Elektronenmikroskopbilder der Erythrozytenmodelle, geschrieben mit dem Luftobjektiv bzw. mit dem Ölobjektiv. Die mit dem Luftobjektiv (a) geschriebenen Erythrozyten sind deutlich höher als die mit Hilfe des Ölobjektivs geschriebenen (b). Dies liegt an der besseren Einstellmöglichkeit der Laserpower aufgrund des größeren Unterschieds des Brechungsindex bei Verwendung des Ölobjektivs.

Extraktion der Erythrozytenmodelle

Nach dem Schreiben der Erythrozyten müssen diese von dem Objektträger abgelöst werden. Das Ziel ist es, die Erythrozyten letztendlich in wässriger Lösung vorliegen zu haben. Das Extrahieren der Erythrozyten von dem Objektträger, auf welchen sie geschrieben wurden, erfolgt mit Hilfe eines Ultraschallbades (Elmasonic P, Elma). Das Ultraschallbad wird mit einer Frequenz von 37 Hz und voller Leistung 50 min betrieben, womit die Erythrozytenmodelle von dem Objektträger abgelöst werden können.

Weiterverarbeitung der abgelösten Erythrozytenmodelle

Die Modelle der Erythrozyten liegen nun extrahiert in ca. 20 ml Isopropanol oder dionisiertem Wasser ($> 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Milli-Q Advantage Wassersystem, Millipore) vor. Das Ziel ist es jetzt, diese auch von der unteren Seite (welche bisher auf dem Objektträger aufgelegt hat) unter dem Elektronenmikroskop zu betrachten. Durch abpipettieren, nachdem die Modelle abgesunken sind, wird der größte Teil der Flüssigkeit, ohne die Teilchen, entfernt. Um einschätzen zu können, wann die Erythrozyten im Isopropanol (bzw. Wasser) abgesunken sind, wird der Sedimentationskoeffizient der Erythrozytenmodelle berechnet. Außerdem sollen die Modelle anschließend in einem möglichst kleinen Tropfen auf ein Objektträger aufgebracht werden. Hierzu ist es nötig die Objektträger zu silanisieren.

Sedimentationsgeschwindigkeit Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird bestimmt, damit die Zeit abgeschätzt werden kann, in welcher sich die Erythrozytenmodelle in der Pipetierhilfe an der Spitze der Pipette absetzen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit berechnet sich über die Stoke'sche Gleichung aus der Dichte der Partikel ρ_P und der Flüssigkeit, hier Isopropanol ρ_F oder Wasser ρ_W , der Erdbeschleunigung g , dem Äquivalentradius r_e und der dynamischen Viskosität von Isopropanol η bzw. Wasser η_W . Die Formel für die Sedimentationsgeschwindigkeit lautet [12]:

$$v = \frac{2r_e^2 g (\rho_P - \rho_F)}{9\eta} . \quad (3.1)$$

Der Äquivalentradius r_e stellt den Radius dar, welchen eine Kugel mit demselben Volumen der Partikel haben würde. Er berechnet sich über:

$$r_e = \frac{1}{2} \sqrt[3]{\frac{6V_K}{\pi}} , \quad (3.2)$$

wobei V_K hier das Volumen eines Partikels ist. Das Volumen der Erythrozytenmodelle wird näherungsweise über das Volumen eines Zylinders bestimmt. Es ergibt sich:

$$V_Z = \pi \cdot r^2 \cdot h = \pi \cdot (4 \cdot 10^{-6} \text{ m})^2 \cdot 2 \cdot 10^{-6} \text{ m} = 1,00510^{-16} \text{ m}^3 . \quad (3.3)$$

Somit folgt durch Gleichsetzen des Zylindervolumens mit dem Kugelvolumen $V_Z = V_K$ der Äquivalenzradius:

$$r_e = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ m} = 2,8 \text{ }\mu\text{m} . \quad (3.4)$$

Für die Sedimentationsgeschwindigkeit ergibt sich mit $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $\rho_P = 1,16 \text{ g/cm}^3$, $\rho_F = 0,785 \text{ g/cm}^3$ [13], $\eta = 0,32 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ [13], $r_e = 2,8 \text{ } \mu\text{m}$, $\rho_w = 0,998 \text{ g/cm}^3$, $\eta_W = 1 \text{ mPa} \cdot \text{s}$:

$$v = 7,74 \text{ cm/h für Isopropanol,} \quad (3.5)$$

$$v = 1,056 \text{ cm/h für Wasser.} \quad (3.6)$$

Mit einem Weg von ca. 5 cm, welchen die Erythrozytenmodelle in der Pipettierhilfe zurücklegen müssen, folgt eine Absinkzeit der Teilchen von:

$$T = 0,64 \text{ h} \approx 39 \text{ min für Isopropanol,} \quad (3.7)$$

$$T = 4,73 \text{ h für Wasser.} \quad (3.8)$$

Die errechnete Absinkzeit stellt einen guten Überschlagswert dar. Spätestens nach Ablauf dieser Zeit sind alle Erythrozytenmodell in der Probe bis zum Boden abgesunken.

Oberflächenbehandlung: Damit die Flüssigkeit einen möglichst kleinen Tropfen auf dem Glasdeckplättchen bildet, wird das Glas vor dem Auftragen behandelt. Der kleine Tropfen ist nötig, da die im Isopropanol befindlichen Erythrozytenmodelle, auf möglichst geringer Fläche aufgebracht werden sollen.

