

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik

*ENTWICKLUNG UND EVALUIERUNG EINES
MIKROTITERPLATTEN-BASIERTEN
ANALYSESYSTEMS FÜR DIE
ELEKTROCHEMISCHE MIKROPHYSIOMETRIE*

Walter Wirths

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Thomas Eibert

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernhard Wolf
2. Prof. Dr.-Ing. Ralf Brederlow

Die Dissertation wurde am 14.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 10.11.2021 angenommen.

WIDMUNG

Für Lola, Maia und Sarah

Die nützlichste Form der Intelligenz ist Empathie.

ABSTRACT

Cells are the building blocks of life. The research and understanding of cells are therefore crucial for solving a multitude of scientific challenges.

The aim of this work is the development of a multiparametric microphysiometer with which the metabolic and morphological features of cells can be studied. To this end, a diverse set of electrochemical sensors will be integrated into a 24-well microplate.

Several systems for studying cell respiration, cell acidification and cell adhesion have already been described in the literature, as well as the corresponding sensors for following each process. Multiparametric methods for sensor instrumentation are however less well-developed.

Based on theoretical considerations and practice-orientated problem analysis, a microphysiometer was developed with which extracellular acidification rate, cellular oxygen consumption and cell adhesion in each well of a 24-well microplate can be measured with high resolution. This system consists of measuring electronics, microplates with integrated sensors and electrical contacts.

Different potential types of sensor interferences as well as the resolution capacity of the microphysiometers were investigated experimentally. Based on these results, it could be shown that high-resolution measurements are indeed possible with low interference. These findings may thus allow for the development of microphysiometers with which even the smallest cell changes can be detected.

The further development of these findings into a user-orientated product would require the careful consideration of the application environment, the end user and the relevant regulations.

ZUSAMMENFASSUNG

Zellen sind die Bausteine des Lebens. Sie zu verstehen und zu erforschen ist unerlässlich, um eine Vielzahl von wissenschaftlichen Problemstellungen zu lösen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines multiparametrischen Mikrophysiometers, mit dem die metabolischen und morphologischen Merkmale von Zellen untersucht werden können. Zu diesem Zweck sollen diverse elektrochemische Sensoren in eine 24-fache Mikrotiterplatte integriert werden.

Zahlreiche Systeme zur Untersuchung von Zellatmung, zellulärer Ansäuerung und Zelladhäsion sowie die dafür geeigneten Sensoren wurden in der Literatur beschrieben. Weniger häufig wurden Methoden für die multiparametrische Instrumentierung publiziert.

Basierend auf theoretischen Betrachtungen und einer praxisnahen Problemanalyse wurde ein Mikrophysiometer entwickelt, mittels dessen die extrazelluläre Ansäuerungsrate, der zelluläre Sauerstoffverbrauch und die Zelladhäsion hochauflösend in 24 Kavitäten einer Mikrotiterplatte gemessen werden kann. Das System setzt sich aus Messelektronik, sensorbestückter Mikrotiterplatte und elektrischer Kontaktierung zusammen.

Mögliche Sensorinterferenzen und das Auflösungsvermögen des Mikrophysiometers wurden in Experimenten untersucht. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass hochauflösende Messungen möglich und die Interferenzen gering sind. Mit den erzielten Resultaten können bessere Mikrophysiometer entwickelt werden, die kleinste Zustandsänderungen der Zellen detektieren können.

Für die Weiterentwicklung dieser Resultate zu einem nutzerorientierten Produkt müssen das konkrete Anwendungsumfeld, der Endanwender und die entsprechenden Regulatorien sorgfältig berücksichtigt werden.

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Wolf für die gute Betreuung und die ausgezeichneten Rahmenbedingungen, die er für meine Promotion geschaffen hat. Die Jahre an seinem Lehrstuhl haben meine Art zu denken und Probleme zu bewältigen, nachhaltig geprägt, wofür ich stets dankbar sein werde.

Ganz besonders danke ich Dr. Joachim Wiest. Er war mir in guten wie in schlechten Zeiten stets ein hervorragender Mentor und Freund.

Bei Ingrid Franz, Dr. Martin Brischwein und Dr. Helmut Grothe bedanke ich mich für ihr stets offenes Ohr und für ihre guten Ratschläge.

Margarete Remm gilt besonderer Dank für die Herstellung von zahlreichen chemischen Lösungen und unzähligen Sensorchips. Die Zusammenarbeit mit ihr war mir zu jeder Zeit eine Herzensfreude.

Ich danke Alfred Michelfelder für seine Unterstützung und die gute Zeit im Zellkulturlabor.

Bei Wolfgang Ruppert und Adriano Giorno bedanke ich mich für die Anfertigung meiner Prototypen.

Der Firma Erwin Quarder Systemtechnik GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung, mit der die folienbasierten Sensoren realisiert werden konnten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Studenten Marina Milutinović, Lana Josipović, Markus Hefe, Naoya Oku, Egor Zaharov, Martin Schmengler und Murat Ökke für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit und die ausgezeichneten Ergebnisse.

Für einen kreativen und wertvollen Austausch bedanke ich mich bei Dr. Johannes Clauss, Dr. Florian Ilchmann, Dr. Tomos Harris, Leo Birkner, Christopher Kirchmeier und den übrigen Lehrstuhlmitarbeitern sowie den Kollegen aus der ehemaligen Karlstraße.

Meiner Familie danke ich für ihr Verständnis, das sie mir in den vergangenen arbeitsintensiven Jahren entgegengebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Schwester Laura Wirths für das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie meiner Ehefrau Sarah Wirths dafür, dass sie mir stets den Rücken freigehalten hat. Ohne ihre Hilfe hätte ich niemals die Zeit gefunden, mein Buch zu vollenden.

INHALT

1	EINLEITUNG	1
1.1	RELEVANZ ZELLBASIERTER TESTSYSTEME	1
1.2	PROBLEME EINER REIN MOLEKULARBIOLOGISCHEN BETRACHTUNG	2
1.2.1	<i>Das zentrale Dogma der Molekularbiologie</i>	3
1.2.2	<i>Einflussfaktoren auf den Phänotyp einer Zelle</i>	4
1.3	ZELLEN ALS DYNAMISCHE SYSTEME	6
1.4	BEDEUTUNG DES METABOLISMUS FÜR ZELLBASIERTE SENSORIK UND DIE MIKROPHYSIOMETRIE	7
1.5	EINSATZMÖGLICHKEITEN VON ZELLBASIERTEN TESTSYSTEMEN	9
1.5.1	<i>Pharmazeutisches Wirkstoff-Screening</i>	10
1.5.2	<i>Toxizitätsbestimmung</i>	10
1.5.3	<i>Personalisierte Chemosensitivitätstests</i>	11
1.6	WISSENSCHAFTLICHE PROBLEMSTELLUNG	11
2	ZIELE DER ARBEIT	13
2.1	MULTIPARAMETRISCHE MESSUNG PHYSIOLOGISCHER SIGNALE MIT ELEKTROCHEMISCHEN SENSOREN	13
2.2	INTEGRATION DER ELEKTROCHEMISCHEN MIKROTITERPLATTE IN DAS LABOR	15
2.3	BEWERTUNG DER ERZIELTEN ERGEBNISSE	15
3	STAND DER WISSENSCHAFT UND TECHNIK	16
3.1	BIOSENSOREN	16
3.2	ENZYMBASIERTE SENSOREN	17
3.3	ZELLEN ALS BIOSENSOREN	18
3.3.1	<i>Vergleich zwischen Enzym- und Zellsensoren</i>	18
3.3.2	<i>Zellsensoren mit amperometrischer Detektion</i>	19
3.3.3	<i>Zellsensoren mit potentiometrischer Detektion</i>	20
3.4	FUNKTIONALE ZELLANALYSE	21
3.4.1	<i>Abgrenzung zwischen Biosensor, zellbasiertem Sensor und zellbasiertem Assay</i>	21
3.4.2	<i>Vorteile der markierungsfreien Analyse</i>	22
3.4.3	<i>Methoden der markierungsfreien Zellanalytik</i>	23
3.4.4	<i>Ausgewählte Anwendungen der markierungsfreien Zellanalytik</i>	23
3.5	MESSMETHODEN, SYSTEME UND SENSOREN FÜR DIE MARKIERUNGSFREIE ZELLANALYTIK	25
3.5.1	<i>Messung der Zellatmung</i>	25
3.5.2	<i>Messung der Glykolyse und der zellulären Ansäuerung</i>	28
3.5.3	<i>Messung der Zelladhäsion</i>	33

3.5.4	<i>Multiparametrische Messung</i>	41
3.5.5	<i>Kommerzielle Messsysteme</i>	50
3.5.6	<i>Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe</i>	53
3.6	ELEKTROCHEMISCHE SENSORIK.....	60
3.6.1	<i>pH-Sensoren</i>	60
3.6.2	<i>Sauerstoffsensoren</i>	72
3.6.3	<i>Referenzelektroden</i>	78
3.7	ISOLIERUNG UND VERGUSS VON SENSORZULEITUNGEN.....	81
3.8	INSTRUMENTIERUNG ELEKTROCHEMISCHER SENSOREN.....	84
3.8.1	<i>Potentiometrie</i>	84
3.8.2	<i>Amperometrie</i>	85
3.8.3	<i>Potentiostatenschaltungen</i>	86
3.8.4	<i>Impedimetrie</i>	92
3.8.5	<i>Instrumentierung bei multiparametrischer Messung</i>	99
4	ENTWICKLUNG DES MIKROTITERPLATTEN-BASIERTEN MIKROPHYSIOMETERS	104
4.1	THEORETISCHE BETRACHTUNG DER WECHSELWIRKUNG ELEKTROCHEMISCHER SENSOREN.....	104
4.1.1	<i>Grundlagen und Modellbeschreibung</i>	104
4.1.2	<i>Wechselwirkungen zwischen elektrochemischen Sensoren</i>	106
4.1.3	<i>Reduktion der elektrischen Wechselwirkung</i>	107
4.1.4	<i>Schaltungsentwurf für Mehrsensorsysteme</i>	108
4.2	PROBLEMANALYSE.....	115
4.2.1	<i>Messsystem</i>	115
4.2.2	<i>Sensorik</i>	119
4.2.3	<i>Sensorintegration</i>	122
4.2.4	<i>Mikrofluidik</i>	124
4.3	REALISIERUNG DES GESAMTSYSTEMS.....	125
4.3.1	<i>Gesamtkonzept</i>	125
4.3.2	<i>Messelektronik</i>	127
4.3.3	<i>Soft- und Firmware</i>	138
4.3.4	<i>Sensorsubstrat und Metallisierung</i>	140
4.3.5	<i>Sauerstoffsensor</i>	144
4.3.6	<i>pH-Elektrode</i>	146
4.3.7	<i>Referenzelektrode</i>	151
4.3.8	<i>Impedimetrischer Sensor für ECIS</i>	153
4.3.9	<i>Sensorintegration in eine Mikrotiterplatte</i>	154
4.3.10	<i>Kontakt zwischen Elektronik und eMTP</i>	157
5	AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG VON VERSUCHEN	164
5.1	UNTERSUCHUNG DER ISOLATIONSSCHICHT.....	164
5.2	MESSUNG DES GELÖSTEN SAUERSTOFFS.....	165

5.3	MESSUNG DES pH-WERTES.....	168
5.4	BIOKOMPATIBILITÄT DER REFERENZELEKTRODE	170
5.5	IMPEDANZMESSUNG	170
5.6	MESSUNG DES STROMVERBRAUCHS	172
5.7	UNTERSUCHUNG DER SENSORINTERFERENZEN BEI MULTIPARAMETRISCHER MESSUNG	172
5.8	ZELLKULTURVERSUCHE	173
6	VERSUCHSERGEBNISSE	176
6.1	UNTERSUCHUNG DER ISOLATIONSSCHICHT.....	176
6.1.1	<i>Vorversuche</i>	176
6.1.2	<i>Isolation mit SU-8 3000</i>	176
6.1.3	<i>Isolation mit NPR-80</i>	179
6.2	MESSUNG DES GELÖSTEN SAUERSTOFFS	181
6.2.1	<i>Definition von Sensitivität und Streuung</i>	181
6.2.2	<i>Vergleich zwischen den Sauerstoffsensoren auf Glas- und Foliensubstrat</i>	181
6.2.3	<i>Einfluss des Hydrogels Hydromed™ D4</i>	184
6.3	MESSUNG DES pH-WERTES.....	189
6.4	ZYTOKOMPATIBILITÄT DER REFERENZELEKTRODE	193
6.5	IMPEDANZMESSUNG	194
6.5.1	<i>Stabilität und Drift</i>	196
6.5.2	<i>Sensitivität und Genauigkeit des Impedanzsensors</i>	197
6.6	MESSUNG DES STROMVERBRAUCHS	201
6.7	UNTERSUCHUNG DER SENSORINTERFERENZEN BEI MULTIPARAMETRISCHER MESSUNG	201
6.7.1	<i>Einfluss der Sauerstoffmessung</i>	201
6.7.2	<i>Einfluss der Impedanzmessung</i>	204
6.8	ZELLKULTURVERSUCHE	206
6.8.1	<i>Messung des extrazellulären pH-Wertes</i>	206
6.8.2	<i>Bestimmung der extrazellulären Ansäuerungsrate</i>	212
6.8.3	<i>Messung der Zellatmung</i>	214
6.8.4	<i>ECIS</i>	218
7	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	223
7.1	MULTIPARAMETRISCHE MESSUNG IN EINER MIKROTITERPLATTE.....	223
7.2	WEITERENTWICKLUNG DER SENSORTECHNOLOGIE	224
7.2.1	<i>Iridiumoxidbasierter pH-Sensor</i>	225
7.2.2	<i>Iridiumoxidbasierte Referenzelektrode</i>	226
7.2.3	<i>Sauerstoffsensor</i>	227
7.2.4	<i>Impedanzsensor</i>	229
7.2.5	<i>Interferenz zwischen den Sensoren</i>	231
7.3	INTEGRATION DER SENSOREN IN DIE EMTP	231
7.3.1	<i>Isolierung und Verguss der Sensorzuleitungen</i>	231

7.3.2	<i>Elektrische Kontaktierung der Sensoren</i>	233
7.3.3	<i>Zytokompatibilität</i>	234
7.4	MESSELEKTRONIK.....	234
7.4.1	<i>Realisierung der multiparametrischen Messung</i>	234
7.4.2	<i>Reduktion von Störungen und Rauschen</i>	235
7.4.3	<i>Stromversorgung</i>	237
7.5	INTEGRATION DER EMTP IN DAS LABOR	237
7.5.1	<i>Integration des Messsystems in Liquid-Handling-Systeme</i>	237
7.5.2	<i>Austausch des Messmediums in der Zellkulturkammer</i>	238
7.5.3	<i>Einfluss der Messumgebung</i>	239
7.6	BEWERTUNG UND VERGLEICH DER ERZIELTEN ERGEBNISSE.....	240
7.7	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER EMTP ALS ZELL-BASIERTES ASSAY FÜR EIN MODERNES LABOR	243
7.7.1	<i>Aktueller Bedarf an zellbasierten Tests</i>	243
7.7.2	<i>Vorteile und Möglichkeiten einer elektrochemischen Mikrotiterplatte</i>	244
7.7.3	<i>Ökologische und ethische Betrachtung von Zellkultur und Einwegsensoren</i>	245
8	AUSBLICK	248
8.1	WEITERENTWICKLUNG DES MESSSYSTEMS.....	248
8.1.1	<i>Integration zusätzlicher Temperatursensoren</i>	248
8.1.2	<i>Erweiterung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte</i>	248
8.1.3	<i>Schutz der Elektronik vor dem Zellkulturmedium</i>	249
8.1.4	<i>Kabelloser Betrieb des Messsystems</i>	249
8.2	WEITERENTWICKLUNG DER EMTP.....	250
8.3	SCHNITTSTELLE ZUM BENUTZER	251
8.4	ENTWICKLUNG EINES ZUVERLÄSSIGEN GESAMTSYSTEMS	252
9	LITERATURVERZEICHNIS	254
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	272
11	ANHÄNGE	287
	ANHANG 1: SCHALTPLÄNE	288
	ANHANG 2: ZEICHNUNG DER SPANNVORRICHTUNG	298

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Alternating Current
AE	Arbeitselektrode
AFE	Analoges Front-End
ATP	Adenosintriphosphat
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
DC	Direct Current
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECAR	Extra Cellular Acidification Rate
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
eMTP	Elektrochemische Mikrotiterplatte
EMV	Elektromagnetische Verträglichkeit
ESD	Electrostatic Discharge
FEP	Fluorethylenpropylen
FET	Field-Effect Transistor
FFT	Fast Fourier Transform
GBP	Gain–Bandwidth Product
GE	Gegenelektrode
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IDA	Interdigitated Array
IDES	Interdigitated Electrode Structures
IMR	Intelligent Microplate Reader
iMWP	Intelligent Multiwell Plate
ISFET	Ionenselektiver Feldeffekttransistor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

LAPS	Light-addressable Potentiometric Sensor
MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor
MRK	Mikroreaktionskammer
OCP	Open Circuit Potential
OCR	Oxygen Consumption Rate
OPV	Operationsverstärker
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCB	Printed Circuit Board
PDMS	Polydimethylsiloxan
pHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylate
PP	Polypropylen
RE	Referenzelektrode
RMS	Root Mean Square
RNS	Ribonukleinsäure
SNR	Signal-to-Noise Ratio
SPICE	Simulation Program with Integrated Circuit Emphasis
USB	Universal Serial Bus

1 EINLEITUNG

1.1 Relevanz zellbasierter Testsysteme

Menschen, Tiere und Pflanzen bestehen aus einer unvorstellbar großen Zahl an kleinsten lebendigen Untereinheiten, den Zellen. Geschützt von einer Membran, beinhalten Zellen ein komplexes Netzwerk, das es ihnen ermöglicht, Energie zu wandeln, verschiedene Stoffe ab- oder aufzubauen, Information zu speichern und zu kommunizieren. All diese Fähigkeiten wurden im Laufe eines über zwei Milliarden Jahre langen evolutionären Prozesses entwickelt und perfektioniert.

Wie ist eine Zelle in der Lage, diese komplexen Aufgaben zu verrichten? Auf das Wesentlichste reduziert, sind hierfür zwei Mechanismen verantwortlich. Der Erste ist ein chemischer Informationsspeicher, die DNS (Desoxyribonukleinsäure), in dem die Zelle Regularien und Baupläne für eine sehr große Anzahl an organischen Substanzen hinterlegt hat. Diese Substanzen sind so geartet, dass sie physikalisch und chemisch miteinander oder mit zellfremden Stoffen interagieren können. Diese Interaktion ist der zweite Mechanismus. Um zu verstehen, wie eine Zelle funktioniert, reicht es nicht aus, ihren genetischen Code zu kennen. Entscheidend für das Verhalten ist vielmehr ein hochkomplexes Netzwerk aus Interaktionen, von denen nur ein kleiner Teil ausreichend erforscht ist.

Die Entstehung vieler Krankheiten ist eng an das Verhalten von gewissen Zellverbänden oder einzelnen Zellen geknüpft. Ein Beispiel ist die Entstehung von bösartigen Tumoren. Diese Krankheit, die auch Krebs genannt wird, entsteht durch ein Fehlverhalten von einer oder mehrerer Zellen. Die betroffenen Zellen funktionieren nicht mehr zum Wohle des eigenen

1.2 Probleme einer rein molekularbiologischen Betrachtung

Organismus und fallen in ein egoistisches Verhaltensmuster, in dem sie sich unkontrolliert vermehren und ausbreiten.

Um Krankheiten wie Krebs nachhaltig zu behandeln oder ihre Entstehung gar zu verhindern, ist es wichtig, die Ursachen und Mechanismen auf zellulärer Ebene zu verstehen. Seit der Erfindung des Mikroskops wurden unzählige analytische Methoden und Geräte entwickelt, um den Aufbau und die Funktion von Zellen besser zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit markierungsfreien (label-free) Untersuchungen an Zellen. Diese besondere Klasse der Analyse zeichnet sich dadurch aus, dass keine fremden oder die Zellen beeinflussenden Substanzen zugegeben werden müssen. Solche neuartigen Testsysteme können dabei helfen, neue Erkenntnisse in der Zellbiologie zu erlangen. Sie können aber auch ein Ausgangspunkt für neue Therapieformen sein, wie in Abschnitt 1.5 anhand eines Beispiels gezeigt wird.

1.2 Probleme einer rein molekularbiologischen Betrachtung

Die DNS einer Zelle speichert Informationen, die letzten Endes Baupläne für organische Makromoleküle sind. Zusätzlich können die hinterlegten Informationen regulieren, wann und in welcher Menge diese Moleküle hergestellt oder auch zur Fehlerkorrektur verwendet werden.

Etwas detaillierter betrachtet, ist die DNS aus einem sequenziellen Code zusammengesetzt, der aus vier Zeichen besteht. Physikalisch ist die DNS eine lange Aneinanderreihung von vier unterschiedlichen Nukleinsäuren. Diese sequenzielle Information wird verwendet, um RNS (Ribonukleinsäure) zu generieren, die ebenfalls eine sequenzielle Information enthält. Dieser Vorgang wird Transkription genannt. An sogenannten Ribosomen werden mit Hilfe der RNS Proteine erzeugt, welche die Hauptfunktionsträger in der Zelle sind. Dies wird als Translation bezeichnet [1].

Gemäß dem molekularbiologischen Ansatz liefert die Entschlüsselung der DNS den Bauplan der Proteine, die von einer Zelle gebildet werden können. Um die Funktion der jeweiligen Proteine besser zu verstehen, werden Proteininteraktionen intensiv erforscht. Selten wird hierbei jedoch beachtet, wie groß die Bedeutung der zellulären Struktur und ihres dynamischen Verhaltens ist. Dumont und Pécasse zeigen in ihrer Arbeit [2], dass unter experimentellen Bedingungen unrealistisch viele Proteininteraktionen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse führen zu der in Abbildung 1 gezeigten Übersicht, einem hochkomplexen Netzwerk an Beeinflussungen und Interferenzen.

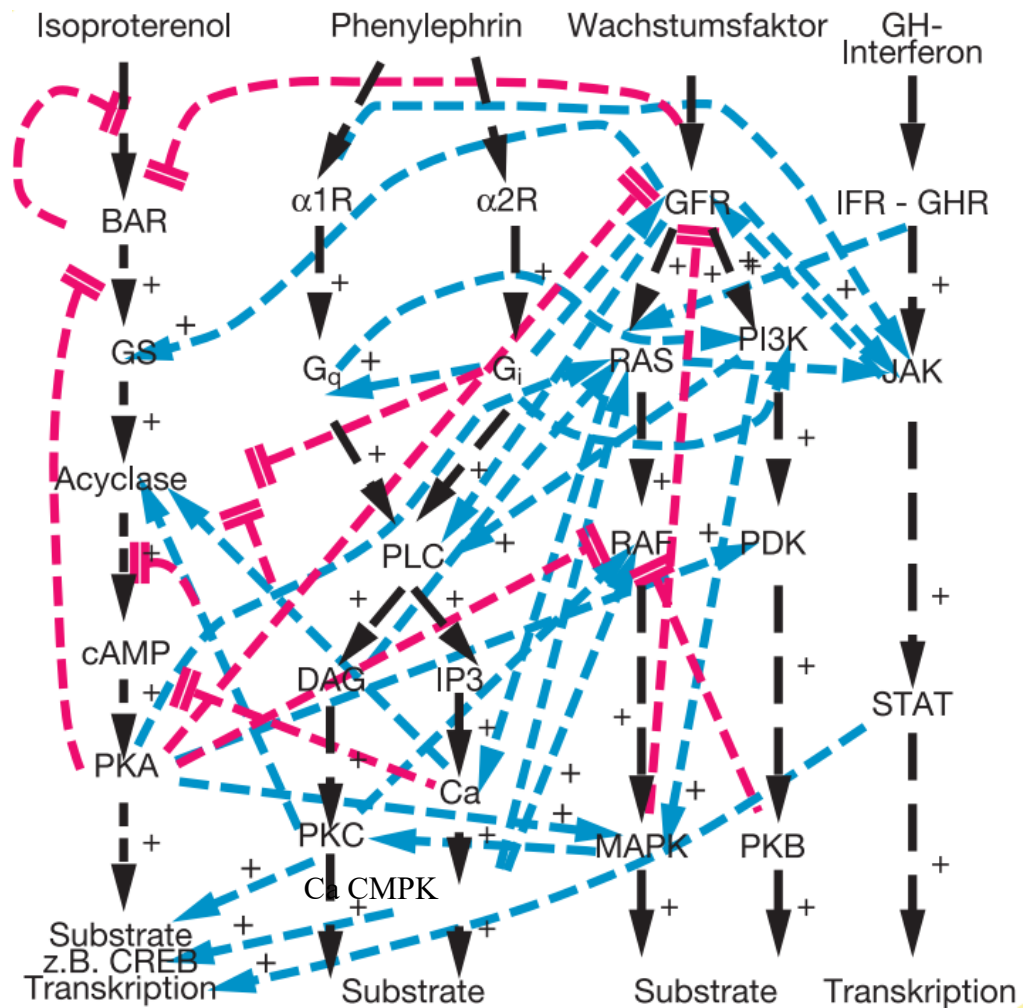


Abbildung 1: Übersicht der Interaktionen zwischen fünf verschiedenen zellulären Signalkaskaden, die in einem Zeitraum von zwei Jahren publiziert wurden. Nachgeruckt aus [2], Copyright (2001), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. Übersetzt von [3].

Viele dieser Interaktionen sind in natürlicher zellulärer Umgebung nicht relevant, da die betreffenden Stoffe räumlich getrennt vorliegen. Zum Nachweis der Wechselwirkungen werden Proteine im experimentellen Rahmen oft um ein Hundertfaches überexprimiert. Das Verhalten von Proteinen bei so hohen Konzentrationen hat dann nichts mehr mit der natürlichen Situation in der Zelle zu tun [2].

Dies führt zu der Überlegung, dass es durchaus wichtig sein kann, eine Zelle als Ganzes zu betrachten und auf ihre strukturellen und dynamischen Eigenschaften Rücksicht zu nehmen.

1.2.1 Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Es wurde bereits gezeigt, inwiefern die sequenzielle Information der DNS zur Herstellung verschiedener Proteine beiträgt. Dieses Prinzip der Informationsübertragung wurde im Jahre

1.2 Probleme einer rein molekularbiologischen Betrachtung

1958 von Francis Crick unter der Bezeichnung „Zentrales Dogma der Molekularbiologie“ veröffentlicht. Ein Kernaspekt dieses „zentralen Dogmas“ sagt aus, dass die sequenzielle Information eines Proteins nicht zurück zur RNS oder DNS übertragen werden kann [4].

Leider wurde die Bedeutung des Wortes „sequenziell“ in vielen Interpretationen von Cricks Arbeit vernachlässigt oder gar ignoriert. Viele Molekularbiologen sahen den Informationsfluss in der Zelle als eine Einbahnstraße, die bei der DNS beginnt und bei den Proteinen endet. Sie betrachteten die DNS als wichtigste Steuerzentrale für das Verhalten der Zelle. Die Hoffnung vieler Forscher war, dass die Entschlüsselung der DNS alle Geheimnisse der Zelle offenlegt. Diese Hoffnung wurde jedoch trotz eines immensen wissenschaftlichen Einsatzes nur ansatzweise erfüllt.

So kann das Genom (der genetische Code) einer Tumorzelle wichtige Informationen über die Entstehung von Krebs oder die Diagnose mittels Tumormarkern liefern. Doch reicht die Kenntnis über das Genom und dessen Veränderungen (z. B. Mutationen) nicht aus, um eine individuelle Therapiestrategie abzuleiten oder die Wirksamkeit neuer Therapeutika vorauszusagen.

1.2.2 Einflussfaktoren auf den Phänotyp einer Zelle

Nicht nur der genetische Code, sondern auch das Umfeld einer Zelle bestimmen ihr Verhalten. Dies soll anhand folgender Analogiebetrachtung veranschaulicht werden: Jede Schneeflocke besteht chemisch gesehen aus gefrorenem Wasser, dennoch ist es fast unmöglich, zwei Schneeflocken zu finden, die einander gleichen. Die Hypothese, dass jede Schneeflocke einzigartig ist, stellte Wilson A. Bentley im Jahre 1922 auf [5] und belegte seine These in beeindruckender Weise mit unzähligen Aufnahmen. Abbildung 2 zeigt einen Auszug aus Bentleys Fotografien und demonstriert die Einzigartigkeit der einzelnen Kristalle.

Ähnlich wie Schneekristalle, die alle aus einer Aneinanderreihung von chemisch identischen H₂O-Molekülen bestehen, können sich auch Zellen, die dasselbe Erbgut haben, völlig unterschiedlich verhalten. Dies wird am Beispiel von Stammzellen deutlich: Sie können in Abhängigkeit von externen Faktoren in völlig unterschiedliche Zelltypen differenzieren. Nichtsequenzielle Informationen müssen in biologischen Systemen deswegen eine ebenso entscheidende Rolle spielen wie das Erbgut. Proteine können beispielsweise als Transkriptionsschalter dienen und steuern, welche RNA zu welchem Zeitpunkt erzeugt wird.

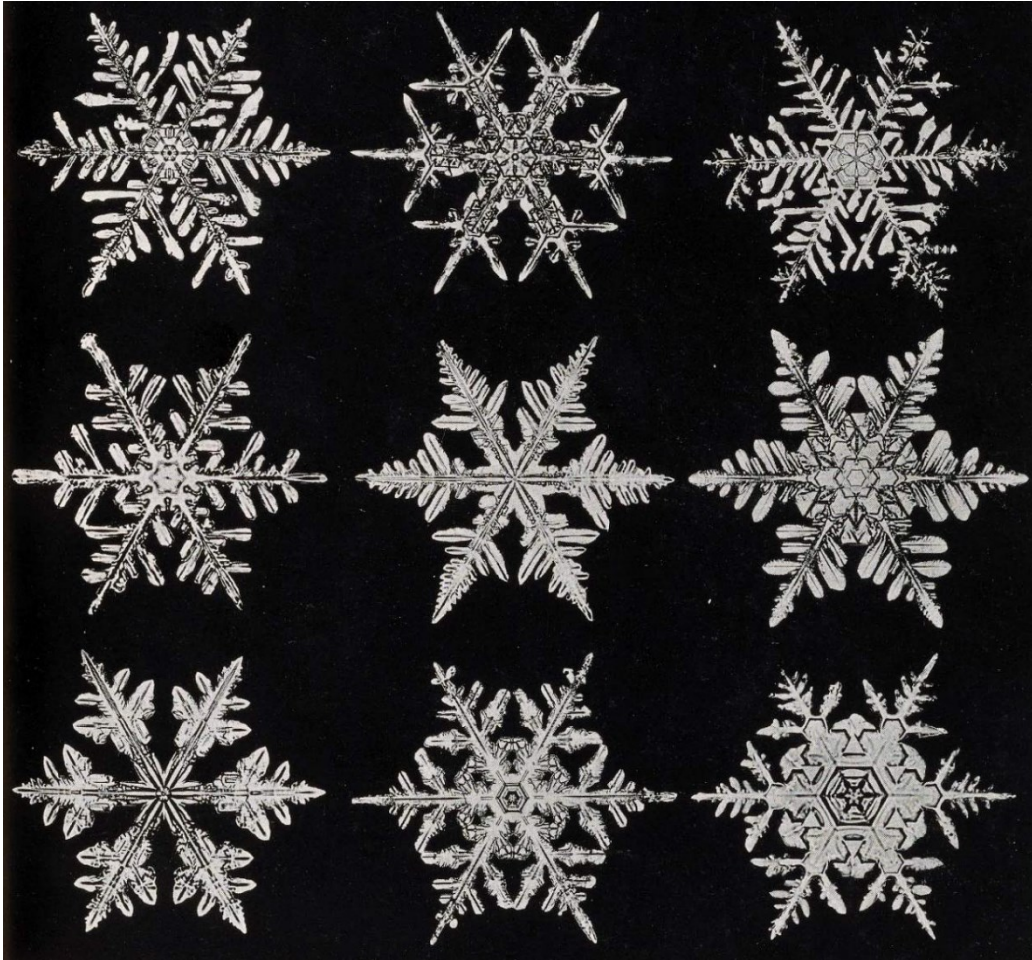


Abbildung 2: Schneeflocken bestehen alle aus demselben chemischen Element, dem Wasser und dennoch zeigen sie sehr unterschiedliche Formen [6].

Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass auch die Rolle des Stoffwechsels der Zelle bisher unterschätzt wurde:

Beispielsweise können ineffiziente Enzymreaktionen die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge haben, die wiederum Schäden in der DNS verursachen. Diese Schäden können zu Mutationen führen und somit eine Änderung der sequenziellen Information im Erbgut bewirken. Dieses Beispiel zeigt, dass auch der Metabolismus einer Zelle ihren Phänotyp und den ihrer Tochterzellen beeinflussen kann [7].

Der Phänotyp der Zelle wird aus einem komplexen Zusammenspiel unzähliger Moleküle bestimmt. So wie bei der Schneeflocke sind physikalische und chemische Selbstorganisationsmechanismen für Struktur und Verhalten der Zelle verantwortlich. Die große Anzahl an Molekülen erschwert die mikroskopische Betrachtung der zellinternen Vorgänge. Alternativ hierzu kann die Selbstorganisation der Zelle mit makroskopisch beobachtbaren Ordnungsparametern beschrieben werden [8]. Um beim anschaulichen Beispiel

1.3 Zellen als dynamische Systeme

der Schneeflocke zu bleiben: Über die zwei einfachen Ordnungsparameter Temperatur und Übersättigung ist es möglich, die Form der entstehenden Flocken in einem Nakaya-Diagramm vorherzusagen [9].

Wolf und Kraus haben die Prinzipien der Synergetik auf Zellen angewandt [10]. Sie konnten zeigen, dass Zellen einer Selbstorganisation unterliegen und sich somit durch Ordnungsparameter beschreiben lassen. Phasenübergänge (also eine Änderung dieser Ordnungsparameter) der Zelle können für Phänomene wie krebsartiges Wachstum verantwortlich sein. Diese Theorien sind auch die Grundlage für eine systemische Betrachtung der Zelle.

1.3 Zellen als dynamische Systeme

Zellen grenzen sich mit einer Membran von der Umwelt ab und sind in der Lage, selektiv auf externe Signale zu reagieren. Diese Eigenschaften legen nahe, dass Zellen als (stochastisch-)dynamische Systeme beschrieben werden können.

Eine solche Beschreibung kann vorteilhaft sein, da sie die komplexen molekularbiologischen Vorgänge in der Zelle in ein modellierbares System überführt. Konkreter gesprochen kann das Verhalten der Zelle als Blackbox modelliert werden. Ein solches Modell bedarf keiner Kenntnis über die zahlreichen zellinternen Vorgänge und ihrer unzähligen Interaktionen. Wolf und Kraus verdeutlichen dies, indem sie die systemische Beschreibung der Zelle mit einem „technischen“ Neuron vergleichen [10]. In Abbildung 3 werden die Analogien zwischen einer Zelle und einem künstlichen Neuron veranschaulicht.

Für einen Elektrotechniker lässt sich diese Situation gut am Beispiel eines OPV (Operationsverstärker) erklären. Moderne OPV sind intern aus vielen Transistoren aufgebaut. Der genaue Aufbau ist in den meisten Fällen nicht bekannt. Trotzdem ist es möglich, über eine geeignete Parameterliste das Verhalten des OPV so gut zu definieren, dass mit Schaltungssimulationstools, wie z. B. SPICE (Simulation Program with Integrated Circuit Emphasis), sein Verhalten sehr realitätsnah vorhergesagt werden kann.

Bei Zellen handelt es sich offensichtlich um Mehrgrößensysteme. Das bedeutet, eine Zelle reagiert auf verschiedene Eingangssignale mit verschiedenen Ausgangssignalen. Die Signale können chemische Moleküle oder auch physikalische Effekte (z. B. Temperatur oder Spannungsgradient) sein. Zwischen Ein- und Ausgang liegt ein komplexes und paralleles Signalverarbeitungsnetzwerk, das nichtlinear ist und eine hohe Verstärkung innerhalb der

Signalkaskaden aufweisen kann [11, 12]. Die Herausforderung liegt darin, Eingangssignale mit den Ausgängen eindeutig zu verknüpfen, ohne den genauen Aufbau der Signalketten zu kennen. Multiparametrische Sensorarrays sowie eine entsprechende Datenauswertung über Mustererkennungsalgorithmen [11] können eine Lösung liefern, die dem komplexen Verhalten eines biologischen Mehrgrößensystems gerecht wird.

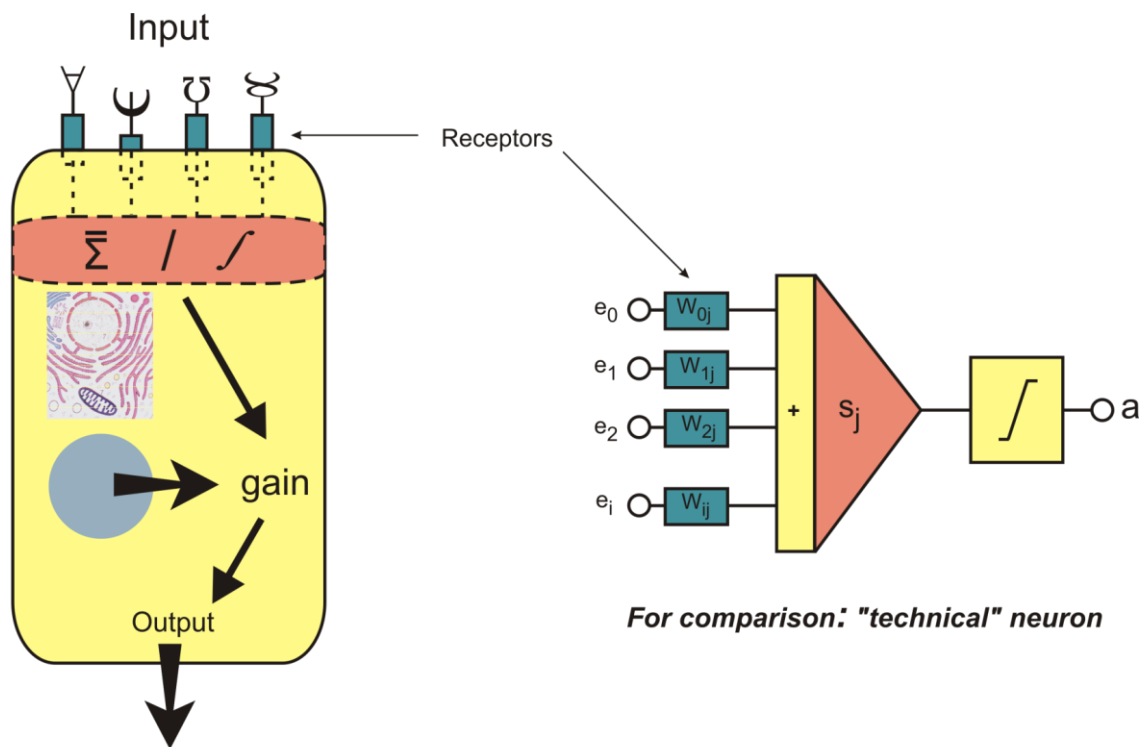


Abbildung 3: Ähnlich wie ein technisches System besitzt eine Zelle Eingänge für diverse Signale und kann auch über Ausgänge mit der Umgebung wechselwirken. Die interne Struktur kann sehr komplex sein, muss jedoch nicht bekannt sein, um das Verhalten der systemischen Zelle zu beschreiben [10].

1.4 Bedeutung des Metabolismus für zellbasierte Sensorik und die Mikrophysiometrie

Eine Besonderheit der Zelle ist die Fähigkeit, Komplexität in einer physikalischen Umgebung zu erschaffen, die kontinuierlich einen einfachen Grundzustand anstrebt. Zellen sind in der Lage, Reaktionen entgegen ihrer bevorzugten Reaktionsrichtung zu treiben. Dies wird als anaboler Stoffwechsel bezeichnet. Ein anderes Beispiel für einen ordnenden Prozess ist der Spannungsgradient (das sogenannte Transmembranpotential), den eine Zelle zwischen Zellinnerem und der Umgebung aufbauen und aufrechterhalten kann.

1.4 Bedeutung des Metabolismus für zellbasierte Sensorik und die Mikrophysiometrie

Die Gesetze der Thermodynamik besagen, dass solche energetisch ungünstigen Vorgänge nur möglich sind, wenn sie an einen entsprechend energetisch günstigen Vorgang gekoppelt sind. Neben der Photosynthese ist der Abbau von energiereichen Stoffen, wie der Glukose, ein wichtiger energieliefernder Prozess. Diese Umsetzung energiereicher Stoffe wird als kataboler Stoffwechsel bezeichnet.

Zur Kopplung von anabolem und katabolem Stoffwechsel verwendet die Zelle intern eine gemeinsame Energiewährung, die einige wenige Verbindungen zur effektiven Übertragung von Energie nutzt. Als eines der wichtigsten dieser Moleküle sei das Adenosintriphosphat (ATP) genannt. Die Erzeugung von energiereichem ATP geht mit katabolen (energieliefernden) Prozessen einher. Dieses ATP wird verwendet, um anabole Prozesse anzutreiben. Dies kann z. B. die Herstellung eines Proteins oder der Betrieb von Ionenpumpen in der Zellmembran sein.

Ein wichtiger Bestandteil dieses Stoffwechsels sind die zu einer besonderen Proteinklasse gehörenden Enzyme: Durch das Herabsetzen der chemischen Aktivierungsenergie machen sie Stoffwechselfvorgänge in der Zelle erst mit ausreichender Reaktionsgeschwindigkeit möglich.

Es wird klar, dass die energieliefernden metabolischen Prozesse eine zentrale Rolle spielen und wesentlich an den in Abschnitt 1.3 genannten signalverarbeitenden Prozessen beteiligt sein müssen. Sie liefern deswegen einen idealen Ansatzpunkt für die zellbasierte Sensorik.

Dies kann anhand eines Beispiels aus der Arbeit von Owicki und Parce [13] anschaulich gezeigt werden: Wird ein zellulärer Rezeptor, also ein Signaleingang, von einem entsprechenden Liganden aktiviert, kann – gemäß Abbildung 4 – eine Signalkaskade ausgelöst werden. Wenn einer der Signalpfade beispielsweise einen Kaliumkanal öffnet, strömt Kalium entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle. Die Regelungsmechanismen innerhalb der Zelle versuchen, die Kaliumkonzentration im Inneren aufrecht zu erhalten und aktivieren deswegen eine Ionenpumpe, die Kalium entgegen des Konzentrationsgradienten in die Zelle pumpt. Dieser Vorgang benötigt Energie, die in Form von ATP bereitgestellt werden muss.

Sinkt die ATP-Konzentration in der Zelle, setzen wiederum andere Regler ein, welche die Produktion von neuem ATP fördern. Für diesen Vorgang setzt die Zelle einen Energieträger, wie z. B. Glukose, um und generiert dabei (je nach möglichem Stoffwechselfad) Kohlenstoffdioxid oder Milchsäure. Beide Substanzen reagieren in wässriger Lösung sauer und können mit einem pH-Sensor detektiert werden.

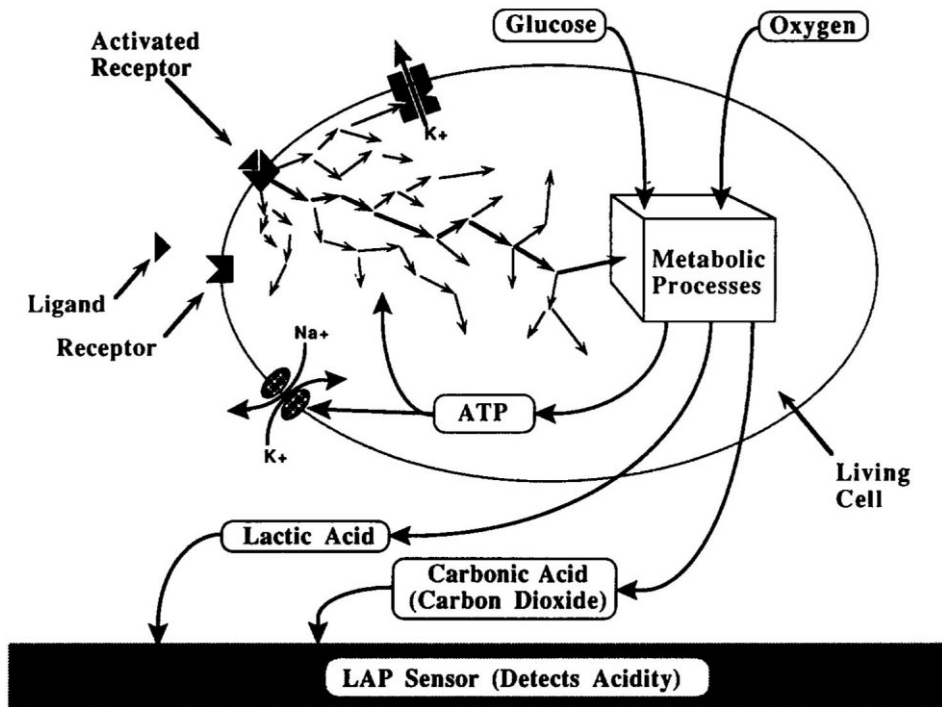


Abbildung 4: Die Aktivierung eines Membranrezeptors löst eine Signalkette aus. Die Energie für diesen Vorgang muss über metabolische Prozesse generiert werden. Die Produkte der metabolischen Prozesse können mit Sensoren detektiert werden; in diesem Fall handelt es sich um einen lichtadressierbaren pH-Sensor. Nachgedruckt aus [13], Copyright (1992), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

In der Tat ist es möglich, mit diesem Messparameter die Aktivierung vieler verschiedener Rezeptoren zu detektieren [13] oder auch Informationen zu Zellwachstum oder Toxizität eines Analyten zu erhalten [14]. Um die Spezifität zu erhöhen, kann es sinnvoll sein, mehrere metabolische Parameter, wie beispielsweise die Sauerstoffverbrauchsrate, hinzuzuziehen.

In der Literatur wird diese Messmethode als Mikrophysiometrie [15] bezeichnet und findet zunehmend Anwendung in Forschung und Industrie. Dies wird in Kapitel 3.5 ausführlich thematisiert.

1.5 Einsatzmöglichkeiten von zellbasierten Testsystemen

Aus Abschnitt 1.3 und 1.4 lässt sich ableiten, dass Zellen als Biosensoren betrachtet werden können. Sie können ein Signal so wandeln und verstärken, dass es mit verfügbaren Sensoren erfasst werden kann (vgl. Abschnitt 3.1). So kann z. B. eine Hefezelle zusammen mit einem pH-Sensor als Messsystem für Glukose fungieren.

Neben dieser rein analytischen Anwendung kann die Mikrophysiometrie auch als Testsystem für die zelluläre Reaktion auf einen bestimmten Stoff verwendet werden. Hierbei steht das

1.5 Einsatzmöglichkeiten von zellbasierten Testsystemen

dynamische Verhalten des Zellverbandes im Vordergrund und wird in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen gemessen. Die möglichen Anwendungsfelder sind vielfältig: Wirkstoff-Screening, Toxizitätstest und die Bestimmung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika sind häufig genannte Beispiele [3, 11, 13].

1.5.1 Pharmazeutisches Wirkstoff-Screening

Ein zellbasiertes Testsystem kann zeigen, ob eine Substanz eine biologische Wirkung auf eine bestimmte Zellart hat. Multiparametrische Sensoren decken mehrere mögliche Kanäle einer zellulären Systemantwort ab und können deswegen Ergebnisse liefern, ohne dass der Wirkmechanismus bekannt sein muss.

So lässt sich beispielsweise nach Wirkstoffen suchen, die an Rezeptoren einer bestimmten Zelllinie binden. Die Aktivierung eines Rezeptors spiegelt sich üblicherweise im zellulären Metabolismus wider [13]. Über die Messung des Metabolismus mit einem Mikrophysiometer ist das Screening nach neuen Pharmazeutika möglich, die an einen bestimmten Rezeptor binden sollen.

1.5.2 Toxizitätsbestimmung

Die meisten analytischen Methoden zur Bestimmung der Toxizität eines Stoffes sind auf chemische Marker angewiesen. Bei solchen Tests wird eine mit Wirkstoff behandelte Testgruppe nach einer festen Inkubationsdauer mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Diese Methoden liefern also nur zeitdiskrete Aussagen über den Zustand der betrachteten Zellen. Die Mikroskopie (ohne Fluoreszenzfarbstoffe) ist hier eine Ausnahme, aber sie ist zeitaufwändig und ist auf die Erfahrung des Benutzers angewiesen, um detaillierte Informationen zu liefern.

Die Mikrophysiometrie bietet durch die markerfreie Messung eine Möglichkeit der kontinuierlichen Analyse. Somit ist es möglich, Daten über die Wirkdynamik eines Wirkstoffes zu erhalten, Erholungseffekte nach Entzug des Stoffes zu untersuchen und Langzeiteffekte bei kontinuierlicher Exposition mit geringer Dosis zu untersuchen [16–18].

Mit multiparametrischen Sensoren wird es möglich, den Wirkmechanismus eines toxischen Stoffes zu untersuchen. So ist mit kombinierter Detektion von Sauerstoff und pH beispielsweise zu erkennen, ob die toxische Wirkung durch eine Blockade der Atmungskette bzw. durch Schädigung der Mitochondrien erfolgt.

1.5.3 Personalisierte Chemosensitivitätstests

Um Krebs effektiv behandeln zu können, müssen Tumore zuverlässig erkannt und richtig diagnostiziert werden. Hierfür wird meist ein histologischer Befund verwendet, der die Morphologie einer Tumorprobe bewertet. Wenn möglich werden auch andere Merkmale, z. B. Tumormarker, hinzugezogen. Aus diesen Daten kann ein Onkologe auf Basis seiner bisherigen Erfahrungen sowie allgemeiner Therapieleitlinien einen Therapieplan erarbeiten.

Das Erscheinungsbild eines Tumors ist jedoch nicht immer ein zuverlässiges Indiz für sein Verhalten bzw. die Therapierbarkeit. Es ist bekannt, dass Tumore bei verschiedenen Patienten unterschiedlich reagieren, obwohl sie aus derselben Gewebeart entstanden sind. Es ist auch nicht ungewöhnlich, dass trotz Behandlung mit der gleichen Chemotherapie nur ein Teil der Patienten darauf anspricht.

Personalisierte Therapieansätze könnten dieses Problem lösen, indem sie besser auf den individuellen Charakter von Tumorerkrankungen eingehen [19, 20]. Mikrophysiometer und andere Sensorsysteme, welche die Reaktion von Tumorzellen auf einen verabreichten Wirkstoff bestimmen, können für eine In-vitro-Prüfung von verschiedenen Therapiestrategien eingesetzt werden. Die aus solchen Tests gewonnenen Daten können dazu verwendet werden, die Therapie besser auf den Patienten abzustimmen oder neue Therapiemöglichkeiten zu testen.

1.6 Wissenschaftliche Problemstellung

Aus den vorhergehenden Kapiteln wird deutlich, dass Systeme für die Untersuchung der zellulären Physiologie in zahlreichen Einsatzgebieten Anwendung finden können. Vor allem durch die gleichzeitige Messung verschiedener Parameter mit elektrochemischen Sensoren kann ein wesentlicher Mehrwert an Information generiert werden.