Durch das Behandeln der Objektträger mit Dimethyldichlorsilan ($C_2H_6Cl_2Si$, 99,5%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) werden diese hydrophob. Dem Silanisieren liegt eine Kondensationsreaktion zu Grunde. Bei dieser chemischen Reaktion entstehen Si-O-Si-Bindungen zwischen dem Silan und der Oberfläche, welche nicht unbedingt zeitlich unbeschränkt auf der Probe bestehen.

Auftragen der abgelösten Erythrozytenmodelle: Das Auftragen der Erythrozytenmodelle auf den Objektträger erfolgt mit einer Pipettierhilfe. Hierzu wird die restliche Flüssigkeit mit den Erythrozytenmodellen mit dieser aufgenommen und in ein Stativ eingespannt. Der oberflächenbehandelte Objektträger wird möglichst dicht darunter angebracht. Nach dem Absetzen der Erythrozyten in der Spitze werden diese auf den Objektträger pipetiert.

3.2.6. Formanalyse der hergestellten Erythrozytenmodelle

Die hergestellten künstlichen Erythrozyten müssen auf ihre Größe überprüft werden. Da sie später für die Lichtstreuung verwendet werden sollen, ist die wichtigste Größe ihre längste Länge, welche zwischen $7 \text{ } \mu\text{m}$ und $8 \text{ } \mu\text{m}$ liegen sollte. Es wäre auch eine Herstellung größerer bzw. kleinerer Erythrozyten möglich. Jedoch müsste dies dann später bei der Auswertung von Lichtstreuungsexperimenten mit den künstlichen Blutkörperchen beachtet und rechnerisch berücksichtigt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Überprüfen der Oberfläche der künstlichen Erythrozyten. Diese sollten eine Einbuchtung in der Mitte und eine möglichst glatte Oberfläche aufweisen. Variationen an den Einstellmöglichkeiten (wie zum Beispiel der Auflösung), welche für die Produktion der Erythrozytenmodelle wichtig sind, sind an Bildern gut zu erkennen (Abb. 3.6). Um die Größe und Form der Oberfläche der künstlichen Erythrozyten zu ermitteln wurde ein Elektronenmikroskop verwendet. Unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss) sind die hergestellten Erythrozyten mit einem Objektiv mit 20 facher oder 50 facher Vergrößerung bereits zu erkennen, eine deutlich bessere Auflösung ergibt sich jedoch, wenn die künstlichen Erythrozyten mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Mögliche Fehler während des Schreibvorgangs

Betrachtet man den Schreibvorgang der Erythrozytenmodelle, ergeben sich einige Schwachstellen und Verbesserungsmöglichkeiten in der Herstellung.

Ein wichtiger Faktor, den es während dem Schreibvorgang zu beachten gilt, ist der Zeitfaktor. Wie lange eine Erythrozyt zur Fertigstellung benötigt, lässt sich durch das Schreiben relativ einfach feststellen, da die Software während des Schreibvorgangs die Zeit misst. Beim Schreiben mehrerer Erythrozyten wird diese gemessene Zeit jedoch verlängert, da zwischen zwei Erythrozytenmodellen immer wieder der Fokus gefunden werden muss. Diese Zeitverlängerung kann ebenfalls durch vermeiden des 'FindInterface' Befehls umgangen werden. Einen weiteren Punkt stellt der 'MoveStage'-Befehl dar. Zum einen kostet es Zeit die Stage nach jedem Erythrozyten zu verschieben. Dieser Vorgang würde im kleinen Rahmen deutlich schneller über das Piezoelement gehen. Hierzu müssten die Daten eines einzelnen Erythrozyten innerhalb eines Programms hintereinander geschrieben werden und die jeweilige Verschiebung in x und y Richtung jeweils addiert werden.

Eine weitere Fehlerquelle des 'MoveStage'-Befehls ergibt sich durch die Bewegung der Stage. Damit wird der Schreibvorgang nicht mehr punktgenau, was durch eine reine Bewegung mit dem Piezo gegeben wäre. Durch diese Bewegung, oder auch Stöße von außerhalb gegen das Lithografiesystem, kann es zu Verschiebungen der bereits geschriebenen Erythrozytenmodelle im flüssigen Fotolack kommen. Auch ist es möglich, dass durch äußere Einflüsse der Laser in der Probe verschoben wird. Dies können zum Beispiel Druckluftschwankungen im optischen Tisch sein oder Luftschwingungen. In beiden Fällen kann es dazu kommen, dass mehrere Erythrozytenmodelle ineinander geschrieben werden. Ein Beispiel für einen solchen Schreibfehler ist in Abb. 4.1 zu sehen.

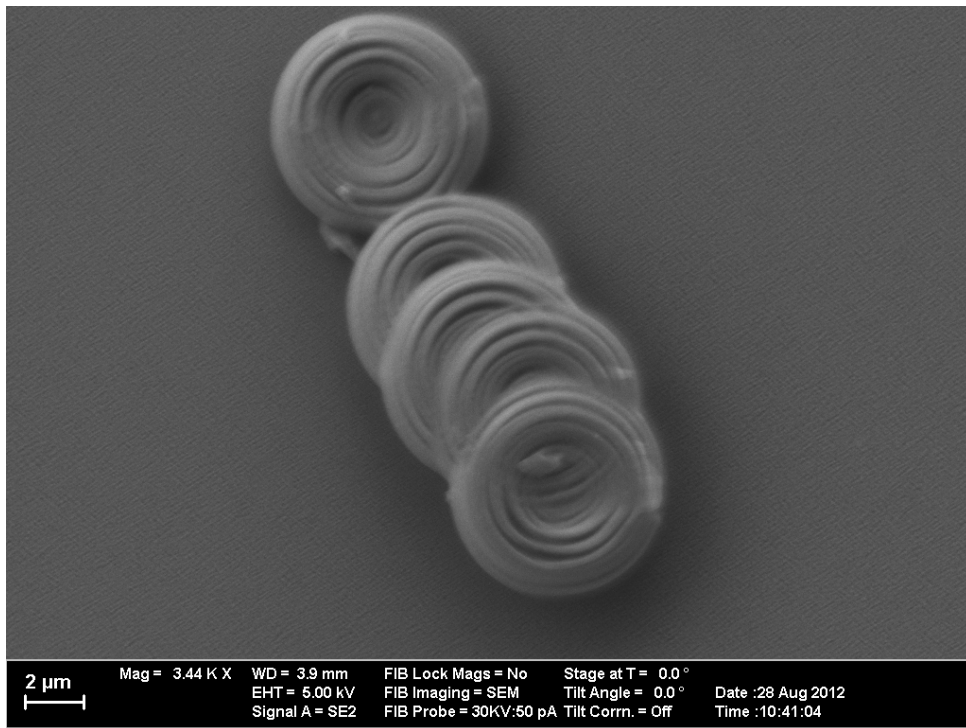


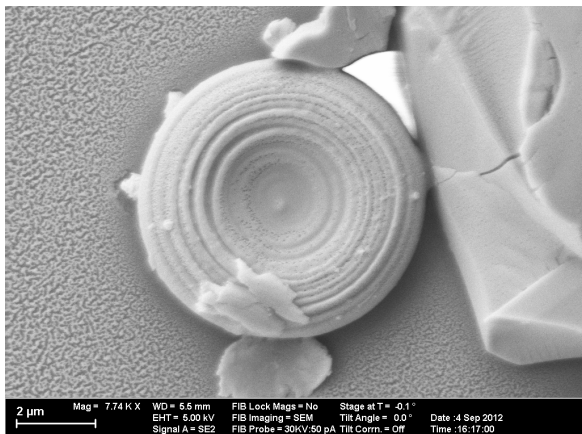
Abbildung 4.1.: Modelle der Erythrozyten, welche während des Schreibvorganges ineinander geschrieben wurden.

4.2. Auftragen der Erythrozytenmodelle nach dem Ablösevorgang

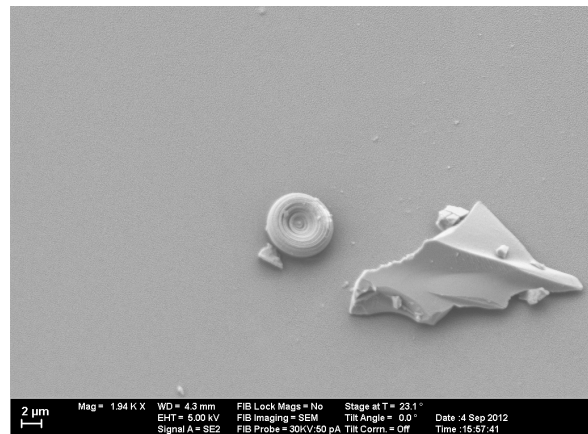
Nach dem Ablösen der Erythrozytenmodelle werden diese mit einer Pipettierhilfe wieder auf ein Glasplättchen aufgetragen. Dies geschieht durch Auftropfen der Flüssigkeit, in diesem Fall Isopropanol, in der die Modelle abgelöst wurden. Der Tropfen mit den enthaltenen Erythrozytenmodellen wird auf ein silanisiertes Glasplättchen aufgebracht. Nachdem der Tropfen auf dem Plättchen verdampft ist, bildet sich ein weißer ‘Klumpen’ auf der Probe, der zum Teil die Erythrozytenmodelle überdeckt.

Für das Auftreten dieser Verunreinigung könnte es mehrere Gründe geben. Es ist möglich, dass das Isopropanol mit dem Silan reagiert. Dies kann ausgeschlossen werden, da durch Auftropfen des Isopropanols auf ein mit dem Silan behandeltes Glasplättchen keine Verunreinigung nach dem Abdampfen des Isopropanols zu sehen war. Ebenfalls kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass sich kleine Verunreinigungen in der Pipettenspitze befinden, welche sich während dem Absinken der Erythrozytenmodelle durch das Isopropanol zu lösen beginnen und ebenfalls absinken, da sich beim Auftragen von Isopropanol auf unbehandeltes Glas keine Verunreinigungen bildeten.