In Kapitel 3.5 dieser Arbeit wird gezeigt, dass die elektrochemische Sensortechnologie für solche Testsysteme bereits intensiv untersucht wurde und durchaus als ausgereift bezeichnet werden kann. Dennoch gibt es einige ungelöste Probleme, die den praktischen Einsatz von Mikrophysiometern für Zellen behindern. So gestaltet sich die Integration von Sensoren in laborübliche Probehälter – wie Mikrotiterplatten – schwierig. Dies ist jedoch zwingend nötig, um in jedem Versuch einen hohen Probendurchsatz zu erreichen, die Benutzerfreundlichkeit zu erhöhen und den Einsatz in normalen Zellkulturlaboren zu erleichtern. Aus diesem Grund ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Mikrophysiometern ein Thema mit stetig zunehmender Relevanz.

1.6 Wissenschaftliche Problemstellung

Bei elektrochemischen Sensoren stellt die multiparametrische Erfassung in mehreren parallel betriebenen Probekammern eine besondere Herausforderung dar. Nur wenige Publikationen thematisieren die Entwicklung derartiger Messinstrumente.

In der vorliegenden Arbeit sollen neue Methoden beschrieben werden, die zur Realisierung von zellulären Testsystemen mit folgenden Eigenschaften führen:

- Multiparametrische Messung (Amperometrie, Potentiometrie, Impedimetrie)
- Erweiterbarkeit um zusätzliche Sensoren
- Messung des dynamischen Verhaltens in Echtzeit
- Markerfreie Messung (label-free)
- Schnelle Ansprechzeit
- Präzise und hochauflösende Messung
- Biokompatibilität
- Einfache Realisierung
- Integration in Mikrotiterplatten
- Gute Integrierbarkeit in ein Zellkulturlabor
- Automatisierter Testablauf

Die untersuchten Methoden werden mit Fokus auf elektrochemische Sensorprinzipien gewählt und in einem funktionalen Prototyp realisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden abschließend bewertet und mit dem bisherigen Stand der Technik sowie anderen Sensorprinzipien verglichen.

2 ZIELE DER ARBEIT

2.1 Multiparametrische Messung physiologischer Signale mit elektrochemischen Sensoren

Elektrochemische Messsysteme können für die Analyse von zellphysiologischen Vorgängen verwendet werden. Markierungsfreie (label-free) Methoden, wie die Mikrophysiometrie oder ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing, vgl. Abschnitt 3.5.3), bieten für die kontinuierliche Überwachung Vorteile, da sie die Zellen auch bei Langzeitversuchen nicht beeinträchtigen.

Die Kombination mehrerer Messparameter wird als „High-Content“-Analyse bezeichnet und liefert einen Mehrwert an Informationen in einem Experiment. Die Parallelisierung von Experimenten wird als „High-Throughput“ bezeichnet und reduziert die Anzahl der benötigten Experimente. In der Zellkulturforschung werden Mikrotiterplatten eingesetzt, um den Durchsatz zu erhöhen. Besonders interessant ist es, beide Ansätze zu kombinieren, beispielsweise durch die Integration verschiedener Sensoren in eine Mikrotiterplatte.

Ausgehend von dem aktuellen Stand der Technik beschäftigt sich diese Arbeit mit drei unterschiedlichen Aspekten:

1. Sensorentwicklung zur allgemeinen Verbesserung von Stabilität und Reproduzierbarkeit der eingesetzten Sensoren
2. Integration von elektrochemischen Sensorarrays in eine Mikrotiterplatte
3. Instrumentierung der Sensoren und Entwicklung einer geeigneten Messelektronik

Das entwickelte Mikrophysiometer soll den Ansprüchen an ein modernes Laborgerät gerecht werden und so demonstrieren, dass die multiparametrische Messung mit Mikrotiterplatten auch in der Praxis sinnvoll realisierbar ist.

In dieser Arbeit wird untersucht, wie die wichtigsten elektrochemischen Messverfahren – die Potentiometrie, die Amperometrie sowie die Impedimetrie – am effektivsten kombiniert werden können. Hierfür werden theoretische Ansätze der Schaltungstechnik und Elektrochemie berücksichtigt und kombiniert. Die direkte Abstimmung zwischen Elektrochemie und Instrumentierung soll zu neuen Lösungen führen, die gleichzeitig einfach und effizient sind sowie eine gute Messperformanz liefern.

2.1 Multiparametrische Messung physiologischer Signale mit elektrochemischen Sensoren

Im praktischen Teil der Arbeit wird exemplarisch jeweils ein Sensor für jedes Messprinzip implementiert. Unter Berücksichtigung der biologischen Bedeutung fällt die Wahl auf den pH-Wert für die Potentiometrie, auf die Gelöst-Sauerstoffmessung für die Amperometrie und auf die Zell-zu-Substrat-Haftung im Falle der Impedimetrie.

Die Weiterentwicklung der Sensoren umfasst:

- Auswahl einer geeigneten Sensortechnologie
- Optimierung von Sensordesign und Herstellungsmethoden
- Untersuchung geeigneter Referenzelektroden
- Modifikation der Sensoren durch Hydrogele
- Berücksichtigung einer industriellen Fertigbarkeit

Die Integration der Sensoren in eine Mikrotiterplatte beinhaltet:

- Zuverlässige Isolation der Sensorzuleitungen
- Reduktion und Angleichung der Zuleitungswiderstände
- Sinnvolle und robuste Kontaktierung der Sensoren
- Auswahl geeigneter Sensorsubstrate
- Biokompatibilität der Materialien innerhalb der Messkammer

Die Entwicklung der Messelektronik soll folgende Punkte berücksichtigen:

- Schaltungstheoretische Betrachtung
- Reduktion von Sensorinterferenzen
- Verbesserung der Messgenauigkeit
- Auswahl geeigneter elektrischer Bauteile
- Optimierung des Platinenlayouts unter Berücksichtigung von EMV-Kriterien
- Verringerung der Größe und Komplexität der Messelektronik
- Reduktion des Stromverbrauchs und der Abwärme des Messsystems
- Kompatibilität zum USB-Standard bei Versorgungsspannung und Datenübertragung

Der Prototyp wird in Form einer 24-fachen Mikrotiterplatte aufgebaut, deren Kammern jeweils mit den drei genannten Sensorarten ausgestattet sind. Die Instrumentierung wird mit einer eigens entwickelten Auswertungseinheit realisiert, die eine trennbare Verbindung mit den sensorischen Mikrotiterplatten eingehen kann. Das entwickelte Messsystem wird abschließend mittels geeigneter Experimente charakterisiert und validiert.

2.2 Integration der elektrochemischen Mikrotiterplatte in das Labor

Neben der Ex situ-Charakterisierung der Sensoren liegt das wissenschaftliche Interesse dieser Arbeit in einer praxisnahen Validierung der eMTP (elektrochemischen Mikrotiterplatte) samt zugehöriger Messelektronik. Hierzu gehört die Durchführung von Zellkulturversuchen in einem Brutschrank. Gleichzeitig wird untersucht, ob das System die Zellen durch die Messung beeinträchtigt, beispielsweise durch übermäßige Abwärme.

Automatisierung spielt bei der Arbeit mit Zellkulturen eine zunehmend wichtige Rolle. Sie trägt zur Kostensenkung bei, erhöht den Durchsatz an Versuchen und hilft bei der Vermeidung von Fehlern, die durch manuelles Arbeiten entstehen können. Um zukunftsfähig zu sein, muss die elektrochemische Mikrotiterplatte mit modernen Automatisierungssystemen kompatibel sein. Aus diesen Gründen wird das entwickelte Messsystem in einen gebräuchlichen Pipettierroboter integriert.

2.3 Bewertung der erzielten Ergebnisse

Sowohl elektro- als auch photochemische Systeme wurden in zahlreichen Vorarbeiten am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik von Prof. Wolf entwickelt und wissenschaftlich untersucht [17, 21–25]. Beide Messverfahren haben erwartungsgemäß ihre Vor- und Nachteile.

Das neu entwickelte Messsystem wird mit dem bisherigen Stand der Technik verglichen. Dabei soll neben den Sensorcharakteristika auch Augenmerk auf die Realisierbarkeit und Integrationsfähigkeit des Gesamtsystems gelegt werden.

Die abschließende Diskussion wird klären, ob und warum sich elektrochemische Mikrotiterplatten in der Zukunft durchsetzen können. Hierzu wird das Potential der entwickelten Sensoren, Messmethoden und der Instrumentierung unter Berücksichtigung jüngster Trends im Bereich der Biotechnologie analysiert.

3 STAND DER WISSENSCHAFT UND TECHNIK

3.1 Biosensoren

Eine wichtige Fähigkeit, die sich bereits bei den einfachen einzelligen Organismen entwickelt hat, ist eine Reaktion auf die Umwelt. So können Pantoffeltierchen beispielsweise chemische Verbindungen erkennen, die auf Nahrung hindeuten und sich gezielt in diese Richtung bewegen. Diese Fähigkeit verdanken sie speziellen Chemorezeptoren [26], die als molekulare Sensoren dienen. Wie in Abschnitt 1.3 erläutert wurde, kann die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors eine ganze Kaskade verschiedener Signale auslösen. Bei dem Pantoffeltierchen dient dies beispielsweise dazu, eine Bewegung in Richtung der Nährstoffquelle durchzuführen. Derartige Phänomene werden Chemotaxis genannt und treten auch bei Zellen des Immunsystems im menschlichen Körper auf.

Dieses Beispiel soll zeigen, dass biologische Materialien, sei es ein Rezeptor, ein Enzym oder gar eine ganze Zelle, oft einzigartige sensorische Fähigkeiten besitzen und somit für die Herstellung von Sensoren genutzt werden können.

Ein typischer Biosensor ist aus drei wesentlichen Teilen aufgebaut: aus der biologischen Komponente, dem Sensor bzw. Transducer und dem elektronischen System. Die erste Komponente ist das biologische Material, das die Fähigkeit aufweisen muss, auf die zu detektierende Messgröße zu reagieren. Diese biologische Komponente erzeugt ein Signal (meist ein chemisches oder elektrisches), welches wiederum von einem geeigneten Sensor detektiert werden kann. Dieser Sensor wird Transducer genannt und liefert ein elektrisches Signal, das mit dem elektronischen System verstärkt, aufgezeichnet und ausgewertet werden kann [27, 28].

Grieshaber et al. publizierten 2008 ein sehr ausführliches Review zu diesem Thema [27]. Die Autoren haben den generellen Aufbau von Biosensoren und die vielzähligen Kombinationsmöglichkeiten der drei Grundkomponenten in einer anschaulichen Grafik vereint. Sie wird in Abbildung 5 gezeigt und gibt einen soliden Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten der Biosensorik.

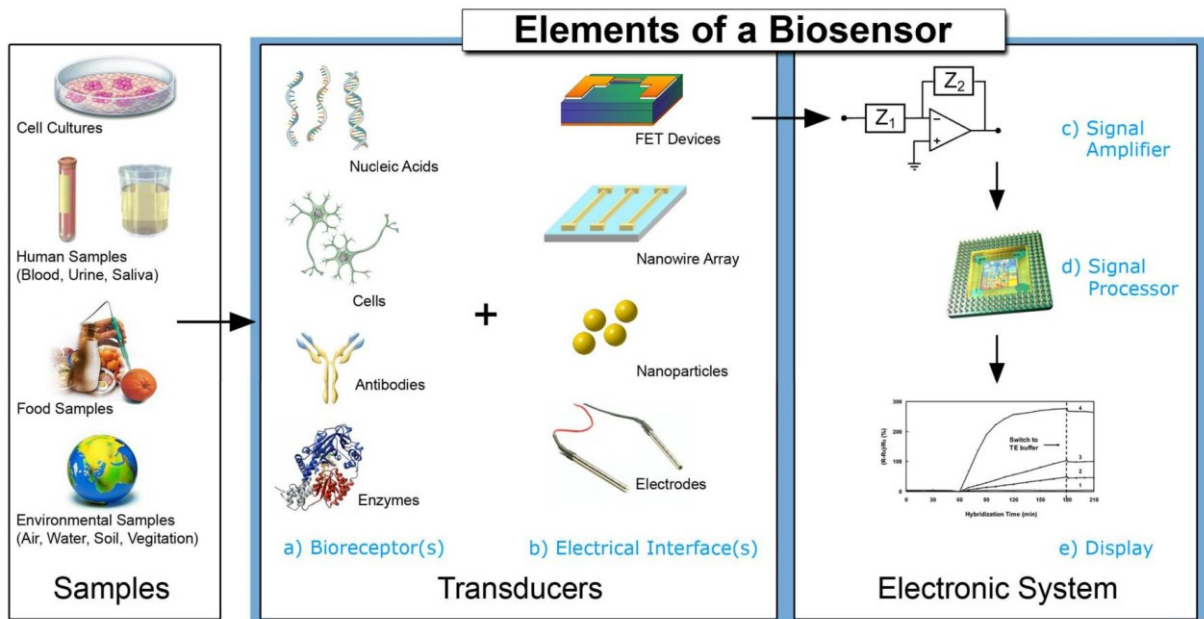


Abbildung 5: Der typische Aufbau eines Biosensors besteht aus einer biologischen Komponente (Bioreceptor), einer elektrischen Schnittstelle (Electrical Interface) und der Messelektronik (Electronic System). Die Abbildung zeigt, dass es auf der Transducer-Seite verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von biologischer Komponente und elektronischer Schnittstelle gibt [27].

3.2 Enzymbasierte Sensoren

Der Aufbau eines enzymbasierten Biosensors wurde erstmalig von Clark im Jahr 1962 beschrieben [29] und war das Fundament der Entwicklung des Glukosesensors für die Blutzuckermessung. Obwohl viele der anfangs beschriebenen Biosensoren nicht erfolgreich kommerzialisiert werden konnten [30], ist die Erfolgsgeschichte des Glukosesensors bis zum zuverlässigen Medizinprodukt [31] – das wir heutzutage kennen – nicht von der Hand zu weisen.

Enzyme beschleunigen nur einen von vielen möglichen Reaktionswegen und sind zudem meistens extrem substratspezifisch [1]. Dies macht sie für die Anwendung in Biosensoren besonders attraktiv. Ein Nachteil der Enzyme ist jedoch, dass sie oft empfindlich auf Schwankungen der Umgebungsbedingungen reagieren [30], ihre Aufbereitung und Immobilisierung komplex ist [28] und sie manchmal auf das Vorhandensein von Coenzymen und Aktivatoren [28] angewiesen sind.

Als Transducer für eine Enzymelektrode sind sowohl potentiometrische als auch amperometrische Sensoren geeignet. Für die potentiometrische Messung eignen sich viele Enzyme, die eine Säure als Produkt der Enzymreaktion haben. Beispiele hierfür sind die Penicillinase, die Glukoseoxidase und die Urease.

3.3 Zellen als Biosensoren

Oxioreductasen sind Enzyme, die eine elektronenübertragende Reaktion katalysieren. Sie können deswegen in Verbindung mit einer amperometrischen Messung genutzt werden. Problematisch ist hierbei der direkte Elektronentransfer zwischen Enzym und metallischer Elektrode, da das elektroaktive Zentrum des Enzyms oft vom Rest des Moleküls abgeschirmt wird. Dies lässt sich durch den Einsatz sogenannter Mediatoren lösen, die zum einen in der Lage sind, das Enzym direkt zu oxidieren und zum anderen selbst leicht an der polarisierten Elektrode oxidiert werden. Der Mediator ermöglicht somit einen indirekten Transport der Elektronen zur Elektrode [32].

3.3 Zellen als Biosensoren

Parallel zu der Entwicklung erster enzymatischer Biosensoren wurden Zellen häufig als Biosensor eingesetzt. Zunächst lag der Fokus auf spezifischen Reaktionen, die durch die Bestandteile der Zellen katalysiert wurden. Die Zellen wurden also als Container für verschiedene Enzyme angesehen, deren Zusammensetzung durch die Evolution bereits gut aufeinander abgestimmt wurde. Die folgenden Unterabschnitte behandeln diese Art der Verwendung von Zellen als Biosensor.

Davon abzugrenzen ist die funktionale Zellanalyse, welche die Gesamtheit der zellulären Funktionen als Transducer des Biosensors ansieht. Die funktionale Zellanalyse wird in Abschnitt 3.4 erläutert.

3.3.1 Vergleich zwischen Enzym- und Zellsensoren

Zellbasierte Biosensoren haben eine Reihe von Vorteilen: Innerhalb einer Zelle befinden sich Enzyme in ihrer ursprünglichen Umgebung und haben dort eine bessere Stabilität als bei der Immobilisierung außerhalb der Zelle. Im Falle von mehrstufigen Enzymreaktionen sind alle notwendigen Komponenten bereits in der Zelle enthalten. Die Herstellung und Aufreinigung von Enzymen ist oft ein aufwendiger Prozess. In der Zelle werden alle notwendigen (Co-)Enzyme und Aktivatoren von dieser selbstständig bereitgestellt. Die Aufzucht von Zell- oder Bakterienkulturen ist im Vergleich zur Enzymgewinnung deutlich kosteneffizienter. Auch wenn die mögliche Messdauer eines zellbasierten Sensors begrenzt ist, ist oftmals eine Regeneration des Sensors möglich, indem der Sensor in eine entsprechende Nährlösung gebracht wird [28, 32, 33].

Zu den Nachteilen der zellulären Sensoren, die rein auf Enzymreaktionen basieren, zählt die lange Ansprechzeit. Sie kann dadurch erklärt werden, dass Produkte und Edukte der metabolischen Kette durch die zelluläre Membran gelangen müssen [28, 32].

Ein weiterer Nachteil ist, dass die Selektivität der Zellsensoren geringer ist als bei enzymatischen Biosensoren. Dies liegt daran, dass in einer Zelle verschiedene metabolische Pfade aktiv sein können und somit auch Reaktionen auf verschiedene Substanzen zu erwarten sind. Diese Situation lässt sich verbessern, indem genetisch modifizierte Zellen verwendet werden, in denen bestimmte Stoffwechselfade deaktiviert wurden. Eine andere Möglichkeit ist die Integration von Inhibitoren in den Sensor für bestimmte Stoffwechselfade [28, 33].

Als biologische Komponente von zellulärer Sensorik kommen neben Bakterien, Algen und Hefezellen auch Präparate aus pflanzlichen oder tierischen Geweben zum Einsatz. Für die Entwicklung eines Biosensors muss eine Zellart gewählt werden, die das zu detektierende Substrat in ausreichender Menge umsetzen oder es am effektivsten metabolisch verwerten kann.

Zahlreiche zellbasierte Sensoren wurden in den letzten 40 Jahren in der Literatur beschrieben. Die nachfolgenden Abschnitte sollen einen kleinen Auszug hieraus liefern und vor allem auf die Sensorik nach der biologischen Komponente eingehen. Für eine komplette Übersicht möchte ich auf die entsprechende Literatur in den anschließend genannten Quellen verweisen [28, 32–35].

3.3.2 Zellsensoren mit amperometrischer Detektion

Viele Bakterien und Zellen verbrauchen Sauerstoff bei Umsetzung eines Substrates. Dieser Sauerstoffverbrauch lässt sich gut mit einer modifizierten Clark-Elektrode messen. Wie in Abbildung 6 gezeigt, wird hierzu auf die gasdurchlässige Membran der Sauerstoffelektrode eine zusätzliche Membran mit immobilisierten Zellen aufgebracht. Eine weitere Membran verhindert das Ausspülen der immobilisierten Zellen, ist jedoch für den zu detektierenden Stoff durchlässig.

Beruhend auf diesem Messprinzip wurden zellbasierte Biosensoren zur Detektion von Ethanol, Methanol, Methan, Stickstoffdioxid oder Dopamin entwickelt [28, 32], um nur die wichtigsten zu nennen.

3.3 Zellen als Biosensoren

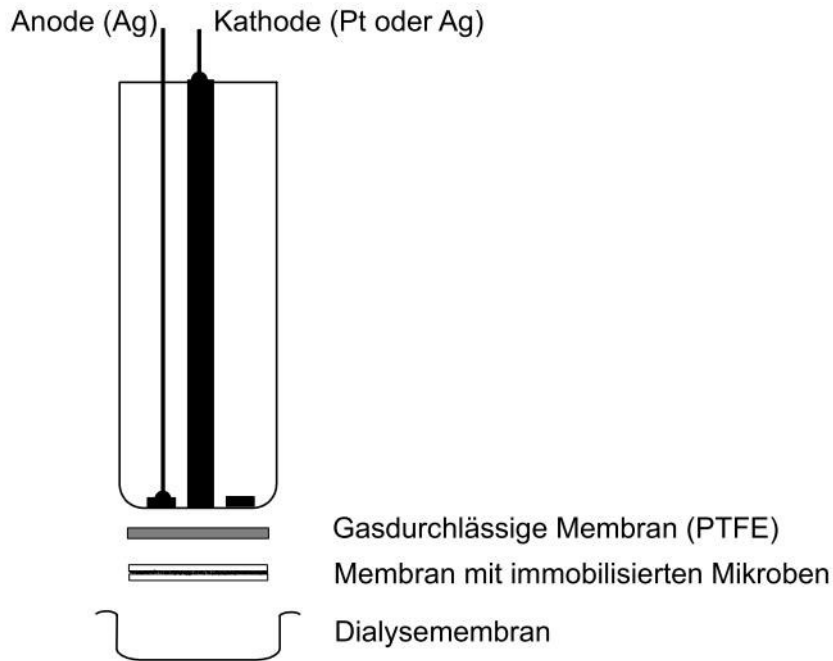


Abbildung 6: Eine Sauerstoffelektrode nach Clark kann mit einer Membran, die mit Mikroben besiedelt ist, zu einem Biosensor modifiziert werden. Eine Dialysemembran erlaubt es dem Analyten zu den Mikroben zu diffundieren, verhindert jedoch gleichzeitig das Ausspülen der mikrobiellen Zellen [35]. Nachgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Springer Nature, Chemische Sensoren von Peter Gründler, Copyright (2012).

3.3.3 Zellsensoren mit potentiometrischer Detektion

Für Sensoren mit ganzen Zellen hat die pH-Elektrode als potentiometrischer Sensor eine große Bedeutung. Die direkte Messung der pH-Änderung durch die Zellen findet beispielsweise Anwendung bei der Detektion von Glukose, reduzierenden Zuckern und Saccharose [28] sowie von Antikörpern [32].

Durch den Einsatz einer selektiven gasdurchlässigen Membran kann eine pH-Elektrode zu einer ammoniakselektiven Elektrode modifiziert werden. Mit der Ammoniakselektrode ist die Detektion vieler Stoffe möglich, wenn die biologische Komponente entsprechend ausgewählt wird. In der Literatur werden als mögliche Analyten Nitrate, Glutamin, Adenosin, Histidin, Tyrosin, Harnstoff und Phenylalanin genannt [28, 32].

3.4 Funktionale Zellanalyse

In der Biologie und der Pharmakologie gibt es Fragestellungen, die über eine quantitative Suche nach einer bestimmten chemischen Substanz hinausgehen. Oftmals ist die Wirkung einer Substanz auf einen Organismus entscheidend.

Meist bestimmen zelluläre Mechanismen, wie ein Stoff auf ein Lebewesen wirkt. Zellbasierte Assays untersuchen die Wirkung einer Substanz auf eine Zelle und können dabei helfen, diese Mechanismen besser zu verstehen.

3.4.1 Abgrenzung zwischen Biosensor, zellbasiertem Sensor und zellbasiertem Assay

Laut Definition der IUPAC [36] sind Biosensoren Vorrichtungen, die eine spezifische biochemische Reaktion, vermittelt durch isolierte Enzyme, Antikörper, Gewebe, Organelle oder ganze Zellen, einsetzen, um eine chemische Verbindung nachzuweisen.

In Abschnitt 3.3 wurden Biosensoren auf Basis ganzer Zellen besprochen. Bei den meisten dieser Biosensoren steht die enzymatische Aktivität innerhalb der Zelle im Vordergrund. Die Zelle wurde eher als eine Hülle betrachtet, die den Enzymen eine Mikroumgebung zur Verfügung stellt, die für ihre Funktion möglichst optimal ist. Die Zellen wurden so ausgewählt, dass für ein bestimmtes Analyt eine möglichst hohe Spezifität vorliegt. Darüberhinausgehende zelluläre Funktionen, wie die Verstoffwechslung von anderen Substraten, sind hier Störfaktoren, die durch Inhibition oder genetische Manipulation ausgeschaltet wurden. Diese Art der zellbasierten Sensoren treffen die Definition der IUPAC und können auf dieser Grundlage der Klasse der Biosensoren zugeordnet werden.

In den frühen 80er-Jahren wurden erste zellbasierte Sensoren für zellschädigende und toxische Substanzen vorgestellt [37, 38]. Diese Sensoren wurden nicht auf Spezifität ausgelegt, sondern konnten mehrere Schadstoffe detektieren. Im Vordergrund steht die Wirkung der Substanz auf die Zelle. Solche Sensoren würden laut IUPAC nicht als Biosensoren gelten, da keine spezifische biochemische Reaktion, sondern eine Überlagerung verschiedener Reaktionen eingesetzt wird. Zudem wird keine chemische Verbindung nachgewiesen, sondern es werden funktionelle Zusammenhänge gemessen. In der einschlägigen Literatur [38–40] werden solche zellbasierten Sensoren nichtsdestotrotz als Untergruppe der Biosensoren geführt und im Englischen als Cell-based Biosensors (CBB) bezeichnet.

3.4 Funktionale Zellanalyse

Assays sind Tests zum Nachweis eines Analyten oder der Wirkung, die der Analyt ausübt. Sie können qualitativer oder quantitativer Natur sein. Von einem zellbasierten Assay ist die Rede, wenn Zellen am Nachweisverfahren beteiligt sind. An einem solchen Assay können verschiedene Arten von Sensoren, darunter auch zellbasierte Sensoren, beteiligt sein. Es sind jedoch auch Assays ohne Sensoren denkbar, beispielsweise wenn die Zellzahl mittels eines Mikroskops ermittelt wird. In der Regel beschreibt das Assay die standardisierte Durchführung des Tests sowie die anschließende Interpretation der (Sensor-)Daten, um zu einem reproduzierbaren Ergebnis zu gelangen.

Die Abgrenzung zwischen einem zellbasierten Biosensor und einem zellbasierten Assay ist schwierig zu treffen. Banerjee et al. machen dies in ihrem Review [38] deutlich: Für sie baut ein zellbasierter Biosensor auf dem Wirkprinzip eines zellbasierten Assay auf. Sie sehen den Hauptunterschied des zellbasierten Biosensors darin, dass er ein abgeschlossenes und kompaktes Gerät bzw. System darstellt.

3.4.2 Vorteile der markierungsfreien Analyse

Um zu verstehen, wie ein Stoff auf eine Zelle wirkt, muss diese Wirkung messbar gemacht werden. Eine gängige Methode ist die Verwendung von Farbstoffen, die in definierter Weise mit der Zelle interagieren. Der Farbstoff kann dann mit entsprechenden optischen Instrumenten detektiert und quantifiziert werden und Rückschlüsse auf oftmals sehr spezifische zelluläre Mechanismen liefern. Eine andere Möglichkeit ist die Markierung des Wirkstoffes mit einem fluoreszierenden oder radioaktiven Marker, um den Ort der Anreicherung in der Zelle ausfindig zu machen oder Mechanismen der Wirkstoffaufnahme zu klären.

Nachteilig sind solche Marker, wenn die Untersuchung der Zellen über einen längeren Zeitraum nötig sind [41], da sie das Verhalten der Zelle langfristig beeinflussen können oder sogar zellschädigende Wirkung haben.

Die Entwicklung neuer Sensortechnologien und deren Miniaturisierung erlaubt eine markierungsfreie Messung ausgewählter Zellparameter. Durch solche sensorgestützten Analysensysteme werden Langzeituntersuchungen mit kontinuierlicher Datenerfassung möglich. Dies ist bei der Untersuchung von dynamischen biologischen Vorgängen besonders vorteilhaft.

3.4.3 Methoden der markierungsfreien Zellanalytik

Für eine markierungsfreie Analyse haben sich vor allem drei Parameter durchgesetzt, die mit entsprechender Sensorik gemessen werden können [42]:

1. Die Änderung des Transmembranpotentials einer Zelle kann verwendet werden, um die Aktivierung und Deaktivierung von Ionenkanälen zu überwachen. Auch bei der Untersuchung an Nervenzellen spielen diese Potentialänderungen eine wichtige Rolle. Sensorisch lassen sie sich mit der Patch-Clamp-Technik oder mit potentialableitenden Mikroelektrodenarrays erfassen [14, 40].
2. Morphologische Änderungen der Zelle können ein Indiz für viele biologische Vorgänge sein. Eine Zelle verändert beispielsweise ihre Form abhängig von der Phase des Zellzyklus [43]. Auch Apoptose und Nekrose sowie zelluläre Migration können über eine morphologische Beobachtung detektiert werden. Neben der klassischen Mikroskopie gibt vor allem die Messung der Zell-zu-Substrat Haftung Aufschluss über morphologische Änderungen. Ein wichtiges Prinzip ist die Messung der elektrochemischen Zell-Substrat-Impedanz (ECIS) [11, 41, 44–50], aber auch optische [17, 40] und auf Feldeffekt basierende Sensoren [51, 52] werden eingesetzt.
3. Metabolische Produkte der Zelle können viele Informationen über zelluläre Vorgänge liefern. Wie bereits in Abschnitt 1.4 angesprochen wurde, sind besonders die energieliefernden Prozesse interessant. Geeignete Messparameter hierfür sind die extrazelluläre Ansäuerungsrate ECAR (Extra Cellular Acidification Rate) [13, 41, 50, 53–59], der zelluläre Sauerstoffverbrauch OCR (Oxygen Consumption Rate) [41, 50, 59–63] und der Verbrauch von Glukose oder Laktat [59, 64–66].

Um die Reaktion der Zelle besser deuten zu können, ist es sinnvoll, mehrere verschiedene Messmethoden zu kombinieren und mittels maschineller Mustererkennung auszuwerten [11].

3.4.4 Ausgewählte Anwendungen der markierungsfreien Zellanalytik

Die Möglichkeiten, welche sich mit dieser Art der Zellanalytik ergeben, sollen kurz und exemplarisch an einigen Beispielen aufgezeigt werden:

Karube et al. demonstrierten 1982, dass die Wirkung von Mutagenen mit genetisch modifizierten Salmonellen nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde eine leicht abgewandelte Clark-Elektrode als Sauerstoffsensoren verwendet. Die Salmonellen wurden so modifiziert, dass sie Histidin für ihr Wachstum benötigten. In einem Nährmedium ohne Histidin gehen

3.4 Funktionale Zellanalyse

Metabolismus und damit auch der Sauerstoffverbrauch dieser Bakterien stark zurück. Liegen jedoch Mutagene im Medium vor, wird ein Teil der Salmonellen in ihren Wildtyp zurückgeführt, dessen Metabolismus nicht von Histidin abhängt. Der ansteigende Sauerstoffverbrauch ist somit ein Indiz für das Vorhandensein eines Mutagens [37].

Die Infektion einer Zelle mit einem pathogenen Virus hat Auswirkung auf ihren Metabolismus. Denn die Zelle wird in eine „Mikrofabrik“ für neue Viruspartikel umgewandelt und ihre ursprüngliche Funktion wird geschädigt. McConnell et al. haben gezeigt, welchen Effekt eine virale Infektion auf die Ansäuerungsrate einer Zellkultur hat. Zur Messung verwendeten sie einen lichtadressierbaren pH-Sensor (LAPS) in einer von Nährmedium durchströmten Kulturkammer. In einem Experiment, bei dem HeLa-Zellen mit HIV-1 ausgesetzt wurden, konnte die antiretrovirale Wirkung von Azidothymidin gezeigt und quantifiziert werden. Wegen der langen Latenzzeit wurden die Auswirkungen erst nach mehreren Tagen messbar. Dieses Beispiel zeigt, dass die Langzeitüberwachung metabolischer Parameter auch beim Screening nach neuen antiviralen Wirkstoffen nützlich sein kann [54].

Noiri et al. haben die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Wundheilung untersucht. Zu diesem Zweck verwendeten sie eine miniaturisierte NO-sensitive Elektrode und einen am Kulturboden angebrachten Impedanzsensor zur Überwachung der Migration von Endothelzellen [67].

Die Wirkung eines Zytostatikums auf eine Tumorzelllinie wurde von Wolf et al. mittels der Messung von Sauerstoff, pH und der Zell-zu-Substrat-Haftung untersucht. Durch die kontinuierliche Messung konnte bereits wenige Minuten nach der Wirkstoffzugabe ein Effekt aus den Messdaten abgelesen werden. Die multiparametrische Messung ermöglichte es, Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus des Zytostatikums zu ziehen [41].

Waldenmaier et al. verwendeten das Cytosensor Microphysiometer (vgl. Abschnitt 3.5.2.1), um die Wirkung verschiedener Zytostatika auf humane Kolonkarzinomzelllinien zu untersuchen. Die Forscher verglichen diese Methode mit dem Formazan- und Kristallviolett-Test. Sie stellten fest, dass das Mikrophysiometer die Ergebnisse am schnellsten und am deutlichsten aufzeigen konnte. Sie zeigten ebenfalls, dass die Zusammensetzung des Nährmediums einen signifikanten Einfluss auf die Wirkung der Zytostatika hatte [68].

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Systeme für zellbasierte Analysen lassen sich im Allgemeinen auf drei wichtige Komponenten reduzieren.

Die erste Komponente ist eine Zellkulturkammer, die Zellen und Nährmedium aufnimmt. Die Realisierung kann als Gefäß, wie z. B. in Form einer Mikrotiterplatte oder als Mikrofluidik erfolgen. In manchen Systemen wird das Volumen der Messkammer klein gehalten, um Änderungen der zellulären Mikroumgebung schnell detektieren zu können. Kammern mit kleinem Volumen werden häufig als Mikroreaktionskammer (MRK) bezeichnet. Bei Verwendung einer MRK muss ein kontinuierlicher oder periodischer Austausch von Nährmedium erfolgen, damit die Zellen nicht unterversorgt werden. Eine andere Möglichkeit ist es, die Größe der Kammer mit einem beweglichen Verdrängungskörper zu variieren.

Die zweite Komponente ist der Sensor. Sensoren können am Boden der Zellkulturkammer, also nahe an den Zellen, angebracht sein oder in die Zellkulturkammer hineinragen. Bei Systemen mit permanentem oder periodischem Austausch des Nährmediums ist auch eine Messung im Zu- und Ablauf möglich.

Die dritte Komponente ist die Messtechnik. Bei elektrochemischen Sensoren kann dies beispielsweise ein Potentiostat und bei fotochemischen Sensoren ein System aus Lichtquelle, optischen Leitern und Filtern, Photodetektor sowie der dazugehörigen Instrumentierung sein.

In den nachfolgenden Abschnitten wird der Stand der Technik mit Fokus auf die wissenschaftliche Literatur vorgestellt. Die kommerziell verfügbaren Systeme werden gegen Ende des Kapitels nur kurz erwähnt, da sie in vorangegangenen Dissertationen unserer Arbeitsgruppe [17, 21, 24, 69] bereits ausreichend beschrieben wurden. Auch konzentriert sich dieser Überblick vorwiegend auf elektrochemische Systeme, da der Großteil der vorliegenden Arbeit die Entwicklung, Integration und Instrumentierung von elektrochemischen Sensoren behandelt.

3.5.1 Messung der Zellatmung

Die Messung der Zellatmung kann über eine kontinuierliche Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts im zellnahen Kulturmedium durchgeführt werden. Dies kann mit elektrochemischen Sensoren erfolgen, da sich Sauerstoff gut an verschiedenen Edelmetallelektroden reduzieren lässt. Man unterscheidet dabei Sensoren nach dem Clark-

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Prinzip, bei denen Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode über eine sauerstoffdurchlässige Membran von der Messlösung getrennt werden, von direkten amperometrischen Sensoren, die sich direkt in der Messlösung befinden. Sauerstoff ist ein potenter Quencher für verschiedene fluoreszierende Farbstoffe und kann somit auch photochemisch detektiert werden.

Für die Untersuchung von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen wurde in [60] ein Sensorarray mit direkten amperometrischen Sensoren in eine Zellkulturflasche integriert. Abbildung 7 zeigt eine auf diese Weise modifizierte Zellkulturflasche. Für die Sensorherstellung wurden Platinelektroden im Dünnschichtprozess auf Pyrex-Glaswafern hergestellt. Eine anorganische Isolierungsschicht wurde ganzflächig mittels Gasphasenabscheidung auf den Wafer aufgebracht und anschließend wurden kleine Öffnungen mit einem Plasmastrahl freigelegt, um die aktive Sensorfläche zu erzeugen.



Abbildung 7: Eine Zellkulturflasche ausgestattet mit einem Sensorelement für die Sauerstoffmessung. Hierzu wurde eine Öffnung in eine Standardflasche geschnitten und der Sensor mit biokompatiblen Kleber dicht eingeklebt [60].

Es wurden auch Sensoren beschrieben, die in einem kostengünstigeren Verfahren auf Polyimid-Folien aufgebracht wurden. Hierfür wurden laminierte Folien als Isolierungsschicht verwendet und es konnten Messdauern von bis zu zwei Wochen erreicht werden [60]. Details zu der Sensorcharakteristik oder über die verwendete Instrumentierung wurden nicht berichtet.

Park et al. haben in [61] einen amperometrischen Sensor mit planaren Elektroden nach dem Clark-Prinzip aufgebaut und für die Messung an Zellkulturen eingesetzt. Dazu schieden sie Dünnschicht-Gold-Elektroden sowie eine Silberelektrode auf einem Glaswafern ab und formten einen Mikrokanal mit dem Fotolack SU-8 2100. Die Silberelektrode wurde mit einer elektrochemischen Behandlung chloriert, so dass eine Silberchloridelektrode entstand. Verschiedene sauerstoffdurchlässige Membranen aus PP (Polypropylen), FEP (Fluorethylenpropylen) oder PDMS (Polydimethylsiloxan) wurden jeweils als Boden eines Gefäßes aus PDMS eingesetzt und auf den Glas-Chip geklebt. Glas-Chip und fertig verklebter Aufbau werden in Abbildung 8 gezeigt. Der entstandene Mikrofluidikkanal wurde mit einem internen Elektrolyten mit konstanter Chloridionen-Konzentration befüllt.

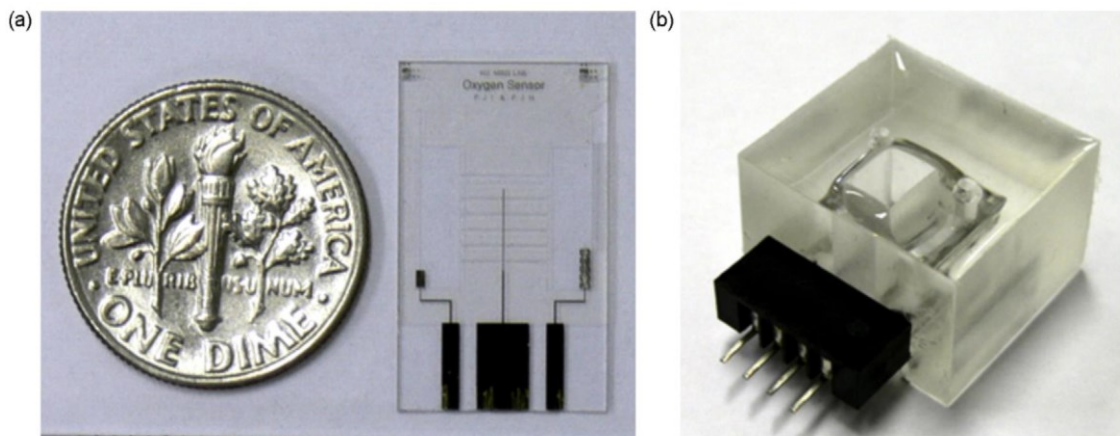


Abbildung 8: a) Elektrodenstrukturen des Sauerstoffsensors auf einem Glassubstrat b) Sensorchip mit aufgeklebtem Kulturgefäß aus PDMS [61].

Der Sensor zeigte bei Verwendung einer PDMS-Membran ein lineares Verhalten mit einer Empfindlichkeit von ca. 0,6 nA pro $\mu\text{mol/l}$ Sauerstoff und zeigte bis zu elf Stunden ein stabiles Verhalten. Der zelluläre Sauerstoffverbrauch konnte mit dem System gemessen werden. Die elektrische Auswertung wurde mit einem gekauften Potentiostaten durchgeführt.

Ein sehr ähnlicher Aufbau wurde von Wu et al. publiziert [62]: Ein Sauerstoffsensor wurde mit einer Arbeitselektrode aus Gold und einer PDMS-Membran realisiert und in eine Petrischale integriert. Die Auswertung erfolgt ebenfalls mit einem kommerziellen Potentiostaten. Auch hier zeigte der Sensor ein lineares Verhalten; die Empfindlichkeit war jedoch geringer, was auf die kleinere Fläche der Arbeitselektroden zurückgeführt werden kann.

3.5.2 Messung der Glykolyse und der zellulären Ansäuerung

Normalerweise verstoffwechseln körpereigene Zellen ihnen zugeführte Nährstoffe über den effizienten aeroben – also Sauerstoff verbrauchenden – metabolischen Pfad. Ist nicht genügend Sauerstoff vorhanden, können anaerobe Stoffwechselffade die benötigte Energie liefern. Schnellwachsende Tumore haben fast immer eine sauerstoffarme Umgebung (Tumorhypoxie), was auch als Warburg-Effekt bezeichnet wird. Aus diesem Grund spielen die anaeroben Stoffwechselfvorgänge bei Tumorzellen eine übergeordnete Rolle [70].

Die Messung der Ansäuerungsrate eignet sich gut, um sowohl den anaeroben als auch aeroben Stoffwechsel zu überwachen, da bei allen wichtigen Pfaden H^+ -Ionen frei werden [71] und das Kulturmedium ansäuern.

3.5.2.1 Halbleiterbasierte Systeme

Parce et al. haben bereits 1989 die Beschreibung eines Biosensors zur Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate veröffentlicht [53]. Zur Messung der pH-Änderung verwendeten sie einen licht-adressierbaren potentiometrischen Sensor (LAPS), der in eine Mikroreaktionskammer eingebracht wurde. Zellen konnten direkt in dieser Kammer kultiviert und über eine Pumpe periodisch mit Nährmedium versorgt werden.

Drei Jahre später wurde diese Messkammer in ein Komplettsystem integriert [54] und von Molecular Devices unter dem Namen „Cytosensor Microphysiometer“ vertrieben, nach einigen Jahren jedoch wieder abgekündigt. Das System besitzt acht Kulturkammern (Abbildung 9a), sowie die nötigen Referenzelektroden, LED, Pumpen, Ventile, Luftblasenfallen und einen Computer für die Signalauswertung. In Abbildung 9b ist das Gesamtsystem für eine der acht Kammern schematisch dargestellt.

Mit dem System können acht LAPS parallel einmal pro Sekunde ausgelesen werden. Das RMS-Rauschen des LAPS wird zwischen 0,0005 und 0,001 pH [54, 71] angegeben, somit wird die mögliche Auflösung der berechneten Ansäuerungsraten mit 30 $\mu\text{pH/s}$ abgeschätzt [13].

Für die Messung der Ansäuerungsraten wird die Pumpe periodisch an- und ausgeschaltet. Während der Pump-Phase misst der LAPS den pH-Wert des Mediums, da die metabolischen Produkte der Zellen kontinuierlich aus der Kammer ausgespült werden. Dieser Wert kann als Grundlinie für die Messung verwendet werden. In der Stopp-Phase kann die extrazelluläre Ansäuerung detektiert werden. Die Stopp-Phase wird ausreichend kurz gewählt, so dass der pH-Wert niemals um mehr als 0,1 pH unter die Basislinie fällt [54].

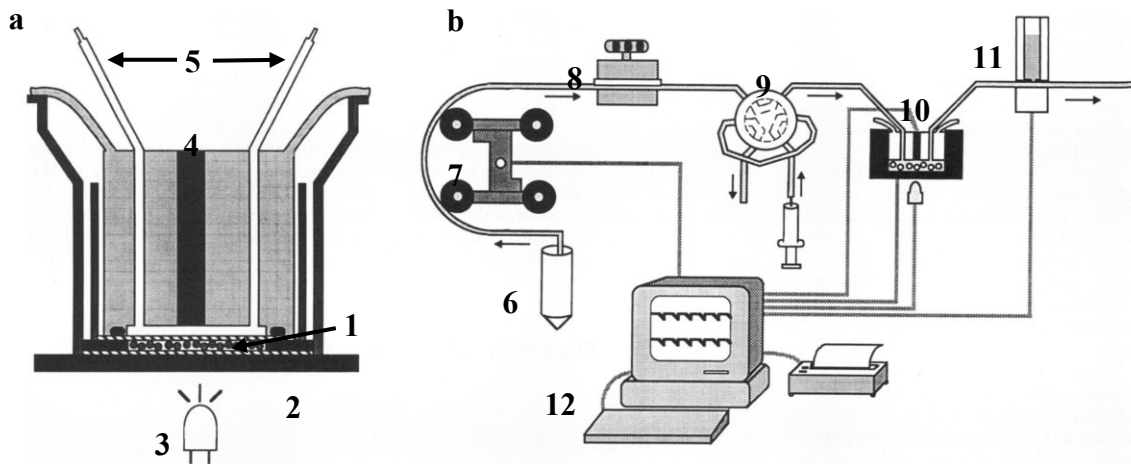


Abbildung 9: a) Zeigt die Messkammer des Cytosensors mit Mikroreaktionskammer (1), LAPS-Arbeits- (2) und Gegenelektrode (4), LED (3), Anschlüsse für den Zu- und Ablauf des Nährmediums (5). b) Das Gesamtsystem für die Vermessung und Versorgung einer Zellkulturkammer besteht aus dem Vorratsgefäß für Nährmedium (6), einer Schlauchpumpe (7), einer Luftblasenfalle (8), einem Ventilsystem (9) für die Wirkstoffzugabe, der Messkammer (10 bzw. a), einer Referenzelektrode (11) im Mediumabfluss und der Messtechnik (12) [54].

Die Auflösung des Systems ist auch nach heutigem Stand der Technik gut und in der Literatur werden zahlreiche Experimente beschrieben, die mit dem Cytosensor durchgeführt wurden [72–78]. Dennoch stellte Molecular Devices 1999 die Produktion des Systems ein. Ein möglicher Grund kann sein, dass der Cytosensor aus vielen Einwegteilen sowie anderen wartungsbedürftigen Einzelteilen besteht und kompliziert zu bedienen ist [79].

Ein ähnliches LAPS-basiertes Messsystem wurde 1995 von Adami et al. in [55] präsentiert. Das Rauschen der verwendeten Sensoren lässt sich mit etwa 2 mV_{pp} aus den dargestellten Kurven ablesen; dies entspricht bei einer pH-Empfindlichkeit von typischen 60 mV/pH einem RMS-Rauschen von ca. $0,005 \text{ pH}$ und ist damit fünf- bis zehnmal so hoch wie beim Cytosensor. Der Verkauf des Systems durch die Firma Technobiochip war weniger erfolgreich als der Cytosensor und wurde ebenfalls eingestellt.

Ein weiteres LAPS-basiertes Mikrophysiometer wurde 2013 von Hu et al. vorgestellt [56]. Im Gegensatz zu den anderen Systemen wurde bei diesem System nicht der Photostrom durch den LAPS konstant gehalten, sondern die Bias-Spannung zwischen Referenzelektrode und LAPS. Der Strom dient nun als Messparameter. Mit dem in Abbildung 10 gezeigten Aufbau konnte so ein geringes RMS-Rauschen von $0,0009 \text{ pH}$ erreicht werden. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl die Messkammer als auch die Instrumentierung nicht miniaturisiert sind.

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

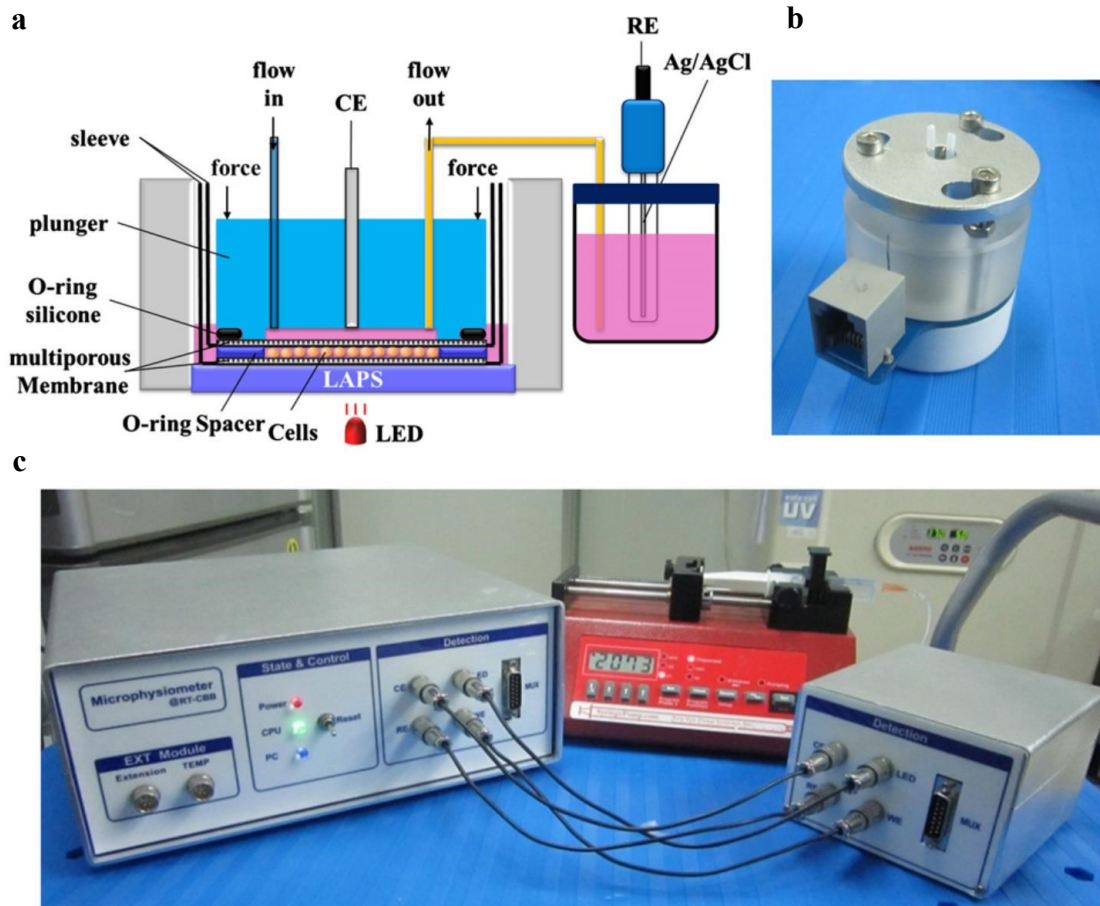


Abbildung 10: a) Zeigt einen Querschnitt durch die Messkammer des Mikrophysiometers von Hu et al. Wie beim Cytosensor befinden sich hier die Gegenelektrode (CE) in der Messkammer und die Referenzelektrode (RE) im Abfluss des Mediums. b) Messkammer im zusammengebauten Zustand; c) Die eingesetzte Messtechnik ist wesentlich größer als die Messkammer [56].