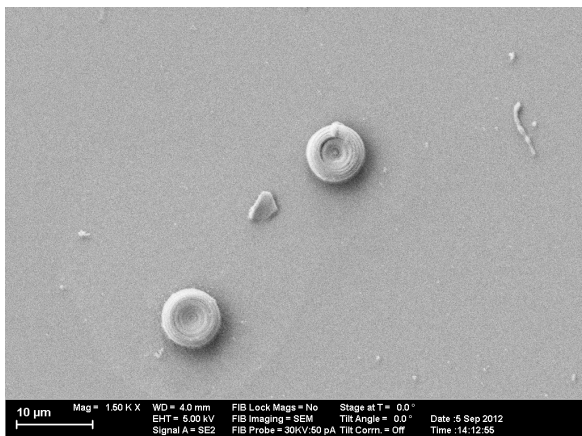
Ein weiterer Grund der Verunreinigung könnte im verwendeten Fotolack liegen. Durch die Donutform der Erythrozytenmodelle werden an der Unterseite des Erythrozyten, mit welcher dieser an das Glasplättchen grenzt, nicht entwickelte Fotolackreste eingeschlossen. Auch könnten geringe Mengen Fotolack während des Entwickelns an den Teilchen hängen bleiben. Beim Ablösen der Erythrozytenmodelle von dem Glasplättchen auf welches sie geschrieben wurden, löst sich schließlich der unbelichtete Fotolack im Isopropanol und könnte dann bei zu langem Aufenthalt im Isopropanol beim Auftragen auf das Probelplättchen Klumpen bilden.



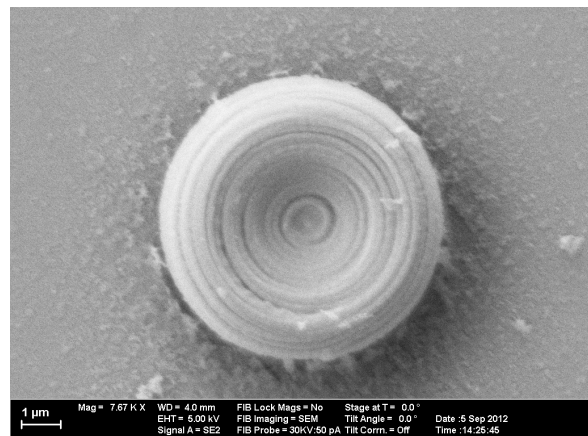
(a) Nach dem Auftropfen gebildeter 'Klumpen' mit Erythrozytenmodell nach dem Ablösen in Isopropanol



(b) Erythrozytenmodell mit Fotolackrest



(c) Erythrozytenmodelle nach dem Auftropfen, welche sich ursprünglich in Wasser befanden



(d) Erythrozytenmodell ohne Fotolackreste

Abbildung 4.2.: Vergleich der in Isopropanol abgelösten Erythrozytenmodelle mit den abgelösten Modellen in Wasser.

Ein weiterer Fehlerfaktor könnte auch die Reaktion bereits belichteten Fotolacks mit dem Isopropanol sein, falls sich dieser zu lange im Isopropanol befindet. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, werden die geschriebene Erythrozytenmodelle auch in dem für den Fotolack vorgesehenen Entwickler behandelt und anschließend kurz mit Isopropanol abgespült. Im Anschluss daran werden die Erythrozytenmodelle abgelöst, jedoch nicht wie bisher in Isopropanol sondern in Wasser. Somit findet ein nur zeitlich begrenzter Kontakt zwischen dem Fotolack und dem Isopropanol statt und nicht wie bisher über eine Zeitdauer von ca. 5 h. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine Wartezeit von 5 h für die Absinkzeit der Teilchen eingehalten wird. Betrachtet man die in Wasser abgelösten Erythrozyten unter dem Elektronenmikroskop sind keine Verunreinigungen mehr zu sehen. Somit können die Verunreinigungen auf die Reaktion der Fotolackreste mit dem Isopropanol zurückgeführt werden. Der Vergleich der beiden Ablösemethoden ist in Abb. 4.2 zu sehen.

4.3. Charakterisierung der Erythrozytenmodelle

Die Charakterisierung und die Ausmessung der Erythrozytenmodelle erfolgt mittels einem Elektronenmikroskop. Diese Methode der Größenmessung weist jedoch einige Ungenauigkeiten auf, da der Rand des zu messenden Teilchens nicht genau dargestellt werden kann. Die Abmessungsungenauigkeit liegt hierbei bei ca. $\pm 0.4 \mu\text{m}$. Dieser Wert fällt nicht weiter ins Gewicht, da die größte Länge des Erythrozytenmodells, welche für die Lichtstreuung am meisten ins Gewicht fällt, bei ca. $7\text{-}8 \mu\text{m}$ liegt.