Neben den LAPS stellen ISFET (ionenselektive Feldeffekttransistoren) einen wichtigen pH-sensitiven Halbleitersensor dar. Baumann et al. haben 1999 ein ISFET-basiertes Messsystem für Zellkulturexperimente vorgestellt. Der fluidische Aufbau ist mit dem des Cytosensors vergleichbar und besitzt ebenfalls eine periodisch durchströmte Zellkulturkammer. Statt des LAPS befindet sich ein Siliziumchip mit mehreren ISFET und Referenztransistoren in der Messkammer, die Lichtquelle entfällt. Der Arbeitspunkt des ISFET wird mit einer geeigneten Schaltung eingestellt und die Messspannung mit einem externen Analog-Digital-Wandlungssystem an einen Computer übergeben. Das Rauschen des Systems lässt sich aus den gezeigten Grafen abschätzen. Das so geschätzte RMS-Rauschen liegt zwischen 0,01 und 0,002 pH.

3.5.2.2 Iridiumoxidbasierte Systeme

Halbleitersensoren haben den Nachteil hoher Herstellungskosten, da viele aufwendige Reinraumprozesse notwendig sind. Um Kosten zu senken, können pH-sensitive Metalloxidelektroden verwendet werden. Für die Messung der extrazellulären Ansäuerung ist vor allem Iridiumoxid ein vielverwendetes Material, da es gute Sensoreigenschaften [80, 81] mit ausgezeichneter Biokompatibilität verbindet [82].

Wu et al. haben Iridiumoxid auf Mikroelektroden aus Gold abgeschieden, um mit diesem Sensor Ansäuerungsraten zu messen. Im Gegensatz zu den bereits diskutierten Systemen haben sie statt einer Mikroreaktionskammer eine offene Kulturkammer mit größerem Volumen verwendet, wie in Abbildung 11 gezeigt wird. Statt das Medium in der Kammer auszutauschen, kann es über einen kleinen Kanal (3 in Abbildung 11) angesaugt und wieder eingeströmt werden. Auf diese Weise wird das Medium in der Nähe der Zellen durchmischt.

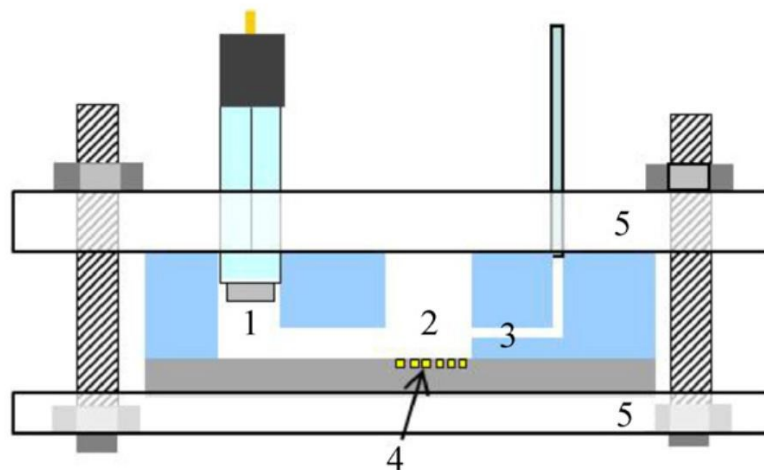


Abbildung 11: Die offene Zellkulturkammer besteht aus einem Glaswafer mit Iridiumoxid beschichteten Mikroelektroden (4), einer Zellkulturkammer (2) mit einem Mikrozufluss (3) aus PDMS und einer Referenzelektrode (1). Eine Klemmvorrichtung (5) sorgt für die nötige Abdichtung zwischen Glas und PDMS [57].

Wenn Zellen das sie umgebende Medium ansäuern, dann ändert sich der pH-Wert am stärksten in unmittelbarer Nähe der Zellen [24]. Die Durchmischung sorgt dafür, dass der pH-Wert in Zellnähe wieder auf das Ursprungsniveau ansteigt. Eine Referenzelektrode wurde ebenfalls in die Kammer integriert. Die Auswertung des Sensorsignales erfolgte über einen gekauften Potentiostaten. Rauschen und Auflösung des Messsystems wurden nicht angegeben und können stark von den Einstellungen des Potentiostaten abhängig sein.

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

3.5.2.3 Iridiumoxidbasierte Systeme ohne Silberchlorid-Referenzelektrode

Alle bisher diskutierten Arbeiten verwenden Referenzelektroden, welche in die Messkammer oder in das Schlauchsystem zur Versorgung der Zellen eingebracht wurden. Die Ergebnisse einer pH-Messung sind von der Qualität der Referenzelektrode genauso abhängig wie von dem Sensor selbst. Für eine störungsfreie und hochauflösende Messung ist es von Vorteil, wenn die Referenzelektrode möglichst nahe der Messelektrode angebracht ist. Die verwendeten Silber-Silberchlorid-Elektroden 2. Art (diese Art der Elektrode besitzt ein separates Elektrolyt und eine Membran) sind jedoch schwer miniaturisierbar. Pseudoreferenzelektroden mit direktem Kontakt zum Messmedium müssen für den Einsatz in einer Zellkulturkammer biokompatibel sein. Silberhaltige Elektroden können somit zu Problemen führen, wenn die toxischen Silberionen zu den Zellen gelangen.

Eine Lösung dieses Problems kann Iridiumoxid liefern, da es unter kontrollierten Bedingungen (konstanter pH-Wert) eine gute Referenzelektrode sein kann [83, 84]. Noch interessanter ist die Verwendung von einem Sensorsystem, bei dem sowohl die Arbeitselektrode als auch die Referenzelektrode aus Iridiumoxid bestehen. Wenn eine der Elektroden in der Nähe der Zellen platziert ist und die andere Elektrode an einem Ort ohne pH-Änderung, lässt sich die Ansäuerungsrate über das Differenzsignal messen. Der Sensordrift ist bei beiden Elektroden ähnlich und kann somit kompensiert werden.

Ges et al. haben gezeigt, dass eine solche Anordnung eine geringere Sensordrift zeigt und weniger Prozessschritte bei der Herstellung benötigt [58] als vergleichbare Systeme mit Silber-Silberchlorid-Referenzelektroden.

In einer weiteren Publikation konnte Ges mit dieser Anordnung erstmalig die zuverlässige Messung der Ansäuerungsrate einer einzelnen Zelle demonstrieren [82]. Hierzu wurden die Sensoren in eine Mikrofluidik mit verschiedenen Kammern und Kanälen integriert. Über eine gezielte Steuerung der Durchströmung konnten einzelne Zellen in eine sehr kleine Kammer geleitet und dort festgehalten werden. Iridiumoxid-Elektroden wurden an verschiedenen Positionen in die Kanäle eingebracht: in der Zuleitung des Zellkulturmediums vor der Zelle, direkt an der festgehaltenen Zelle und im Ablauf des Mediums nach der Zelle. Zur Bestimmung der Ansäuerungsrate wurde die Potentialdifferenz zwischen der Elektrode im Zulauf und der Elektrode der Nähe der Zelle berechnet. Die Messempfindlichkeit, welche für die Messung an einzelnen Zellen nötig ist, wird durch das geringe Volumen und der damit beschleunigten pH-Änderung erreicht. Das Rauschen des Messsystems kann mit ca. 1 mV_{pp} als gering bewertet werden.

3.5.2.4 Enzymbasierte Systeme

Pemberton et al. haben einen miniaturisierten Glukosesensor in eine 96-fache Mikrotiterplatte integriert [85]. Hierzu verwendeten sie mikrostrukturierte Dünnschichtelektroden aus Platin zur Herstellung einer drei-Elektroden-Anordnung für amperometrische Messungen (vgl. Abschnitt 3.8.2) und bedeckten die Arbeitselektrode mit einer kohlenstoffbasierten Siebdruckpaste. In dieser Paste wurden das Enzym Glukoseoxidase sowie ein geeigneter Redox-Mediator integriert. Die Referenzelektrode wurde galvanisch auf der dafür vorgesehenen Platinelektrode abgeschieden. Zur Erfassung der Sensorwerte wurde ein Potentiostat verwendet, der das simultane Aufzeichnen von bis zu fünf Kanälen erlaubt. Die Sensorkammer wurde durch ein aufgeklebtes Kunststoffteil geformt. Gemessen wurde die Abnahme der Glukosekonzentration über die Gesamtdauer des Experiments, ohne das Medium periodisch auszutauschen. Dies erschwert jedoch die Unterscheidung zwischen Sensordrift und Verbrauchsrate der Glukose. Das Sensorrauschen wurde nicht explizit untersucht oder angegeben. In den Messungen mit Zellen sind starke Artefakte in den Messkurven zu erkennen, deren Ursprung nicht weiter erläutert wird.

3.5.3 Messung der Zelladhäsion

Wie bereits angesprochen wurde, grenzen sich Zellen mit einer Membran von der Umwelt ab. Bei eukaryotischen Zellen sowie Bakterien besteht die Zellmembran aus einer Phospholipid-Doppelschicht. In der Membran sind Proteine eingelagert, die verschiedene Funktionen haben und unter anderem den Stoffaustausch mit der Umgebung kontrollieren. Diese Phospholipidschicht kann als Barriere betrachtet werden, die unkontrollierten Stoffaustausch mit der Umgebung verhindert. Auch Ionen können diese Barriere nicht ohne weiteres passieren. Elektrisch betrachtet ist sie deswegen ein Widerstand, der die ionische Leitfähigkeit deutlich verringert.

Diese Eigenschaft der Zellenmembran wurde bereits in den siebziger Jahren verwendet, um Zellkulturen zu untersuchen. Zu Beginn wurde der Transepithel-Widerstand gemessen, indem Zellen auf einer permeablen Membran gezüchtet wurden. Nachdem die Zellen ein Monolayer auf der Membran ausbilden, lässt sich der Widerstand durch die Membran messen [86]. Wie hoch der Widerstand ist, ist von der Zelldichte, dem Zelltyp und dem Zustand der Zelle abhängig. Zellkulturen, die „tight junctions“ (Schlussleisten) ausbilden, haben einen höheren Widerstand. Bei geschädigten Zellen nimmt die Membranintegrität ab und der Widerstand sinkt.

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

3.5.3.1 Auf Edelmetallelektroden basierende Systeme

Ivar Giaever und Charles R. Keese stellten 1984 einen deutlich einfacheren Aufbau dar, der den Einsatz einer Membran überflüssig macht [44]: Hierzu wurden Goldelektroden direkt auf den Boden einer Zellkulturschale aufgedampft und mit isolierten Kupferdrähten kontaktiert. Die Zuleitung der Elektroden wurde mit Deckgläschen und Wachs isoliert, so dass nur eine kleine Elektrodenfläche in Kontakt mit dem Zellkulturmedium trat. Eine weitere und deutlich größere Elektrode dient als Gegenelektrode. Die Impedanz wurde zwischen einer der kleinen Messelektroden und der großen Gegenelektrode gemessen. Damit wird sichergestellt, dass das Verhalten der Impedanz hauptsächlich von Vorgängen an der kleinen Elektrode dominiert wird. Giaever und Keese konnten bereits mit diesem simplen Aufbau die Wirkung von Cytochalasin B auf Zellen nachweisen [44]. Cytochalasine ist ein Zytoskelett-Inhibitor und greift in die Polymerisation von Aktin ein.

Die Impedanz zwischen beiden Elektroden wurde bestimmt, indem ein geringer Wechselstrom eingepreßt und die resultierende Spannung zwischen den Elektroden gemessen wurde. Diese Spannung wurde über einen Lock-in-Verstärker gefiltert, verstärkt und mit einem Datenschreiber aufgezeichnet. Durch die phasensensitive Detektion sind auch kleine Signalamplituden zuverlässig messbar [44].

In den folgenden Jahren entwickelten die beiden Wissenschaftler ein Modell, das den Abstand zwischen Zelle und Elektrode sowie zwischen zwei Zellen berücksichtigt [45]. Mit ihrer Methode konnten sie nachweisen, dass Zellen permanent kleinste Mikrobewegungen im Nanometerbereich durchführen, die mit einem Lichtmikroskop aufgrund der schlechteren Auflösung nicht erkennbar sind [45, 46]. Giaever und Keese konnten zeigen, dass die Mikrobewegung der Zellen von ihren energetischen Zuständen abhängt und beispielsweise mit dem Angebot an Nährstoffen verknüpft ist [46]. Damit konnten sie die morphologischen Eigenschaften der Zellen mit dem zellulären Metabolismus verknüpfen. Analog zu den in Abschnitt 1.4 genannten Mechanismen konnten sie mit ihrer impedanzbasierten Methode die Reaktion von Zellen auf verschiedene Wirkstoffe detektieren [46].

Die von Giaever und Keese entwickelte Methode ist mittlerweile in der wissenschaftlichen Literatur weit verbreitet und wird ECIS (Electrical Cell-substrate Impedance Sensing) genannt. Auch mehrere kommerzielle Produkte basieren auf dieser Methode (vgl. Abschnitt 3.5.5.2). Im Gegensatz zur Mikroskopie, die auf das geschulte Auge und die Erfahrung des Betrachters angewiesen ist, liefert die Impedanzmessung einen quantitativ bewertbaren Parameter. Dies ist vermutlich auch ein Grund für die zunehmende Verbreitung dieser Methode. In der folgenden

Zusammenfassung kann deswegen nur ein möglichst repräsentativer Auszug der Vielzahl an publizierten Systemen und Weiterentwicklungen für ECIS gegeben werden.

Im Jahre 1996 führten Wegener et al. ECIS-Messungen mit Goldelektroden durch, die auf einem Objektträger abgeschieden wurden. Dabei verwendete er neben der bislang üblichen Kombination aus einer großen und einer kleinen Elektrode auch Konfigurationen mit gleichgroßen Elektroden. Dies wirkte sich vor allem bei gut isolierenden Zellkulturen positiv auf die Qualität der Messung aus [47]. Für die elektronische Impedanzmessung setzte Wegener einen ähnlichen Aufbau wie Giaever und Keese ein, jedoch zeichnete er den Verlauf der Impedanz nicht bei einer einzelnen Frequenz auf, sondern erfasste das gesamte Frequenzspektrum über die Zeit [47].

Neben den bereits besprochenen Einzelelektroden werden auch interdigitierende Elektroden für ECIS-Messungen verwendet [40]. Diese Elektrodenkonfiguration wird häufig als IDEs (Interdigitated Electrode Structures) oder manchmal auch als IDA (Interdigitated Array) bezeichnet. Die Strukturen bestehen aus zwei Elektroden die fingerförmig ineinandergreifen, ohne sich zu berühren.

Lei Wang et al. haben in [48] eine Messanordnung entworfen, mit der verschiedene IDEs Geometrien miteinander verglichen werden können. Die Ergebnisse zeigten, dass kleinere Elektroden mit geringerer Länge oder geringerer Breite zu einer erhöhten Sensitivität führten. Die Stromverteilung der IDEs ist jedoch sehr inhomogen. Da der Strom am Rand der Elektrode wesentlich höher ist, tragen Zellen, die am Rand der Elektrode anwachsen, stärker zur Änderung der Impedanz bei. Um diesen Effekt zu kompensieren, führt Wang die effektive Elektrodenbreite ein, die sich aus reeller Breite plus dem Zelldurchmesser berechnet. Der Abstand der Elektrodenfinger sollte deswegen größer als die Zellen sein [40]. Eine weitere Vergrößerung des Abstandes hat keinen Effekt auf die Sensitivität [48]. In einer späteren Veröffentlichung verwendeten Wang et al. die Impedanzmessung an zellbewachsenen IDEs, um den Zellzyklus von synchronisierten Zellkulturen zu analysieren [49].

Ein System für die Untersuchung von Trinkwasser auf Schadstoffe mit ECIS wurde von Theresa M. Curtis in [87] publiziert. Das System basiert auf einem ECIS-Sensor und einem Messgerät der Firma Applied Biophysics. Der ECIS-Sensor besteht aus mehreren Mikroelektrodenarrays (250 μm Durchmesser) und einer großen Gegenelektrode. Über dem ECIS-Sensor wurde eine Mikrofluidik aufgeklebt, um die dort angesiedelten Zellen mit Zellkulturmedium zu versorgen. Wasserproben konnten mit konzentriertem Zellkulturmedium vermischt und so den Zellen verabreicht werden. Pumpen befördern das Nährmedium durch

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

den Mikrokanal und thermoelektrische Elemente sorgen für eine korrekte Temperierung von Medium und Zellkulturkanal. Das gesamte System findet in einem Koffer Platz, wie in Abbildung 12 zu sehen ist. Die Möglichkeit, mehrere Versuche simultan zu betreiben, besteht nicht.

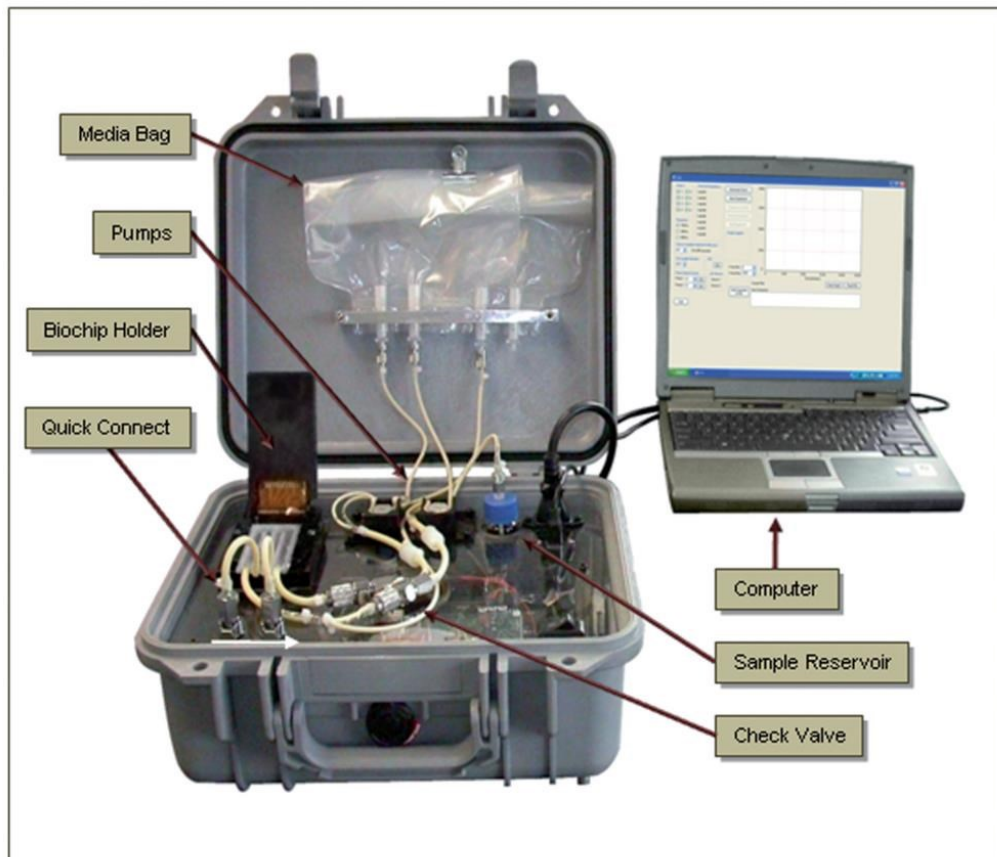


Abbildung 12: Ein koffergroßes ECIS-System mit Lebenserhaltungsvorrichtung für Zellkulturen kann autark in Feldversuchen zur Untersuchung von Trinkwasser auf Schadstoffe eingesetzt werden [87].

Wenn die Messung an einzelnen Zellen gewünscht ist, müssen sehr kleine Elektroden ($\leq 50 \mu\text{m}$) verwendet werden, was in einer hohen Elektrodenimpedanz resultiert. Dies stellt sehr hohe Anforderungen an die Instrumentierung. Die Überwachung von einzelnen Zellen ist mit Standardsystemen deswegen nur schwer zu erreichen [88].

Ein neuartiges System für die Messung der Zelladhäsion mittels sehr kleiner Metallelektroden wurde von Mucha et al. entwickelt [89, 90]. Dieses System hebt sich von den übrigen ab, da es Sensorelektroden und Messelektronik in einem Mikrochip vereint. Der Sensorchip wurde mit CMOS-Technologie gefertigt, wobei für die Goldelektroden zusätzliche Backend-Prozessschritte nötig waren [91]. Abbildung 13 zeigt den prinzipiellen Lageraufbau des von Mucha entwickelten Sensorchips. Die verwendete Passivierungsschicht aus Siliziumnitrid war

ausreichend, um eine biokompatible Oberfläche für das Zellwachstum zu schaffen. Die Messelektrode ist $55\ \mu\text{m}$ mal $55\ \mu\text{m}$ groß und wurde aus einem Schichtaufbau bestehend aus $50\ \text{nm}$ Titan als Haftvermittler, $50\ \text{nm}$ Platin als Diffusionsbarriere sowie $500\ \text{nm}$ Gold als Sensorelektrode gefertigt [91]. Diese Diffusionsbarriere soll die Kontamination der Goldelektrode durch unedle Metalle wie Wolfram oder Aluminium aus den unteren Metallisierungsebenen verhindern.

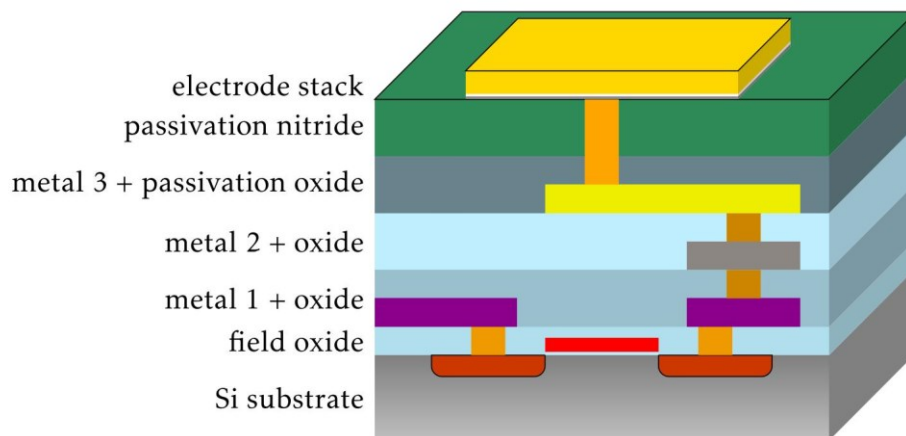


Abbildung 13: CMOS-basierter Sensorchip mit integrierten Elektroden und Messschaltung für ECIS-Messungen. Die aufgebrachte Siliziumnitrid-Schicht ist biokompatibel und ermöglicht die Zelladhäsion. Die Elektroden wurden in einem zusätzlichen Backend-Prozess aufgebracht [91].

Zur Messung der Elektrodenimpedanz wird ein eigens entwickelter Widerstand-zu-Frequenz-Wandler verwendet (siehe Abschnitt 3.8.4.2). Durch die Integration der Messelektronik auf dem Sensorchip und eine geeignete Messwertumsetzung ist es Mucha gelungen, trotz der geringen Elektrodengröße das Signal-Rausch-Verhältnis hoch zu halten. Mikrobewegungen der Zellen konnten somit zuverlässig detektiert werden [91].

3.5.3.2 Auf Halbleitern basierende Systeme

Schäfer et al. haben die Zell-zu-Substrat-Haftung einzelner Zellen mit Sensoren auf Basis von Feldeffekttransistoren gemessen [51]. Die Transistoren wurden nach einer in [92] publizierten Methode hergestellt, die auf einem Standardprozess für die MOSFET-Fertigung basiert. Anders als beim klassischen MOSFET wird keine Gate-Metallisierung aufgebracht, da der Gate-Anschluss über das Elektrolyt und die darin befindliche Referenzelektrode hergestellt wird. Deswegen werden diese Transistoren auch als Open-Gate-Transistoren bezeichnet. Abbildung 14 zeigt den von Schäfer verwendeten Aufbau schematisch sowie das von ihm

Glassubstrat mit zwei getrennten Goldelektroden, auf die eine PEDOT:PSS-Schicht mittels Spincoating aufgebracht wurde. Verglichen mit einem traditionellen Transistor bildet PEDOT:PSS den Kanal und das Zellkulturmedium mit einer zusätzlichen eingetauchten (Pseudo-)Referenzelektrode das Gate. Eine PDMS-Kammer bildet das Zellkulturgefäß. Zur Bestimmung der Zelldichte auf der PEDOT-Schicht wurde die Eingangskennlinie (I_{DS} vs. U_{GS} bei konstantem U_{DS}) des Transistors vermessen [52].

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei der verwendeten Referenzelektrode um eine unbehandelte Goldelektrode gehandelt hat. Das Potential einer inerten Elektrode ist von der Zusammensetzung des Elektrolyten abhängig [93]. In den beschriebenen Experimenten wird nicht ausgeschlossen, dass der gemessene Effekt ganz oder teilweise durch eine Spannungsverschiebung an der Pseudoreferenzelektrode zustande kommt.

Hu et al. zeigten, dass auch LAPS zur Messung von (schnellen) morphologischen Änderungen verwendet werden können. Am Beispiel von pulsierenden Kardiomyozyten verglichen sie diese neue Methode mit gebräuchlichem ECIS [94]. Die ECIS-Messung wurde bei einer Frequenz von 10 kHz durchgeführt. Die Anregungsspannung betrug dabei 22 mV. Die verwendete Signalverarbeitungskette wird in Abbildung 15a dargestellt.

Um die Zelladhäsion mit LAPS zu messen, wurde die Intensität der LED sinusförmig moduliert und die Änderung der Amplitude des fließenden Fotostroms aufgezeichnet. Dies entspricht der geläufigen Messmethode für pH-Messungen mit LAPS. Der Arbeitspunkt des LAPS wurde in Bezug auf eine Pseudoreferenzelektrode aus Platin eingestellt. Abbildung 15b zeigt die Signalkette des Systems. Die Ergebnisse von Hu zeigen, dass Goldelektroden und LAPS gleichermaßen geeignet sind, um kleinste Formänderungen von pulsierenden Kardiomyozyten zuverlässig zu detektieren. Darüber hinaus zeigten die Forscher, dass bei der LAPS-Messung die Änderung der Impedanz über dem LAPS für die Variation des Fotostromes verantwortlich ist und nicht die Änderung des Oberflächenpotentials [94].

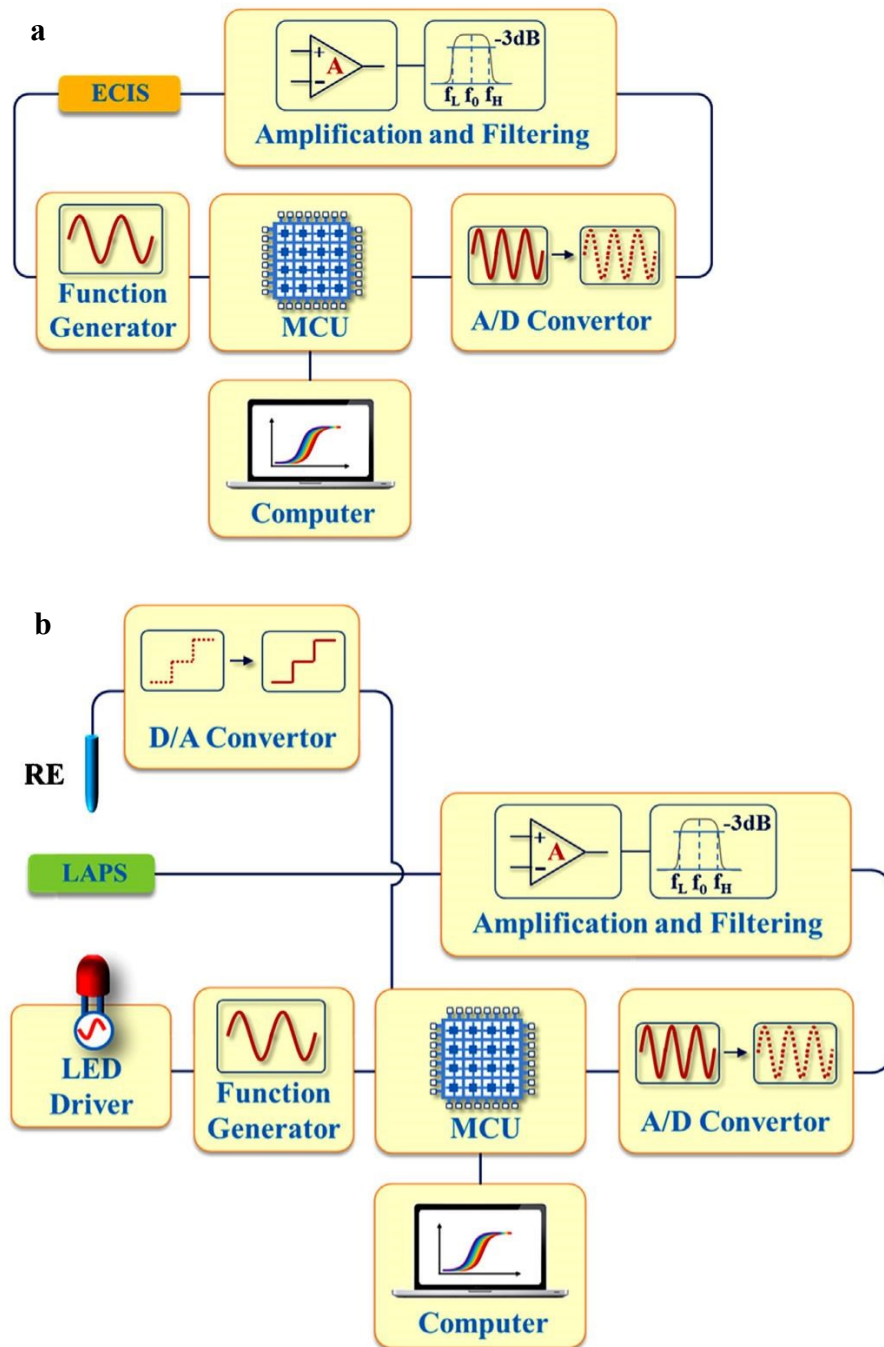


Abbildung 15: Gegenüberstellung von zwei Systemen zur Messung der Pulsation von Kardiomyozyten: a) Beim ECIS-basierten System wird eine Impedanzmessung bei einer festen Frequenz an einer Goldelektrode durchgeführt. b) Beim LAPS-basierten System erzeugt die sinusförmig modulierte LED einen sinusförmigen Fotostrom, dessen Amplitude sich mit der Impedanz der Zellschicht über dem LAPS ändert [94].

3.5.4 Multiparametrische Messung

Die Messung der Ansäuerungsrate allein macht eine Unterscheidung zwischen anaerobem und aerobem Stoffwechsel schwierig. Eine erhöhte Ansäuerungsrate könnte bedeuten, dass sich viele Zellen mit normalem Stoffwechsel in einer Reaktionskammer befinden. Sie könnte aber genauso durch wenige Zellen mit erhöhter Stoffwechselaktivität oder anaerobem Stoffwechsel begründet sein. Eine simultane Überwachung verschiedener Stoffwechselfparameter sowie der Zellmorphologie kann deswegen bei bestimmten Fragestellungen nützliche Mehrinformation liefern.

Wolf et al. publizierten in [41] das erste multiparametrische Messsystem, das sowohl Ansäuerungsraten, Sauerstoffverbrauchsraten, Temperatur als auch die Zell-zu-Substrathaftung messen konnte. Das System besteht – ähnlich wie der in Abschnitt 3.5.2.1 beschriebene Cytosensor [54] – aus einem Sensorchip, auf dem Zellen kultiviert werden sowie einer Messkammer, deren Volumen über einen Verdrängungskörper reduziert wird. Schlauchanschlüsse an diesem Verdrängungskörper ermöglichen den Austausch des Zellkulturmediums. Auf dem Sensorchip befinden sich verschiedene Sensoren, die entweder als Halbleiter oder als metallische Elektrode ausgeführt sein können. In Halbleitertechnik wurden ISFET und Dioden zur Temperaturmessung gefertigt. Metallische Strukturen wurden zur Herstellung des Sauerstoffsensors und für IDEs-Strukturen zur Impedanzmessung verwendet. Um die optische Untersuchung mit einem Durchlichtmikroskop zu ermöglichen, wurden glasbasierte Sensorchips mit Siliziumchips verbunden [95]. Das verwendete Messsystem ist in Abbildung 16 gezeigt und besteht aus folgenden Komponenten [41]: Fluidik, Sensorchip, Mikroskop, Auswerte-Elektronik und Computer. Mit diesem System war es möglich, die Sensoren in einer Messkammer gleichzeitig auszulesen.

Um den Durchsatz des Messsystems zu erhöhen, wurde vorgeschlagen die entwickelten Sensoren in Mikrotiterplatten zu integrieren, um somit weitere Anwendungsfälle, wie z. B. personalisiertes Wirkstoffscreening in der Tumorthherapie, zu ermöglichen [95].

Dieselbe Arbeitsgruppe realisierte einige Jahre später ein neues Messprinzip, bei dem auch der Sauerstoffgehalt mit dem ISFET-Sensor gemessen werden konnte [96]. Diese Methode wird in Abschnitt 3.6.2.6 beschrieben. Die Technologie wurde später von der Firma Bionas zu einem kommerziellen Messsystem weiterentwickelt (vgl. Abschnitt 3.5.5).

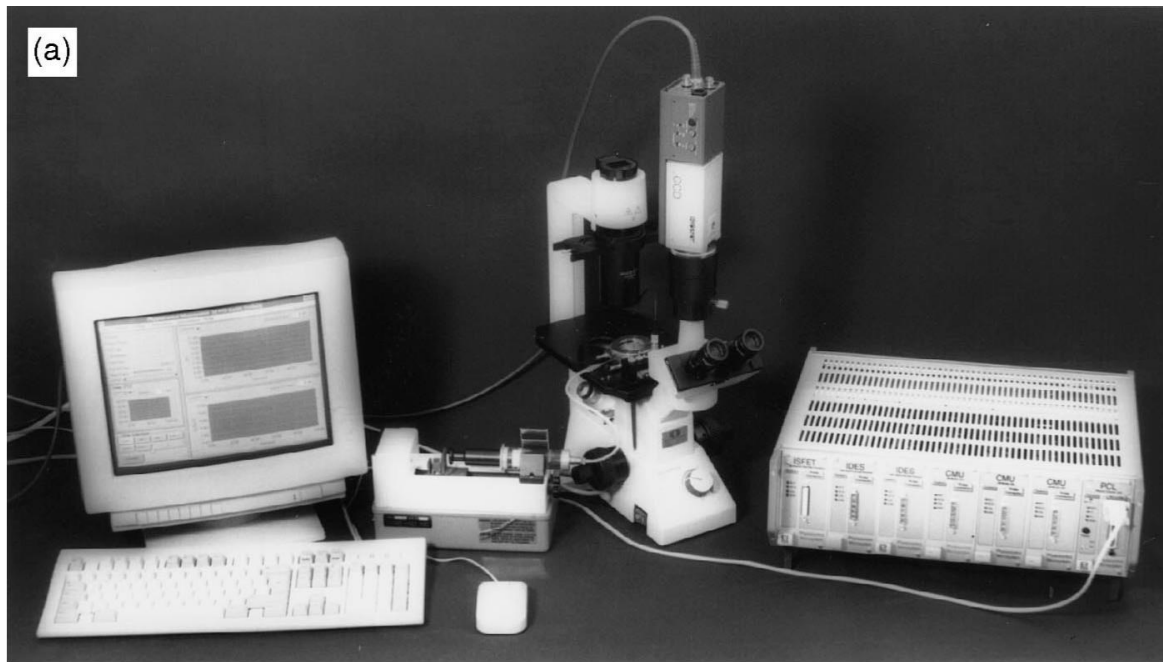


Abbildung 16: System zur multiparametrischen Messung an Zellkulturen. Von links nach rechts: Computer und Programm zur Steuerung; Zellkulturkammer mit Sensorchip, Halte- und Kontaktiervorrichtung; Mikroskop; Messtechnik [41].

Auch David Cliffel leistete mit seinen Mitarbeitern in mehreren Veröffentlichungen [59, 65, 97–99] einen wichtigen Beitrag zur multiparametrischen Messung des zellulären Metabolismus: Eklund et al. erweiterten in [65] die LAPS-basierte Sensorik des Cytosensors um die zusätzlichen Messparameter Sauerstoff, Glukose und Laktat. Hierzu modifizierten sie den Verdrängungskörper des Cytosensors und brachten vier zusätzliche Platinelektroden ein. Eine der Elektroden dient als Gegenelektrode, da die Verwendung der Gegenelektrode des Cytosensors zu Störungen geführt hat. Die anderen Elektroden bilden die Arbeitselektroden für die verschiedenen Messparameter. Zur Sauerstoffmessung wurde die Elektrode mit Nafion beschichtet, für Laktat und Glukose wurden die entsprechenden Oxydasen auf der Elektrode immobilisiert. Für die Instrumentierung wurde ein kommerzieller Potentiostat verwendet [65].

McKenzie et al. haben als Sensoren siebgedruckte Dickschichtelektroden verwendet [59]. Sie setzten dazu gedruckte Platinelektroden auf Keramiksubstraten ein. Solche Elektroden haben den Vorteil gegenüber Dünnschichtelektroden, dass sie einfacher und günstiger herzustellen sind. Die verwendete platinhaltige Tinte war besonders, da sie ohne Zusatz von Bindemitteln auf die Keramik gedruckt werden konnte. Zur Isolierung der Zuleitungen wurde eine nicht weiter spezifizierte Tinte auf keramischer Basis verwendet. Die Elektroden wurden auf verschiedene Arten modifiziert, um Sensoren für Laktat, Glukose, Sauerstoff und pH-Wert zu erhalten. Eine der Elektroden wurde galvanisch mit Silber beschichtet und anschließend

chemisch chloriert, um eine gemeinsame Referenzelektrode zu erhalten. Ebenso wurde eine größere Platinelektrode als gemeinsame Gegenelektrode verwendet. Der pH-Sensor wurde durch galvanische Abscheidung von Iridiumoxid hergestellt. Für den Sauerstoffsensor wurden auf eine der Platinelektroden mit einem Inkjet-Drucker zwei Nafion-Schichten aufgebracht. Die Enzymsensoren wurden ebenfalls mittels Inkjet-Drucks hergestellt. Das entsprechende Enzym wurde mit PBS (Phosphate-Buffered Saline) und Rinderalbumin vermischt und aufgedruckt. Anschließend wurde eine Schicht bestehend aus Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel (cross-linker) aufgedruckt, um das Enzym zu immobilisieren. Die Enzymsensoren konnten bei Lagerung in PBS über einen Monat hinaus verwendet werden. Trockene Lagerung beeinträchtigte die Langzeitstabilität jedoch erheblich. Die hergestellten Sensoren beeinflussen sich bei simultaner Messung nicht gegenseitig [99] und lieferten in Versuchen mit und ohne Zellen reproduzierbare Ergebnisse [59].

Für die Instrumentierung wurde ein selbstentwickelter und modularer Potentiostat verwendet. Das System unterstützt bis zu acht Module gleichzeitig, wobei ein Modul für amperometrische und ein Modul für potentiometrische Messungen entwickelt wurde. Jedes Modul kann bis zu drei Sensoren in derselben Zellkulturkammer vermessen. Der Aufbau dieses Potentiostaten wurde von Lima et al. in [99] publiziert (siehe Abschnitt 3.8.5).

Wang Ping beschäftigt sich mit seiner Gruppe in mehreren Publikationen [39, 100–102] mit der Implementierung von multiparametrischer Messung an Zellen mit LAPS. Sie nutzten die Eigenschaft der lokalen Adressierung von LAPS aus, um simultan pH sowie die Ionenkonzentrationen von Natrium, Kalium und Calcium zu messen. Hierzu beschichteten sie den LAPS an verschiedenen Orten mit ionenselektiven Membranen für den jeweiligen Analyt. Die Membranen waren so lokalisiert, dass die zugehörige LAPS-Fläche exklusiv mit einer eigenen LED angestrahlt werden konnte. Durch Modulation der einzelnen LED mit verschiedenen Frequenzen entstand ein Stromfluss durch den LAPS, der sich ebenfalls aus diesen Frequenzkomponenten zusammensetzt. Durch eine FFT (Fast Fourier Transform) können die Amplituden in einfacher Weise relativ zueinander dargestellt werden. Die Änderungen der Amplitudenhöhe wurden verwendet, um auf die verschiedenen Ionenkonzentrationen im Messmedium zurückzuschließen [100].

Wie in Abschnitt 3.5.3.2 berichtet wurde, demonstrierte das Team von Wang bereits die Messung der Zell-zu-Substrat-Haftung mit LAPS [94] sowie die übliche Verwendung zur pH-Messung in [56]. Darüber hinaus wurde in [101] die Möglichkeit der simultanen Messung der Impedanz und Ansäuerungsraten mit LAPS gezeigt.

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Der Nachteil dieser Methode ist die höhere Grundimpedanz des LAPS im Vergleich zu den üblichen Metallelektroden bei ECIS. Deswegen wurde ein System entwickelt, das IDES-Elektroden zur ECIS-Messung und LAPS für die Messung der zellulären Ansäuerungsrate verwendet. Ein eigenes Elektronikmodul wurde hierfür entwickelt und ist vergleichbar mit dem Aufbau in Abbildung 10. Das System wurde sowohl bei der ECIS-Messung als auch bei der pH-Messung erfolgreich getestet, eine simultane Messung wurde in den Ergebnissen jedoch nicht demonstriert [102].

Eine einfache Implementierung einer Multisensorplattform wurde in [103] gezeigt. Zwei ISFETs eine Silber-Silberchlorid-Elektrode und mehrere Mikro-Elektroden für die Sauerstoffmessung wurden in verschiedenen Technologien hergestellt und einzeln auf ein PCB (Printed Circuit Board) geklebt. Die Leiterbahnen auf dem PCB dienen der Kontaktierung der Sensoren. Einer der ISFET-Sensoren wurde zusätzlich mit einer ionenselektiven Membran für Kalium behandelt. Die Kontaktstellen zwischen PCB und Sensoren wurden mit lichthärtendem Lack verkapselt. Die verwendeten Sensoren zeigten ausreichende Sensitivität. Bei den ISFET wurden jedoch hohe Driftraten um die 5 mV/h festgestellt. Die Sensoren wurden einzeln vermessen und das gleichzeitige Auslesen der Sensoren wurde nicht beschrieben.

Adlam und Woolley haben ein System entwickelt, das die Leerlaufspannung (OCP) von Goldelektroden in einer Zellkulturkammer misst. Jeweils vier Goldelektroden wurden pro Zellkulturkammer im Siebdruckverfahren hergestellt. Eine der Elektroden wurde mit einer Silberchlorid-Schicht überdruckt und als Pseudoreferenzelektrode verwendet. Das Potential an den Goldelektroden wurde mit einem speziell von der Firma Uniscan angefertigten Messgerät aufgenommen. Das System, das „Oncoprobe“ genannt wird, unterstützt die gleichzeitige Messung in acht Zellkulturkammern und ist in Abbildung 17 dargestellt. Redoxaktive Substanzen im Messmedium reagieren an der Edelmetallelektrode und verändern so das Elektrodenpotential. In ihrer Publikation konnten die Autoren zeigen, dass es eine Korrelation zwischen der Behandlung der Zellkultur mit biologisch aktiven Substanzen und dem Verlauf der Leerlaufspannung gibt [104].

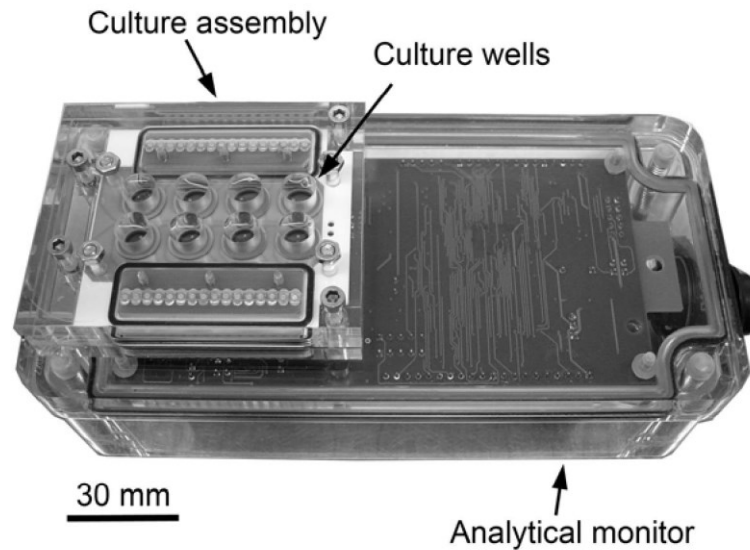


Abbildung 17: Das Oncoprobe misst die Leerlaufspannung von drei Goldelektroden bezüglich einer gemeinsamen Silberchlorid-Elektrode. Das System unterstützt die simultane Messung in bis zu acht separaten Zellkulturkammern (Culture Wells) [104].

Nachteilig an diesem Messsystem ist, dass sich das gemessene Potential aus einem Mischpotential verschiedener elektrochemischer Reaktionen zusammensetzt. Es ist also nicht möglich, die Veränderung einzelner Stoffe zu betrachten. Dies reduziert folglich die Möglichkeiten der Signalauswertung und Interpretation. Dennoch sollte dieses Gerät zu den multiparametrischen Systemen gezählt werden, da es durch Modifikation der Messelektroden, beispielsweise durch eine Beschichtung mit einem Metalloxid oder einer ionenselektiven Membran, zu multiparametrischen Messungen fähig ist. Die Messmethode ist jedoch auf die Potentiometrie beschränkt. Amperometrische Sauerstoffsensoren und enzymbasierte Biosensoren können nicht ohne weiteres integriert werden.

Kieninger veröffentlichte in seiner Dissertation [105] einen Sensorchip für die Messung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt in einer Zellkulturflasche. Der Aufbau gleicht dem in Abbildung 7 dargestellten Messsystem. Die Sensortechnologie basiert auf Dünnschicht-Platin-Elektroden für die Sauerstoffmessung und einer galvanisch abgeschiedenen Iridiumoxid-Schicht für die pH-sensitive Elektrode. Eine Pseudoreferenzelektrode auf Silber-Silberchlorid-Basis wurde ebenfalls auf dem Chip integriert. Kieninger entwickelte in seiner Arbeit ein verbessertes Abscheidungsprotokoll für Iridiumoxid und konnte somit die Langzeitstabilität und Reproduzierbarkeit der pH-Messung erhöhen. Des Weiteren wurde die Stabilität der direkt amperometrischen Sauerstoffmessung mit einer pHEMA-Beschichtung verbessert und die Drift des Sensors über ein chronoamperometrisches Protokoll minimiert. Nach diesem Protokoll wird

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

die Platinelektrode für wenige Sekunden mit verschiedenen Spannungen vorpolarisiert, was eine elektrochemische Umwandlung der obersten Platinschichten bewirkt. Nach Durchlaufen der verschiedenen Polarisierungen erlangt die Platinelektrode ihren chemisch definierten Zustand zurück und regeneriert so die Sensitivität auf Sauerstoff. Die Instrumentierung erfolgt mit einem Potentiostaten, der über einen Multiplexer mit verschiedenen Elektroden verbunden werden kann. Auf eine simultane Messung wird bewusst verzichtet, da sich die Messparameter in der Zellkulturflasche nur langsam ändern und somit eine geringe Abtastrate ausreichend ist [105].

Weltin et al. demonstrieren in [66] eine Weiterentwicklung von Kieningers System und haben zusätzliche Sensoren für die Glukose-, Laktat- und Impedanzmessung auf dem Sensorchip integriert. Um die metabolische Zellaktivität zu messen, wurde eine Mikrofluidik auf dem Chip integriert. Elektroden und Zuleitungen wurden mit Platin in Dünnschichttechnologie realisiert. Die Abdeckung der Leiterbahnen erfolgt mit einer 800 nm Siliziumnitrid-Schicht, gefolgt von einer 200 nm Siliziumoxid-Schicht, wobei die Elektroden mittels reaktiven Ionen-Ätzens freigelegt wurden. Die Iridiumoxid-, Referenz- und Sauerstoff-Messelektroden wurden nach den von Kieninger beschriebenen Methoden [105] hergestellt. Zur Herstellung der Biosensoren wurden die Platinelektroden mit einem pHEMA-Film beschichtet, in den zusätzlich Glukose- oder Laktoseoxidase eingebracht wurde. Die Kanäle der Mikrofluidik wurden mit SU-8 3025-Lack fotolithografisch erzeugt. Als Abdeckung der Kanäle wurde eine Polyimid-Folie auf den SU-8-Lack laminiert. Der so entstandene Chip wird in Abbildung 18 (a und b) gezeigt. Mehrere pH- und Sauerstoffsensoren befinden sich in Zulauf, Ablauf und Zellkulturkammer. Somit ist die Kontrolle des pH-Wertes vor und nach dem Kontakt mit der Zellkultur möglich. Die Referenzelektrode und die Biosensoren befinden sich im Ablauf, womit eventuell austretende toxische Silberionen nicht in die Zellkulturkammer gelangen können. Wie in Abbildung 18c gezeigt, wird der Chip mit Acrylglas abgedeckt, welches die Zellkulturkammer und die Anschlüsse für die Versorgung mit Zellkulturmedium bildet. Ein PCB mit angelöteten Federkontakten stellt die Verbindung zu den Platinelektroden her. Die Sensoren wurden mit Potentiostaten einzeln vermessen. Auf eine simultane Instrumentierung wird nicht näher eingegangen [66].