Des Weiteren ist zu beachten, dass die Grundstruktur der Erythrozytenmodelle eine gewisse Ungenauigkeit aufweist. Die berechneten Datenpunkte ergeben sich zwar aus genauen Abmessungsvorgaben, jedoch sind Ungenauigkeiten zum Beispiel durch leichtes Überschreiben der Abgemessenen Erythrozytenränder (siehe hierzu Abb. 3.5 (c)) nicht auszuschließen. Zusätzlich ergeben sich Ungenauigkeiten durch die Voxelausmessung, welche zwischen mehreren Schreibvorgängen nicht unbedingt konstant bleibt. Die genaue Größe des geschriebenen Erythrozytenmodells ist praktisch nur schwer zu überprüfen. Unter dem Elektronenmikroskop kann zwar der Durchmesser des Erythrozyten bestimmt werden und durch Kippen der Probe auch die ungefähre Randbreite. Jedoch ist die Erythrozytenbreite von $1 \mu\text{m}$ in der Mitte des Modells nicht zu überprüfen. Auch kann die ‘Rückseite’ der Erythrozytenmodelle, welche sich zu Anfang auf dem Glas befindet nicht mit Sicherheit als diese identifiziert werden, da beide Seiten der Modelle theoretisch gleich sind. Somit ist eine optische Oberflächenanalyse der Erythrozytenmodelle sehr schwierig. Des Weiteren kann anhand der Erythrozytenmodelle noch einmal die Voxelbreite gemessen werden. Dies geschieht durch Ausmessen der einzelnen Linien, welche in Abb. 4.4 gut zu sehen sind. Hier wurde auch die Überlappung der einzelnen Voxelringe überprüft, wobei die einzelnen Ringe hier um ca. 100 nm überlappen. Bezüglich der Größe der Erythrozytenmodelle sei noch erwähnt, dass kleine Schwankungen für den Gebrauch mittels der Lichtstreuung nicht stark ins Gewicht fallen. Denn die längste Länge der Erythrozytenmodelle könnte für die Lichtstreuung auch ein vielfaches länger sein als die ihrer biologischen Vorbilder. Lichtstreuexperimente wären dann weiterhin möglich, jedoch müsste der Vergrößerungsfaktor dann bei der Auswertung berücksichtigt und rechnerisch angeglichen werden.

Betrachtet man die Modelle der Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop sind diese bereits gut zu erkennen jedoch nur schwer auszumessen. Trotzdem ist eine Betrachtung der geschriebenen Erythrozytenmodelle von Vorteil, da hierbei vor dem Ablösen der Erythrozyten bereits die angeordneten geschriebenen Erythrozyten gesehen werden können und Schreibfehler gleich bemerkt werden. Auch nach dem Ablösen und erneuten Auftragen auf einen Objektträger, werden die geschriebenen Erythrozytenmodelle noch einmal unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dabei wird die Stelle an der sich die Erythrozyten befinden markiert um sie später unter dem Elektronenmikroskop leichter zu finden. Eine Aufnahme mit dem Lichtmikroskop der geschriebenen Erythrozytenmodelle ist in Abb. 4.3 zu sehen.

Zur genaueren Analyse werden die Erythrozytenmodelle unter dem Elektronenmikroskop betrachtet und ausgemessen. In Abb. 4.5 sind verschiedenen Erythrozytenmodelle und ihre dazugehörigen Längenausmessungen zu sehen.

Durch den Ablösevorgang, kann es vorkommen, dass die Erythrozytenmodelle auf ihrem ‘Rand’ stehen. Somit wird eine Ausmessung des äußeren Durchmessers der geschriebenen Modelle möglich. Ein Beispiel ist in Abb. 4.5 zu sehen.

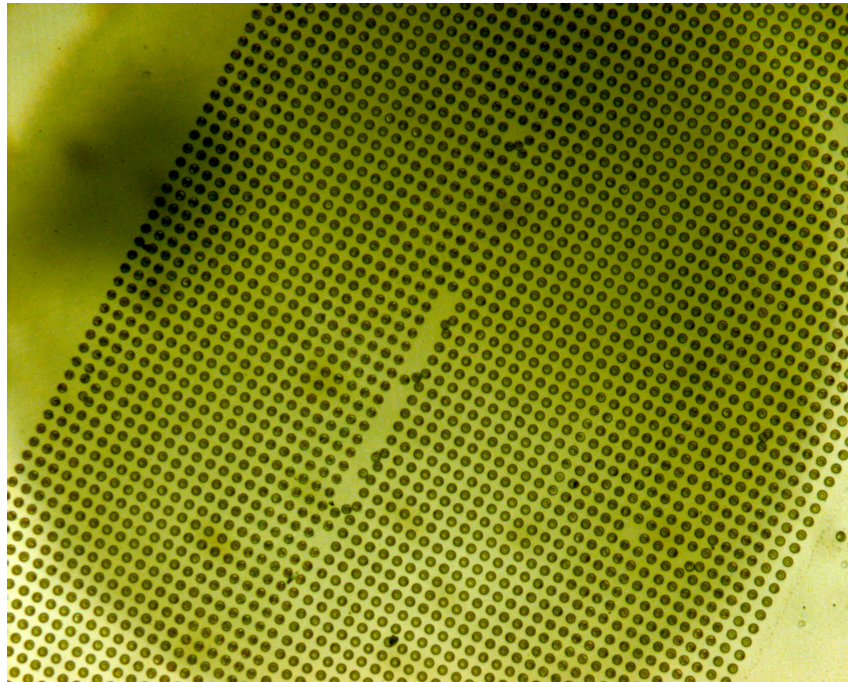


Abbildung 4.3.: Modelle der Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop