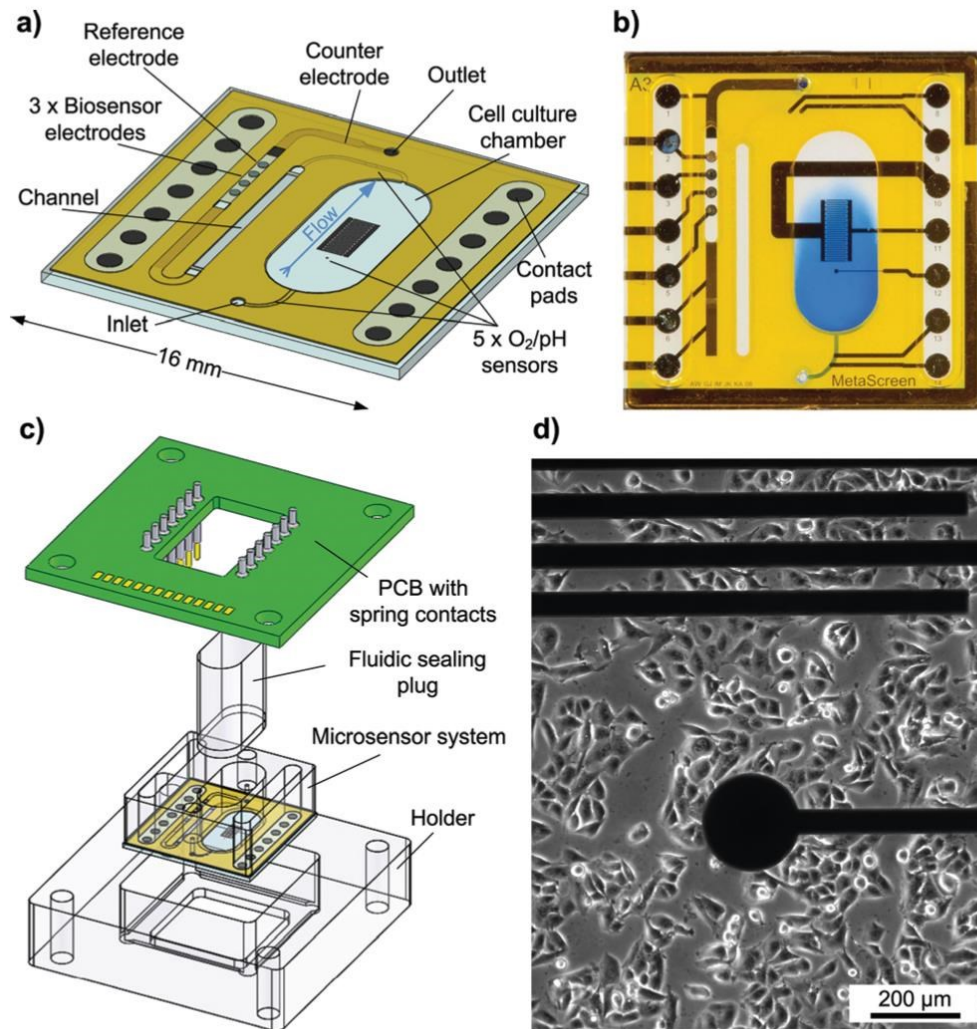


Abbildung 18: a) und b) Aufbau des von Weltin et. al. entwickelten Sensorchips. Die Zellkulturkammer befindet sich in der Mitte und kann über eine Fluidik mit Kulturmedium versorgt werden. Die Sensoren befinden sich entweder in der Kulturkammer, im Ablauf- oder Zuflusskanal. c) Der Sensorchip wird von dem gezeigten Halter aufgenommen und mit Federkontakten elektrisch angeschlossen. Um die metabolische Aktivität der Zellen messen zu können, wird das Volumen der Zellkulturkammer mit einem Stopfen reduziert. d) Die mikroskopische Aufnahme zeigt vitale Zellen in der Kulturkammer und deutet auf ausreichende Biokompatibilität der verwendeten Materialien hin [66].

Ein Chip mit ähnlichen sensorischen Fähigkeiten wurde von Pemberton et al. auf Siliziumsubstrat realisiert [64]. Statt der Elektroden für die Impedanzmessung, integrierten die Forscher einen Platin-Temperatursensor in die Zellkulturkammer. Auch hier erfolgte die Passivierung der Elektrodenleitungen mit einem Lagenaufbau aus Siliziumnitrid und Siliziumoxid, um mechanische Spannung und somit Rissbildung zu verhindern. Im Gegensatz zum Sensoraufbau von Weltin et al. haben die Autoren für alle Sensoren (pH, Sauerstoff, Glukose und Laktat) eine eigene Referenzelektrode vorgesehen und diese in unmittelbarer Nähe

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

des Sensors platziert. Die Auswertung der Sensorsignale erfolgte mit einem 5-Kanal-Potentiostaten, der über eine Verbindungseinheit mit fünf parallelen Zellkulturkammern verbunden werden konnte. Der Aufbau wird in Abbildung 19 gezeigt. Die Sensoren in der Zellkulturkammer können nicht simultan ausgelesen werden und die Umschaltung erfolgt manuell über Drehschalter an der Verbindungseinheit [64].

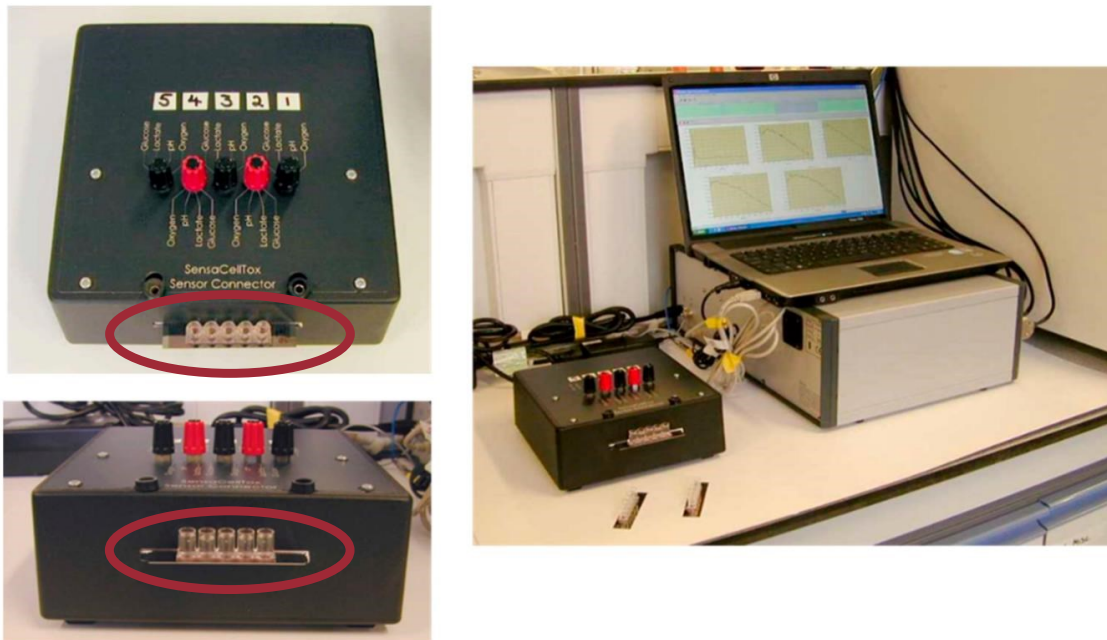


Abbildung 19: Auf der linken Seite ist die Umschalt-Einheit mit Drehschaltern für die Sensorauswahl zu sehen. Die Sensorchips (rot eingekreist) werden direkt in dieses Gerät eingesetzt. Auf der rechten Seite sind der verwendete Potentiostat und ein Notebook zur Messdatenaufzeichnung abgebildet [64].

Bonk et al. demonstrierten eine einfachere Herstellung von multiparametrischen Sensorchips für die Messung des Sauerstoffgehalts, pH-Wertes und der Zell-zu-Substrat-Haftung [50]. Für die Sensoren wurden Platinelektroden sowie verschiedene Platin-IDES in Dünnschichttechnologie auf einem Glaswafer aufgebracht. Die Elektrodenzuleitungen wurden mit einer 1,2 μm dicken Siliziumnitrid-Schicht überdeckt, wobei die aktiven Elektrodenflächen frei gelassen wurden. In einem weiteren Prozessschritt wurden einige Elektroden mit einer 20 nm oder 60 nm dicken Siliziumnitrid-Schicht überdeckt, um eine pH-sensitive Elektrode herzustellen. Auf diesen Glas-Chip wurde eine PDMS-basierte Mikrofluidik aufgeklebt, was zu dem in Abbildung 20 gezeigten Aufbau geführt hat. Die Empfindlichkeit der pH-Sensoren lag bei ca. -25 mV/pH. In Vorversuchen wurde eine Drift von 0,27 mV/h bestimmt. Bei frisch hergestellten Sensoren wurde eine erhöhte Drift von ca. 8 mV/h bei einer ebenfalls erhöhten

Empfindlichkeit von ca. 39,28 mV gemessen. Die Sauerstoffelektrode wurde bei einem Potential von -0,65 V gegenüber einer Silber-Silberchlorid-Elektrode betrieben. Bei dieser Polarisierungsspannung wirkte sich der Verzicht auf eine sauerstoffpermeable Membran nicht negativ auf die Messergebnisse aus, wenn im Zellkulturmedium gemessen wurde [50, 106]. Die Sensoren wurden einzeln mit einem kommerziellen Potentiostaten vermessen. Die multiparametrische Instrumentierung wurde nicht thematisiert [50].

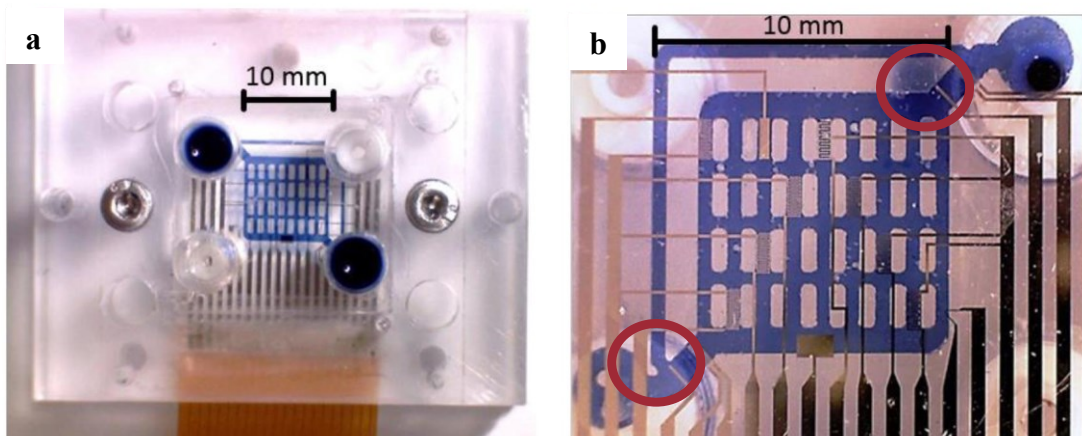


Abbildung 20: a) Über dem Sensorchip wird eine Mikrofluidik platziert. Die Elektroden wurden mit einem angelöteten Flachbandkabel kontaktiert (unten Mitte). b) Sensorchip und Fluidik wurden mit gefärbter Flüssigkeit befüllt und von unten fotografiert. Die thermoelektrischen Pumpen sind rot markiert [50].

Eine Besonderheit des Sensorchips von Bonk et al. ist die Integration einer thermoelektrischen Pumpe, die weder auf zusätzliche Prozessschritte noch auf mechanische Komponenten angewiesen ist. Messmedium kann mit ihr über den Bypass (links oben in Abbildung 20b) gepumpt werden und so die Mikrokanäle durchströmen. Als Pumpe wurden zwei Anordnungen aus jeweils zwei Elektroden hergestellt. Je eine dieser Elektroden wurde als Mäanderstruktur ausgeführt, um gleichzeitig als Heizelement zu dienen. Die Mikropumpe benötigt zum Betrieb einen Temperaturgradienten und hochfrequente elektrische Felder zwischen den Elektroden [106, 107].

Eine weitere Implementierung von Sensoren für die Messung von pH-Wert, Kalium, Natrium und Sauerstoff in einem mikrofluidischen Kanal wurde in [108] demonstriert. Mehrere streifenförmige Goldelektroden mit variierender Breite wurden auf eine Kapton-Folie aufgedampft. Die Abdeckung der Zuleitung erfolgte mit druckempfindlichem Klebstoff in Form einer Folie und bildete gleichzeitig den Kanal. Als Abdeckung des Kanals diente eine

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Folie aus Cyclo-Olefin-Copolymer. Für jeden Sensor wurde eine eigene Pseudoreferenzelektrode aus Silber-Silberchlorid galvanisch hergestellt. Die Sauerstoffmessung erfolgte mittels des direkt amperometrischen Messprinzips. Die übrigen Parameter wurden mit ionenselektiven Membranen potentiometrisch gemessen. Um die Haftung und Performanz der Membranen zu verbessern, wurde das leitfähige Polymer Polypyrol galvanisch auf den entsprechenden Elektroden abgeschieden. Die potentiometrischen Sensoren zeigten ein lineares Verhalten. Es wurden jedoch nur Daten zur Langzeitstabilität der Referenzelektroden präsentiert. Die Sensoren wurden einzeln mit einem Potentiostaten vermessen.

3.5.5 Kommerzielle Messsysteme

Im folgenden Abschnitt werden mehrere kommerziell verfügbare Messsysteme beschrieben. Die Darstellung verfolgt als einziges Ziel den Stand der Technik, um jene Systeme zu erweitern, die nicht in der Literatur beschrieben sind, jedoch als erwerbliche Messsysteme in vielen Laboren Anwendung finden.

Die Beschreibung erfolgt aus rein wissenschaftlichem Interesse und wurde nach bestem Wissen recherchiert. Eine Haftung für die Korrektheit oder die Vollständigkeit der nachfolgenden Auflistung schließe ich als Autor hiermit aus.

3.5.5.1 Optische Messung

Die Oberflächeninteraktion zwischen Substrat und Zelle kann neben den elektrochemischen Methoden auch optisch bestimmt werden. Die Firma General Electric bietet hierfür die Produktreihe Biacore® an, die auf Messung der Oberflächenplasmonenresonanz beruht [21]. Die Firma Corning vertreibt ein Gerät namens Epic®, das auf einem „Resonant Waveguide Grating Sensor“ beruht [17, 21]. Ein ähnliches System ist der Bind® Reader der Firma SRU Biosystems [21], das aber zum aktuellen Zeitpunkt nicht mehr produziert wird.

Die Firma Seahorse Bioscience hat mit ihren XF-Analyzer-Systemen ein interessantes und in zahlreichen Publikationen verbreitetes System entwickelt. Mit fotochemischen Sensoren (Optoden) für pH-Wert und Sauerstoffgehalt sowie einer speziellen Mikrotiterplatte mit beweglichem Verdrängungskörper können Ansäuerungs- und Sauerstoffverbrauchsdaten von kultivierten Zellen gemessen werden. Das System wird in den Arbeiten [24, 69, 109, 110] ausführlich behandelt.

Die Firma HP-Medizintechnik hat in Kooperation mit dem Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik (TU München) ein System entwickelt, das ebenfalls Optoden für die Messung von Ansäuerungs- und Sauerstoffverbrauchsdaten in Mikrotiterplatten verwendet. Im Gegensatz zum XF-Analyzer wird der Austausch des Kulturmediums mit einem integrierten Pipettierroboter vollzogen. Dadurch können Experimente mit einer Dauer von mehreren Tagen realisiert werden [20, 111]. Es wurden verschiedene Versionen des Gerätes entwickelt, die neben der fotochemischen Sensorik auch über ein Mikroskop [69] und elektrochemische Sensoren für ECIS-Messungen [21] verfügen. Das System wird im Detail in Abschnitt 3.5.6.4 besprochen.

Die Firma m2p-labs hat das BioLector-System auf den Markt gebracht, das mit ähnlichen Sensoren ausgestattet ist. Die Mikrotiterplatten verfügen über keinen Verdrängungskörper und die Optoden für pH und Sauerstoffgehalt befinden sich auf dem durchsichtigen Boden der Platte. Das System kann deswegen keine Ansäuerungsdaten mit hoher zeitlicher Auflösung aufzeichnen und ist eher für die Optimierung von Bioreaktorprozessen gedacht. Eine Erweiterung zu dem System ist der RoboLector, der eine automatisierte Beprobung mit einem Pipettierroboter ermöglicht. Details finden sich in den Arbeiten [24, 69, 109].

Ein weiteres System, das Optoden zur Überwachung von Bioreaktoren einsetzt, ist der 2mag Bioreactor der Firma 2mag. Neben den fotochemischen Sensoren zur Messung von Sauerstoffgehalt und pH-Wert, verfügt das Gerät über eine Temperaturregelung, integrierte Magnetrührorgane sowie ein steriles Begasungssystem [112]. Das System wird in unterschiedlichen Versionen mit acht oder mit 48 Kanälen angeboten.

3.5.5.2 Elektrochemische Messung

Die ersten kommerziellen Systeme mit elektrochemischen Sensoren beruhen auf der LAPS-Technologie. Ab 1990 wurde das Cytosensor Microphysiometer von der Firma Molecular Devices [71] vertrieben. Im Jahr 1995 folgte das Potentiometric Alternating Biosensor System [55] der Firma Technobiochip. Beide Systeme wurden bereits in Abschnitt 3.5.2.1 behandelt. Sie werden beide nicht mehr vom Hersteller angeboten. Dennoch wurde zumindest der Cytosensor oft genug verkauft, sodass sich auch heute noch gebrauchte Systeme erwerben lassen.

Wolf et al. veröffentlichten im Jahr 1998 das PCM (Physiocontrol-Microsystem) [113]. An der TU München wurde das System zum TUM-Screen weiterentwickelt. Basierend auf diesen Vorarbeiten entwickelte die Firma Cellasys GmbH in enger Kooperation mit Wolfs

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Arbeitsgruppe das „Intelligent Mobile Lab“ oder „IMOLA-IVD“. Das System wird seit 2008 bis heute kommerziell durch die Cellasys angeboten. In Abschnitt 3.5.6.1 findet sich eine tiefergehende Beschreibung des IMOLA-IVD.

Die Firma PAN Systech bietet mit ihrem System PANsys 3000 ein vollautomatisiertes Zellkultursystem an. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mit Medium versorgt und können mit einem automatisierten Mikroskop beobachtet werden. Das System unterstützt zudem die multiparametrische Messung von pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Impedanz in jeder einzelnen Zellkulturkammer. Mittlerweile sind diese Sensoren auch für das neue Modell PANsys 4000 verfügbar [17, 109].

Ein weiteres Gerät zur multiparametrischen Messung von zellphysiologischen Vorgängen ist das Bionas DiscoveryTM 2500 der Firma Bionas. Das System verwendet einen Siliziumchip zur Messung von pH, Sauerstoffgehalt und der Impedanz und basiert auf Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Bernhard Wolf (siehe Abschnitt 3.5.4) [24, 69, 109].

Das Bionas-System wurde in einigen aktuellen Veröffentlichungen behandelt [114–117] und zur Untersuchung von Gewässern auf Schadstoffe [114] oder als zellbasierter Gassensor [115] verwendet. Mittlerweile ist das System jedoch nicht mehr am Markt verfügbar.

Systeme für die Impedanzmessung an Zellen werden mittlerweile von mehreren Unternehmen kommerziell angeboten. Die wichtigsten Vertreter sind das ECIS-System der Firma Applied Biophysics (gegründet von den ECIS-Entdeckern Ivar Giaever und Charles R. Keese) [17, 69, 109, 118] und das xCELLigence RTCA von ACEA [17, 69]. Das bereits erwähnte Unternehmen Bionas bietet unter dem Produktnamen „Bionas DiscoveryTM adcon reader“ ein weiteres ECIS-System für die Messung mit 96-fachen Mikrotiterplatten an [69]. Die Firma nanoAnalytics hat das Gerät cellZscope im Portfolio, mit dem der transephitele Widerstand von zellbewachsenen Membranen gemessen werden kann [69, 109].

Das von Molecular Devices vertriebene CellKey-System war eine Hochdurchsatzplattform für ECIS-Messungen mit 384-fachen Mikrotiterplatten [17, 21]. Das System ist kommerziell nicht mehr verfügbar.

Ein weiteres System wurde 2013 von der Firma Nanion vorgestellt. Es trägt den Namen CardioExcyte und ist für die Messung an Kardiomyozyten ausgelegt. Neben der Impedanzmessung unterstützt es auch die Aufzeichnung von extrazellulären Feldpotentialen (EFP). Beide Parameter werden mit einer hohen zeitlichen Auflösung von 1 ms erfasst. Somit können sowohl die Verformungen der schlagenden Herzmuskelzellen als auch ihre

Aktionspotentiale simultan überwacht werden. Durch die multiparametrische Messung können mehr Parameter für die Auswertung der zellulären Reaktion auf zugegebene Wirkstoffe herangezogen werden [119, 120].

3.5.5.3 Kalorimetrische Messung

Die schwedische Firma SymCel hat ein isothermes Mikrokalorimeter für die Untersuchung lebender Zellen entwickelt und unter dem Namen CalScreener™ kommerzialisiert. Der CalScreener™ verwendet eine spezielle 48-fache Mikrotiterplatte, um eine ausreichende Parallelisierung der Versuche zu gewährleisten. Das System misst die Abwärme der biologischen Probe und schließt so auf die metabolische Aktivität. Der CalScreener™ wurde bereits erfolgreich zur Messung der zellulären Aktivität und zur Detektion von Bakterien [121, 122] verwendet. Ebenfalls wurde das Gerät zur Untersuchung an parasitären Würmern [122] eingesetzt. Für eine detaillierte Beschreibung von System und Messprinzip sei auf die Veröffentlichung von Wadsö et al. [121] verwiesen.

3.5.6 Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe

Die an dieser Stelle beschriebenen Vorarbeiten beziehen sich auf Forschungsaktivitäten, die am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik (LME) an der TU München unter Leitung von Professor Bernhard Wolf durchgeführt wurden.

Das von Wolf et al. beschriebene multiparametrische Messsystem für zellphysiologische Vorgänge (siehe Abschnitt 3.5.4) wurde an der TU München zum TUM-Screen weiterentwickelt. Der TUM-Screen hat einen modularen Aufbau und sieht den parallelen Betrieb von bis zu sechs Auslesesystemen in einem speziell angepassten Inkubator (Wärmeschrank) vor. In jedes Auslesesystem lässt sich ein Sensorchip einlegen, der über Sensoren für die Parameter pH, Sauerstoff und Impedanz verfügt. Auf die Sensorchips wird in Abschnitt 3.5.6.2 genauer eingegangen. Das Nährmedium zur Versorgung der Zellen wird mittels integrierter Pumpen über ein Schlauchsystem zu den Chips transportiert [123].

Ein entscheidendes Problem des TUM-Screens war die Abwärme der Elektronik der einzelnen Auswerte-Einheiten, die zu unkontrollierter Erwärmung des Sensorchips und zu Zellschädigung führen konnte. Das System war darüber hinaus zu sperrig für einen mobilen Einsatz und gleichzeitig unterdimensioniert, um ausreichend hohe Probendurchsätze (z. B. für Verdünnungsreihen bei Toxizitätsbestimmungen) zu ermöglichen.

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Zur Lösung dieser Probleme wurden zwei neue Messsysteme entwickelt: Das „Intelligent Mobile Lab“ oder „IMOLA-IVD“ sollte einen flexibleren und sogar mobilen Einsatz der Zellchiptechnologie ermöglichen. Ergänzend sollte mit dem „Intelligent Microplate Reader“ bzw. „IMR“ ein System für höheren Durchsatz von 24 Proben pro Experiment geschaffen werden.

3.5.6.1 Das intelligente mobile Labor

Das IMOLA-IVD wurde so ausgelegt, dass es sowohl in einem Inkubator als auch außerhalb verwendet werden kann, um einen flexiblen Einsatz im Labor zu gewährleisten. Wie das Vorgängersystem ist es in der Lage, die Parameter pH, Sauerstoff und Impedanz simultan zu messen. Das System besteht aus den folgenden Komponenten:

1. Der Biochip ist ein Glas- oder Keramikchip mit aufgebracht Sensoren (siehe Abschnitt 3.5.6.2).
2. Die Auswerte-Einheit stellt die elektrische Verbindung zur Sensoreinheit her und beinhaltet die Instrumentierung (siehe Abschnitt 3.8.5) der Sensoren.
3. Die Fluidik umfasst alle Komponenten wie Schläuche, Pumpen und Vorratsgefäße, die für die Versorgung der Zellen auf dem Biochip zuständig sind.
4. Das externe Netzteil stellt die benötigten DC-Versorgungsspannungen bereit.
5. Die PC-Software verarbeitet die von der Auswerte-Einheit versendeten Rohdaten und stellt diese dem Benutzer in angemessener Form dar.

Das Messprinzip des IMOLA-IDV ist analog zum Cytosensor (vgl. Abschnitt 3.5.2.1) gestaltet. Das Volumen der Zellkulturkammer wird über einen Einsatz verkleinert. Eine Pumpe tauscht in regelmäßigen Abständen von ungefähr fünf bis zehn Minuten das Medium in der Zellkulturkammer aus. Während die Pumpe stillsteht, werden die relative Änderung der Messwerte von pH- und Sauerstoffsensoren zur Berechnung der zellulären Ansäuerungsrate sowie der Sauerstoffverbrauchsrate verwendet.

Schmidhuber entwickelte das System zu einem akkubetriebenen und mobil einsetzbaren Handgerät weiter [17]. Das Gerät zeichnet sich durch ein effektiveres Powermanagement und die Verwendung von stromsparenden Komponenten aus. Auf die verwendete Messtechnik wird in Abschnitt 3.8.5 eingegangen.

3.5.6.2 Sensortechnologie und Biochips am Lehrstuhl für medizinische Elektronik der TU München

Am Lehrstuhl für medizinische Elektronik wurden verschiedene Sensorchips für die Messung an lebenden Zellen entwickelt und getestet. Die Sensoren lassen sich in folgende drei Kategorien aufteilen:

1. Die siliziumbasierten Sensorchips verwenden ionenselektive Feldeffekttransistoren für die Messung des pH-Wertes [3, 124] und des Sauerstoffgehalts [23] sowie Dioden zur Messung der Temperatur [124]. Für die Impedanzmessung werden metallische Leiterbahnen auf dem Siliziumchip integriert. Die Herstellung erfolgt mit Prozessen aus Halbleiterfertigung.
2. Auf einem Glas- oder Keramiksubstrat werden Edelmetallelektroden und deren Zuleitungen aufgedampft (oder aufgesputtert). Zur Herstellung der pH-Sensoren wird zusätzlich eine Metalloxidschicht auf die Elektrode gesputtert. Die Zuleitungen werden mit einem Isolator (häufig SU-8 Fotolack) abgedeckt, sodass nur die Elektrodenfläche mit dem Messmedium in Berührung kommt [22].
3. Gedruckte Sensorfolien [125] werden auf günstigen Kunststoffsubstraten gefertigt. Die Elektroden und die Isolierung werden mit einem speziellen Inkjet-Drucker aufgebracht.

3.5.6.3 Glas- und keramikbasierte Sensorchips

Aufgedampfte Elektroden auf Glas- oder Keramiksubstraten können reproduzierbarer hergestellt werden als gedruckte Sensoren. Gleichzeitig ist die Fertigung günstiger als bei siliziumbasierten Sensoren, da weniger Prozessschritte nötig sind. Ein weiterer Vorteil von glasbasierten Sensorchips ist ihre optische Transparenz, die den Einsatz von Mikroskopen ermöglicht.