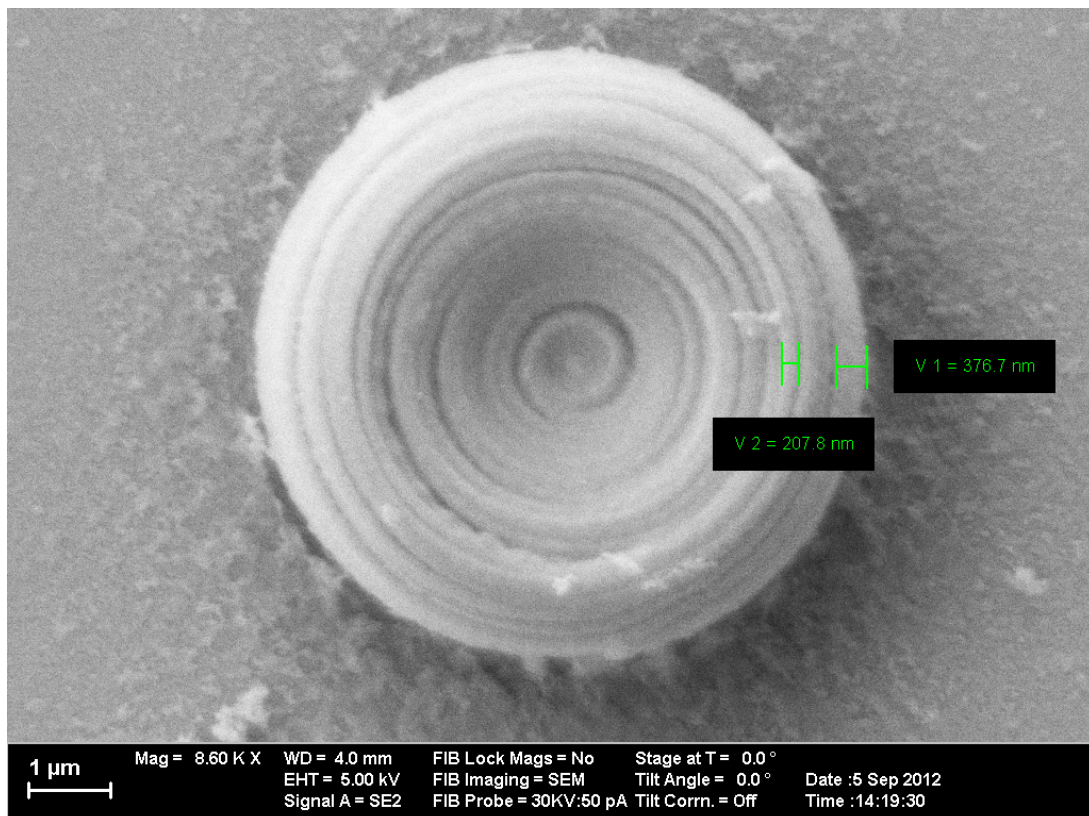
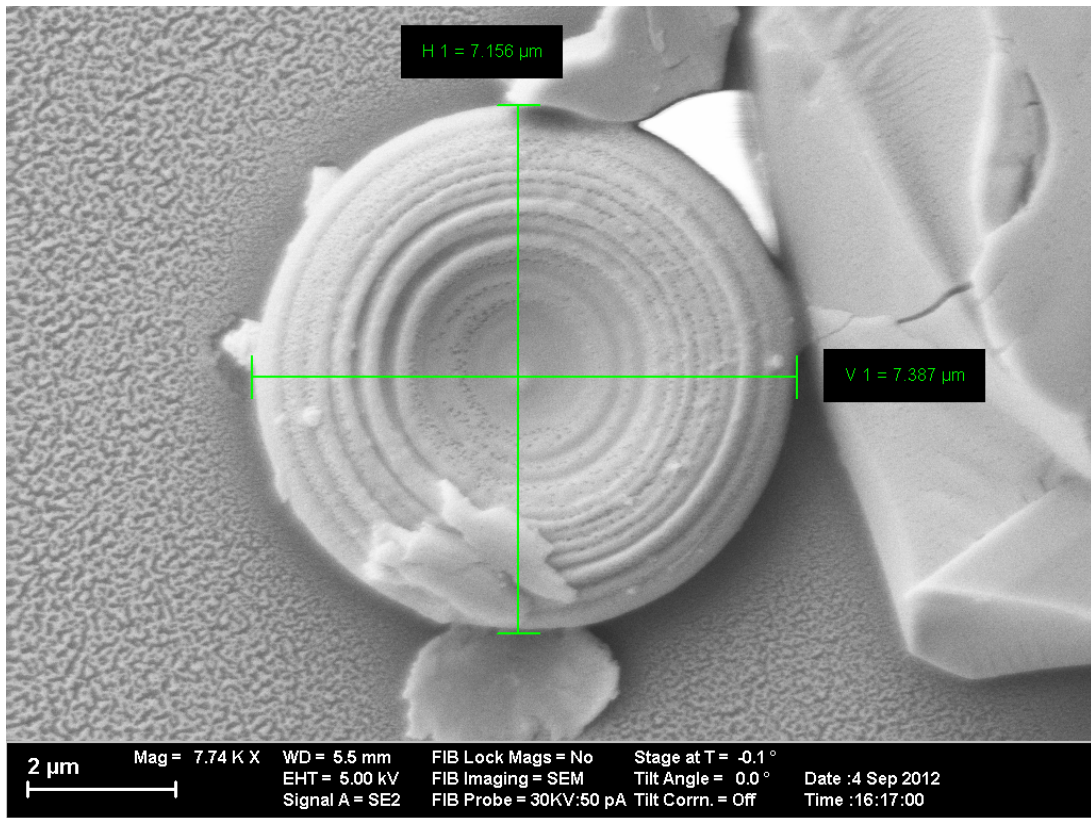
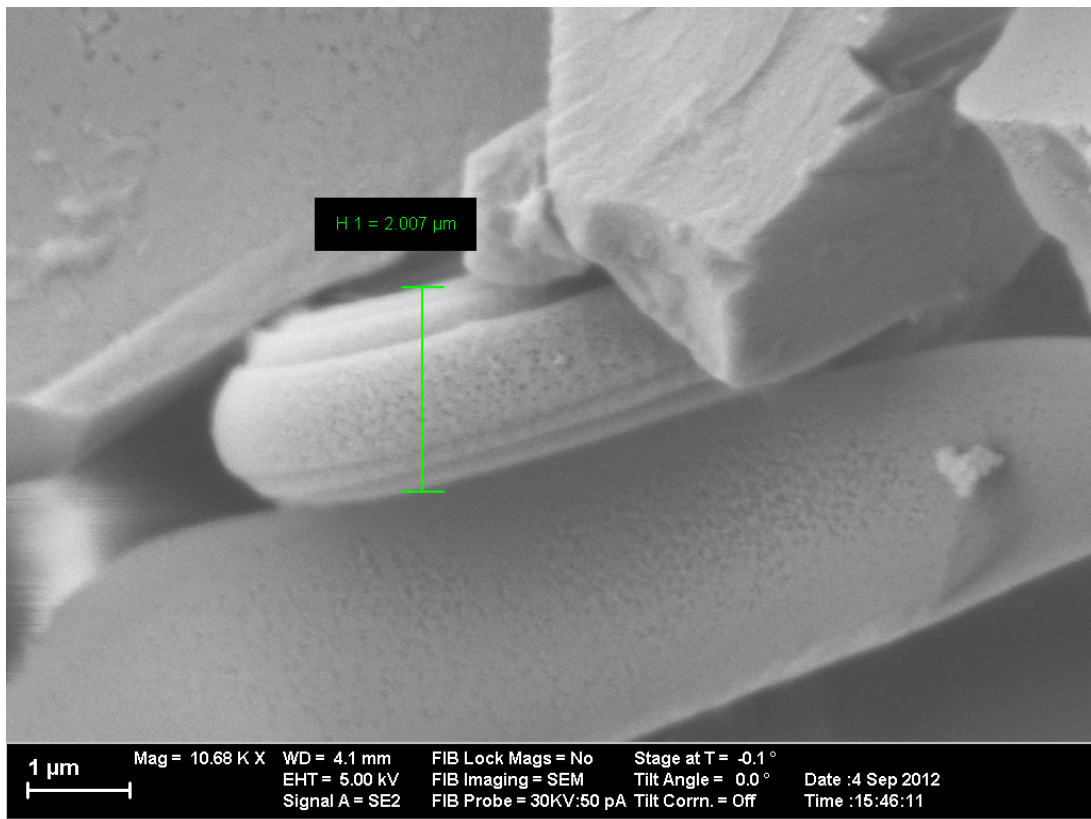


Abbildung 4.4.: Ausmessung der Voxelbreite (376,7 nm) und der Überlappungsdifferenz der einzelnen Voxelringe (207,8 nm) der Erythrozytenmodelle



(a) Modell des Erythrozyten unter dem Elektronenmikroskop und seine Größenausmessung



(b) Außenrandausmessung eines Erythrozytenmodelles

Abbildung 4.5.: Verschiedene Ansichten und Ausmessungen der Erythrozytenmodelle unter dem Elektronenmikroskop

4.4. Vergleich der biologischen Erythrozyten mit dem Modell

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels sollen die Eigenschaften der biologischen Erythrozyten und ihrer Modelle noch einmal zusammengefasst und miteinander verglichen werden. Insbesondere werden hierbei die für die Lichtstreuung relevanten Eigenschaften genauer betrachtet und verglichen. Der für die Lichtstreuung relevante größte Durchmesser der Teilchen ist sowohl bei den Modellen als auch bei den biologischen Blutkörperchen vergleichbar. Zwar variiert dieser bei der künstlichen Herstellung der Erythrozyten zwischen $7,5\text{-}8\ \mu\text{m}$, jedoch ist der Durchmesser, welcher in der Natur zu finden ist, ebenfalls nicht konstant. Das gleiche gilt für die Randbreite und die innere Breite der roten Blutkörperchen. Zusätzlich unterscheidet sich die Dichte der Erythrozytenmodelle von der Dichte der biologischen Erythrozyten. In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Teilchen noch einmal dargestellt.

Tabelle 4.1.: Vergleich von biologischen Erythrozyten und deren mittels Zwei-Photonen-Lithografie hergestellten Modellen.

Definition	Erythrozyt	Erythrozytenmodell theoretisch	Erythrozytenmodell experimentell
Durchmesser	$7,82 \pm 0,62\ \mu\text{m}$	$7,5\text{-}8\ \mu\text{m}$	$7,2 \pm 0,4\ \mu\text{m}$
Höhe Rand	$2,58 \pm 0,27\ \mu\text{m}$	$2\ \mu\text{m}$	$2 \pm 0,1\ \mu\text{m}$
Höhe Innen	$0,81 \pm 0,35\ \mu\text{m}$	$1\ \mu\text{m}$	

5. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mit Zwei-Photonen-Laserlithografie Modelle biologischer Erythrozyten hergestellt, welche mit Hilfe eines Elektronenmikroskops charakterisiert wurden.

Es wurden diskrete dreidimensionale Daten in ein dreischichtiges Modell konvertiert. Aufgrund dieses Aufbaus wurde eine genaue Ausmessung der Voxelgröße des Lithografiesystems vorgenommen um die Genauigkeit der Form des Erythrozytenmodells zu gewährleisten. Die Erythrozyten wurden mit Hilfe eines Ultraschallbads von dem ursprünglich beschriebenen Glasplättchen abgelöst und für die Charakterisierung unter dem Elektronenmikroskop wieder auf ein Objektträger aufgebracht. Hierbei ergab sich die Problematik, dass nach dem Auftragen der Erythrozyten Verunreinigungen auf dem Objektträger zu finden waren, deren Ursache auf die Reaktion des zuerst verwendeten Isopropanols mit dem Fotolack zurückzuführen war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Genauigkeit der Form der Erythrozyten im Größenbereich der biologischen Erythrozyten liegt und die Modelle vom Trägermaterial gelöst werden können. Durch diese gute Übereinstimmung der Erythrozytenmodelle mit ihrem biologischen Pendant ist eine gute Grundlage für quantitative Vergleiche geschaffen. Weitere Optimierungen des Herstellungsprozesses und der Genauigkeit der Oberfläche der bereits hergestellten Erythrozytenmodelle, wären bei Fortsetzung dieser Arbeit sinnvoll. Zusätzlich sollten größere Mengen extrahiert werden um eine bessere Charakterisierung zu gewährleisten. Mit diesen Optimierungen wäre eine gute Grundlage für Lichtstreuexperimente geschaffen.

A. Literaturverzeichnis

- [1] MÜLLER, Alexander: *Lichtstreuung an Nanomaterialien*. http://www.meerholz.uni-koeln.de/.../SkriptLichtstreuung_A._Mueller.pdf. Version: 06.09.2012
- [2] *Forschungsgruppe Prof. Gompper*. <http://www.ihrs-biosoft.de/departments/gompper/>. Version: 06.09.2012
- [3] FISCHER, Joachim ; WEGENER, Martin: Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit. In: *Laser & Photonics Reviews* 23 (2012), März, S. 1–23
- [4] FISCHER, Joachim ; WEGENER, Martin: Three-dimensional direct laser writing inspired by stimulated-emission-depletion microscopy [Invited]. In: *Optical Materials Express* 1 (2011), August, S. 614
- [5] FISCHER, Joachim ; FREYMAN, Georg von ; WEGENER, Martin: The materials challenge in diffraction-unlimited direct-laser-writing optical lithography. In: *Advanced materials* 22 (2010), August, S. 3578–82
- [6] MARUO, Shoji ; NAKAMURA, Osamu ; KAWATA, Satoshi: Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. In: *Optics letters* 22 (1997), Januar, Nr. 2, S. 132–4
- [7] SCHIEBLER, Theodor-Heinrich ; KORF, Horst-Werner: *Anatomie*. 10. Auflag. Steinkopff Verlag, 2007. – ISBN 9783798517707
- [8] TUCHIN, Valery-Viktorovich: *Handbook of Biomedical Diagnostics*. SPIE-The International Society for Optical Engineering, 2002. – ISBN 0–8194–4238–0
- [9] VENNEKEL, Maike: *Dynamische Lichtstreuung an Erythrozyten*. 2012
- [10] ALBERS, Jan: *Grundlagen integrierter Schaltungen*. 2. Auflage. Hanser Verlag, 2010. – ISBN 978–3–446–42232–2
- [11] *nanoscribe GmbH*. <http://www.nanoscribe.de/>. Version: 06.09.2012
- [12] DEMTRÖDER, Wolfgang: 5. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – ISBN 9783540792949
- [13] *Sicherheitsdatenblatt Isopropanol*. www.hedinger.de/uploads/media/Isopropanol_v014.pdf. Version: 06.09.2012

B. Abbildungsverzeichnis

2.1. Biologische Erythrozyten	6
2.2. Fotolacke der Zwei-Photonen-Lithografie	8
2.3. Reaktionsschema	8
2.4. Jablonski Diagramm zur Zwei-Photonen-Lithografie	9
2.5. Voxel des Laserstrahls	12
3.1. Aufbau des Lithografiesystems der Firma <i>nanoscribe</i>	14
3.2. Aufbau der Komponenten des Laserlithografiesystem	16
3.3. Linienbreite	17
3.4. Netzform	18
3.5. Daten mit B-Spline	19
3.6. Ausmessung verschiedener Erythrozyten	21
3.7. Erythrozytenmodelle Luft und Ölobjektiv	22
4.1. Aneinander geschriebene Erythrozyten	26
4.2. Verunreinigungen auf der Probe mit Erythrozyten	27
4.3. Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop	29
4.4. Voxelausmessung an einem Erythrozytenmodell	29
4.5. Erythrozyten unter dem Elektronenmikroskop	30

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich so tatkräftig bei meiner Bachelorarbeit unterstützt haben.

Dabei sei besonders Sven Deutschländer erwähnt, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit immer neuen Anregungen weiter half. Auch hat er mir bei den Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop sehr geholfen. Ein Dankeschön geht auch an David Polster, für die Unterstützung bei auftauchenden Fragen und die kritischen Anmerkungen zu meiner Arbeit. Ebenfalls möchte ich Maike Vennekel für den interessanten Austausch in den Pausen und der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Maret für das gute Arbeitsumfeld danken.

Auch danke ich Manuel Nescher und meiner Schwester Corinna Barth für die Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Prof. Maret bedanken, der diese Arbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglicht und unterstützt hat.