Die Herstellung der Glas- und Keramikchips sowie ihre Einbindung ins Messsystem wurden in der Dissertation von Johann Reßler [22] ausführlich beschrieben. In derselben Arbeit wurde des Weiteren die Eignung von gesputtertem Rutheniumoxid als pH-Sensor untersucht. Die Sauerstoffsensoren wurden von Joachim Wiest [23] charakterisiert.

Reßler unterscheidet Biochips mit Gehäuse und ohne Gehäuse. Chips ohne Gehäuse benötigen eine spezielle Aufnahmevorrichtung. Ein Nachteil dieser Vorrichtung ist, dass Undichtigkeiten auftreten können, wenn die Sensoren nicht sorgfältig genug eingebaut werden. Der typische Aufbau eines Sensorchips mit Gehäuse ist in Abbildung 21 zu erkennen. Der Sensorchip wird auf ein PCB (die Trägerplatine) aufgeklebt. Auf dieser Trägerplatine befinden sich Leiterbahnen und Durchkontaktierungen zur Unterseite. Die Verbindung zwischen den

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

Leitungen auf dem Sensorchip und dem PCB wird mittels Draht-Bonding hergestellt. Auf der PCB-Unterseite befinden sich offenliegende Kontakte, die über eine geeignete Kontaktvorrichtung (in diesem Fall ein PLCC68-Chipsocket) elektrisch verbunden werden können. Ein Kunststoffgehäuse aus Polycarbonat bildet die Zellkulturkammer und schützt sowohl das PCB als auch die Bond-Verbindung vor Feuchtigkeit.

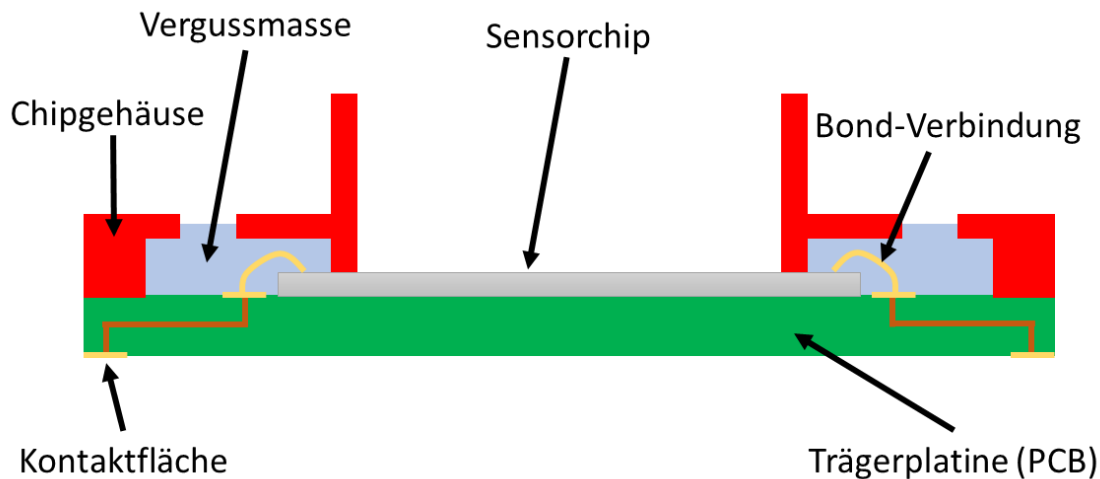


Abbildung 21: Aufbau eines Sensorchips mit Gehäuse: Ein Sensorchip wird über Draht-Bonden mit der Trägerplatine verbunden. Das Chipgehäuse und die Vergussmasse schützen die Bond-Verbindungen vor Feuchtigkeit und bilden die Zellkulturkammer (angelehnt an [22]).

Das Layout der ersten Metallisierungsschicht eines häufig eingesetzten Biochips wird in Abbildung 22 gezeigt. In der Mitte des Sauerstoffsensors befinden sich drei Platinelektroden, die eine direkt amperometrische Messung nach dem Ross-Prinzip (siehe 3.6.2.1 und 3.6.2.2) ermöglichen. Die beiden geschlossenen Ringstrukturen sind Zuleitungen, auf die Rutheniumoxid als pH-Sensor aufgesputtert wird. Die Referenzelektrode für die pH-Messung wird üblicherweise nicht auf dem Biochip, sondern in den Ablauf der Fluidik integriert. Der Temperatursensor ist ein PT1000 und wurde mit einer feinen mäanderförmigen Leiterbahn realisiert. Zwei große interdigitierende Fingerelektroden bedecken den größten Teil des Sensorchips und werden für die ECIS-Messung verwendet. Da die beiden Elektrodenpaare unterschiedliche Flächen und Form haben, sind die gemessenen Werte nur bedingt vergleichbar. Die übrigen Elektroden werden hauptsächlich für Test- und Forschungszwecke eingesetzt. Die Elektrodenzuleitungen sowie der gesamte Temperatursensor sind mit SU-8-Lack bedeckt.

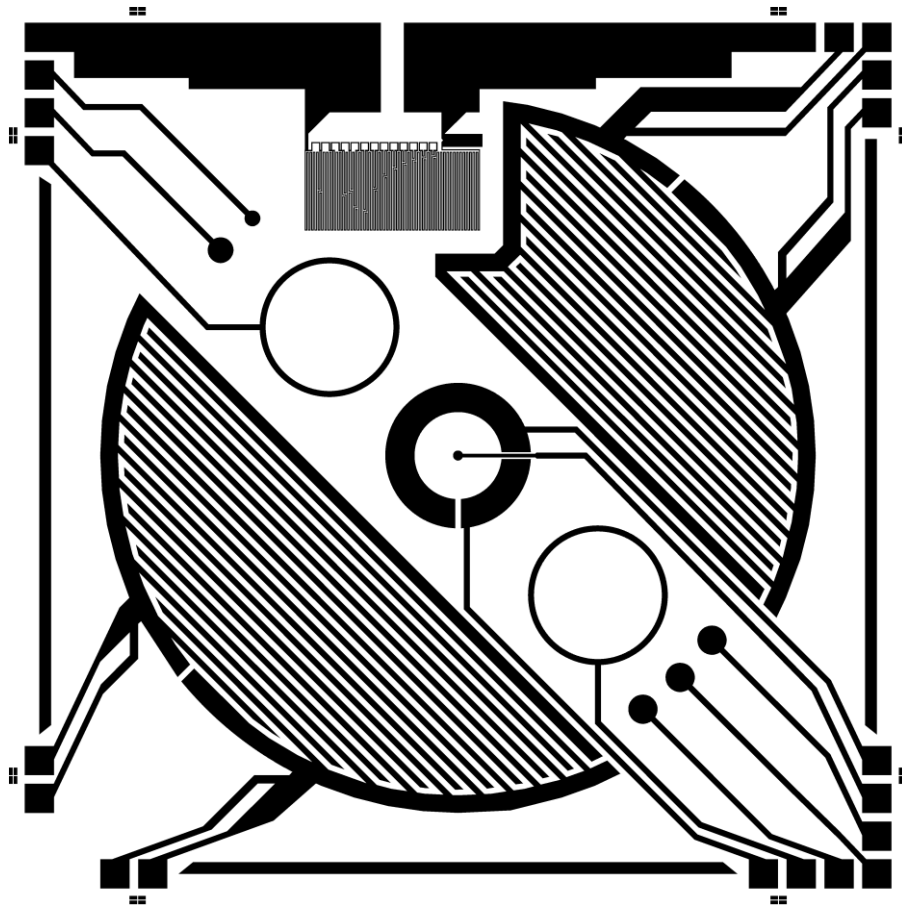


Abbildung 22: Weiterentwicklung des von Reßler [22] vorgestellten Sensorchips. Der gezeigte Chip wird üblicherweise auf Keramiksubstrat gefertigt und hat eine Kantenlänge von 7,65 x 7,65 mm (Forschungsgruppe Bernhard Wolf, LME).

Durchgeführte Messungen zeigten, dass die Standfestigkeit der pH-Elektroden im Vergleich zu den zuvor verwendeten ISFET erhöht war. Dennoch wurde von Ausfällen des Messsystems berichtet, die auf das Versagen der Isolation der elektrischen Kontakte zurückzuführen war [22].

Auch Schmidhuber wies auf Probleme bei seinen Messungen mit diesem Biochip hin. Hauptursachen waren der schlechte Kontakt zwischen Chipaufnahme und Trägerplatine, abgelöste Bonding-Drähte und die Inhomogenität des SU-8-Lacks, der als Isolator auf dem Biochip aufgebracht wurde. Lediglich bei der Sauerstoffmessung werden Prozesse an der Sensorelektrode für altersbedingte Ausfallerscheinungen verantwortlich gemacht [17].

3.5.6.4 Intelligent Microplate Reader

Der Intelligent Microplate Reader (IMR) entstand aus der Idee, zellphysiologische Vorgänge mit höherem Probendurchsatz und größerer Stichprobenzahl multiparametrisch zu messen. Zusätzlich sollte auch die automatisierte mikroskopische Betrachtung der Zellen ermöglicht

3.5 Messmethoden, Systeme und Sensoren für die markierungsfreie Zellanalytik

werden, was bei IMOLA und μ LA im laufenden Betrieb nicht möglich war. Das IMR löst diese Probleme, indem statt einzelner Sensorchips eine sensorbestückte Mikrotiterplatte verwendet wird, die 24 separate Proben aufnehmen kann.

Das IMR ist modular aufgebaut und besteht aus folgenden Komponenten:

1. Zellkulturinkubator für die korrekte Klimatisierung der Zellkultur
2. Pipettierroboter für den Austausch des Kulturmediums
3. „Intelligent Multiwell Plate“ (iMWP) mit integrierten Sensoren für pH-, Sauerstoff- und Impedanzmessung in 24 Kammern (siehe 3.5.6.5)
4. Modul für Impedanzmessungen zwischen 100 Hz und 100 kHz [69]
5. Automatisiertes Mikroskop für die Erstellung mikroskopischer Aufnahmen sowie für die Auslesung der fotochemischen Sensoren
6. Messumformer für die fotochemische Messung von pH und Sauerstoff von der Firma Presens (wird in das Mikroskop eingekoppelt)
7. Beleuchtungseinheit an der Decke des Inkubators für die Beleuchtung während der mikroskopischen Aufnahmen
8. IMROS-Software zur Steuerung des IMR sowie zur Datenauswertung und Darstellung der Messergebnisse

Ähnlich wie beim Cytosensor und IMOLA basiert das Messprinzip des IMR auf einem periodischen Austausch von Messmedium in einer Zellkulturkammer mit kleinem Volumen. Gleichzeitig werden kontinuierlich der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt gemessen. Im Gegensatz zum IMOLA wird auf Schläuche und Pumpen verzichtet, da die Fluidik in der Mikrotiterplatte integriert ist (siehe Abschnitt 3.5.6.5). Es wird jedoch ein Pipettierroboter benötigt, der in periodischen Abständen von etwa zehn bis zwanzig Minuten das Medium austauscht. Simultan wird eine ECIS durchgeführt, die nur geringfügig vom Medienwechsel beeinflusst wird.

Das IMR wurde erst vor kurzem sehr ausführlich in einer Dissertation [69] von Franz Demmel diskutiert. Für Details sei auf diese Arbeit verwiesen.

3.5.6.5 Die intelligente Mikrotiterplatte

Die iMWP verfügt über 24 Kavitäten, in denen Zellen kultiviert werden können. In jedem dieser Zellkulturgefäße befinden sich fotochemische Sensoren für die pH- und Sauerstoffmessung sowie interdigitierende Elektrodenstrukturen für die ECIS-Messung. Das Volumen dieser Kavitäten wird über Verdrängungskörper reduziert, die sich im Deckel der Platte befinden. Um

das Medium in den Zellkulturkammern auszutauschen, sind diese über Mikrokanäle jeweils mit zwei Nebenkammern verbunden. Diese können mit dem Pipettierroboter erreicht werden. Eine Kammer dient der Zugabe von frischem Medium und die andere zur Entnahme von verbrauchtem Medium. Abbildung 23 zeigt schematisch einen Schnitt durch eine der 24 Kavitäten.

Aus der runden Geometrie der Hauptkammer – in Verbindung mit den sehr schmalen Kanälen zu den Nebenkammern – ergeben sich unvorteilhafte Strömungseigenschaften. Der Austausch von Messmedium ist dadurch ineffizient gestaltet. Dieses Problem wurde in der Dissertation von Cornelia Pfister thematisiert und mit einer neuen Geometrie der Kammern gelöst [24].

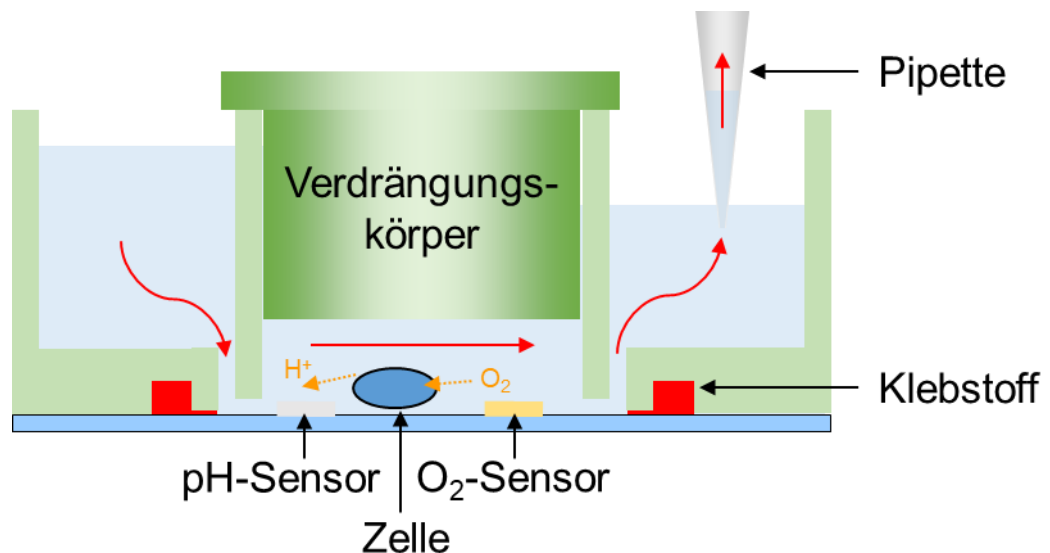


Abbildung 23: Schematische Nachbildung einer der 24 Kavitäten der intelligenten Mikrotiterplatte (angelehnt an [69]). In der Hauptkavität (Mitte) werden Zellen angesiedelt, die das Medium ansäuern und Sauerstoff verbrauchen. Das Volumen der Hauptkavität wird mittels eines Verdrängungskörpers reduziert, um diesen Effekt zu verstärken. Über die Nebenkammern (rechts und links) kann das Nährmedium in der Hauptkammer ausgetauscht werden.

3.6 Elektrochemische Sensorik

3.6.1 pH-Sensoren

Die extrazelluläre Ansäuerungsrate einer Zellkultur ist ein zentraler Indikator für den zellulären Metabolismus. Aus diesem Grund unterstützen viele der in Abschnitt 3.5 vorgestellten Systeme die pH-Messung in der Zellkulturkammer.

Der absolute pH-Wert einer Lösung kann nur kompliziert mit einer Wasserstoffelektrode gemessen werden [80]. Sie gilt als der Goldstandard für die pH-Bestimmung, ist aber auf den Betrieb mit gasförmigem Wasserstoff angewiesen. Alle anderen Elektroden müssen mit entsprechenden Testlösungen, deren pH-Wert bekannt sein muss, kalibriert werden. In der praktischen Labortechnik finden überwiegend Glaselektroden Anwendung. Durch die Integration von Glaselektrode und Referenzelektrode zu einer sogenannten Einstabmesskette ist die Verwendung dieser Elektroden besonders praktisch und liefert gute Ergebnisse.

Obwohl eine kalibrierte Glaselektrode den pH in vielen Fällen über einen weiten Bereich messen kann, ist sie nicht für alle Einsatzzwecke die optimale Lösung: Glaselektroden sind beispielsweise nicht für die Messung in fluoridhaltigen Medien geeignet und können Querempfindlichkeiten zu Alkalimetallionen haben, wenn diese in hohen Konzentrationen vorliegen. Sie sind zerbrechlich und schlecht miniaturisierbar, was den Einsatz in vivo oder bei hohen Drücken erschwert [126].

Im nachfolgenden Abschnitt werden weitere pH-empfindliche Elektroden vorgestellt. Hierbei beschränkt sich die Auflistung auf die pH-sensitive Halbzelle des pH-Sensors. Um einen zuverlässigen pH-Sensor zu erhalten, ist weiterhin eine stabile Referenzhalbzelle bzw. Referenzelektrode notwendig. Diese Elektrode hat in vielen Fällen einen großen Einfluss auf den Messfehler [127] und wird deshalb in Abschnitt 3.6.3 separat behandelt.

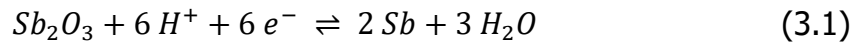
3.6.1.1 Miniaturisierbare pH-Sensoren

Um die genannten Probleme der Glaselektrode für besondere Spezialanwendungen zu umgehen, wurden alternative pH-Sensoren entwickelt, die eine bessere Miniaturisierung bzw. Integration erlauben. In diesem Abschnitt sollen verschiedene elektrochemische pH-Sensoren und ihre Eignung für die Untersuchung an Zellen zusammengefasst werden.

Antimon-Elektrode

Die Antimon-Elektrode war die erste Alternative zur Glaselektrode und beruht auf einem pH-abhängigen Redoxgleichgewicht zwischen Antimon und Antimonoxid [126, 128]. Die

Reaktionsgleichung (3.1) lässt über die Nernst-Gleichung [93, 129] auf ein Elektrodenpotential schließen, das sich bei Raumtemperatur mit etwa -58,2 mV pro pH-Dekade ändert.



Die Antimon-Elektrode wurde für die Messung des intrazellulären pH-Wertes, für In-vivo-Messungen und als Transducer für ureasebasierte Biosensoren verwendet [126]. Da das Potential der Antimon-Elektrode sauerstoffabhängig [80] und Antimon als toxisch eingestuft ist [130], wird sie in dieser Arbeit nicht verwendet.

ISFET

Mit dem enormen Wachstum der Halbleiterindustrie rückten auch halbleiterbasierte Sensoren in den Vordergrund der Forschung. Unter den chemischen Sensoren sind die ionensensitiven Feldeffekttransistoren (ISFET) ein bekanntes Beispiel. ISFET können biokompatibel hergestellt werden, sind pH-sensitiv und sehr gut miniaturisierbar. Deswegen werden sie häufig als pH-Sensor in Zellkulturgefäßen eingesetzt [95, 96, 131, 132]. ISFET wurden intensiv erforscht und werden von mehreren Unternehmen kommerziell angeboten [133]. Das Messprinzip beruht auf dem sogenannten Site-Binding-Modell [134]: Entfernt man die Gate-Elektrode eines MOSFET und taucht diese in eine Lösung, bildet sich zwischen dem Isolator (z. B. SiO₂ oder Al₂O₃) und dem Elektrolyt eine pH-abhängige Potentialdifferenz aus. Dies liegt daran, dass sich an der Oberfläche des Oxids OH-Gruppen mit amphoterem Charakter ausbilden (sie können also H⁺ aufnehmen oder abgeben) und so die Oberflächenladung des Isolators pH-abhängig ändern. Die Änderung des Grenzflächenpotentials zwischen Isolator und Elektrolyt bewirkt eine Änderung der Schwellenspannung (U_{th}) des Transistors und kann mit einer geeigneten Beschaltung elektrisch gemessen werden.

Eine andere Möglichkeit die Schwellenspannung eines Feldeffekttransistors zu ändern, ist die Anpassung der Austrittsarbeit des Gates. Ein auf diesem Prinzip basierender Sensor ist der ^EMOSFET, bei dem ein leitfähiges und redoxaktives Material über die Oxidschicht eines ISFET aufgetragen wird. Wird das Gate-Material chemisch oder elektrochemisch verändert (z. B. reduziert oder oxidiert), ändert sich die Austrittsarbeit [133, 135, 136]. Die Messung dieser Änderung konnte verwendet werden, um einen stabilen pH-Sensor auf Basis eines ^EMOSFET mit Iridiumoxid-Gate zu erhalten [137, 138].

Für zusätzliche Details und eine weitreichende Zusammenfassung der theoretischen Hintergründe über ISFET sei auf das exzellente Review von Piet Bergveld [133] verwiesen.

3.6 Elektrochemische Sensorik

LAPS

Licht adressierbare potentiometrische Sensoren (LAPS) sind ebenfalls halbleiterbasierende pH-Sensoren. LAPS sind einfach zu miniaturisieren und ermöglichen eine orts aufgelöste Messung des pH-Wertes. Das Messprinzip lässt sich leicht am Beispiel einer in Sperrichtung vorgespannten Fotodiode erklären. Bei der Fotodiode ist der fließende Strom eine Funktion aus einfallendem Licht und der Vorspannung. Beim LAPS setzt sich diese Vorspannung aus der extern angelegten Spannung sowie dem Oberflächenpotential des LAPS zusammen. Da das Oberflächenpotential pH-abhängig ist, kann der pH-Wert über die Messung des Fotostroms bestimmt werden. Üblicherweise wird der LAPS mit einer gepulsten oder sinusförmig modulierten LED beleuchtet. Dies hat den Vorteil, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mittels eines Lock-in-Verstärkers wesentlich verbessert wird. Dies ermöglicht eine hochauflösende Messung von sehr kleinen pH-Änderungen. Weiterführende Details finden sich in der entsprechenden Literatur: [40, 42, 71, 100, 102].

Leitfähige Polymere

Leitfähige Polymere können ebenfalls als pH-Sensor eingesetzt werden. Hierbei können die halbleitenden Eigenschaften ausgenutzt werden, um einen ionensensitiven organischen Feldeffekttransistor, analog zum ISFET, zu entwickeln [52, 125, 139]. Eine andere Möglichkeit ist die Messung des elektrochemischen Potentials eines leitfähigen Polymers, das abhängig vom pH-Wert protoniert bzw. deprotoniert wird. Polyanilin ist ein bekanntes Beispiel für ein solches pH-sensitives Polymer [140, 141]. Auch wenn die erreichten Resultate vielversprechend sind, treten Probleme im Bereich der Langzeitstabilität [141] und Querempfindlichkeit auf, vor allem wenn redoxaktive Substanzen in der Lösung vorhanden sind. Bessere Eigenschaften konnten mit elektrochemisch abgeschiedenen Polymeren erzielt werden [141–143].

Metalloxide

Weitere Kandidaten für pH-sensitive Elektroden sind halbleitende Metalloxide. Verschiedene dieser Metalloxide wurden von Fog und Buck auf ihre Eignung als pH-Sensor untersucht [144]. Ein nennenswertes Beispiel ist hierbei Rutheniumoxid [22]. Da es industriell, in Form einer keramischen Paste, zur Herstellung von Widerständen verwendet wird, können pH-Sensoren mit einem ähnlichen Verfahren sehr günstig gedruckt werden. Diese Methode wurde in den letzten Jahren vermehrt zur Herstellung von Low-Cost-Sensoren eingesetzt [145, 146]. Reßler stellte fest, dass Rutheniumoxid gute pH-sensitive Eigenschaften hat, jedoch eine hohe Sauerstoffquerempfindlichkeit von $0,028 \frac{[pH]}{\% [pO_2]}$ aufweist [22]. Eine hohe Querempfindlichkeit auf Sauerstoff wird auch in [80] bestätigt.

Ein weiteres gut geeignetes Metalloxid mit ähnlichen Eigenschaften ist Iridiumoxid. Dieses Metalloxid hat sich als pH-Sensor in der Biotechnologie bewährt, da es neben guten Sensoreigenschaften auch biokompatibel ist. Iridiumoxid basierende pH-Sensoren können sehr geringe Drift-Raten haben, sie verhalten sich weitgehend linear, haben eine kurze Einschwingzeit und neben geringer Querempfindlichkeit ein reproduzierbares Verhalten [80, 81, 144, 147–150]. Die Verträglichkeit von Iridiumoxid beim Einsatz in der Zellkultur wurde in mehreren Systemen gezeigt [66, 105, 150–153]. In der Literatur finden auffallend viele kontroverse Ergebnisse zu den sensorischen Eigenschaften dieses Materials. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Eigenschaften stark vom Herstellungsverfahren der Iridiumoxid-Elektrode abhängen [126]. Auf Grund dieser Komplexität und der Bedeutung von Iridiumoxid für diese Arbeit, wird es in den Abschnitten 3.6.1.2 bis 3.6.1.6 im Detail behandelt.

3.6.1.2 Herstellungsmethoden und Eigenschaften des Iridiumoxids

Verglichen mit Rutheniumoxid hat Iridiumoxid eine geringere Querempfindlichkeit auf Sauerstoff [126, 154] und kann galvanisch auf sehr kleinen Elektroden [58, 155, 156] aufgebracht werden. Aus diesen Gründen hat es für diese Arbeit besondere Bedeutung und wird in den folgenden Abschnitten detailliert behandelt.

Iridiumoxid kann auf verschiedene Weisen hergestellt werden:

TIROF und AIROF stehen für die thermische [157] bzw. elektrochemische [147] Überführung von metallischem Iridium in Iridiumoxid.

AEIROF bezeichnet die elektrochemische Abscheidung von Iridiumoxid aus einer geeigneten Lösung auf ein leitfähiges Material [158].

SIROF benennt die Aufbringung von Iridiumoxid mittels reaktiven Sputterns auf leitfähigen sowie isolierenden Substraten [159, 160].

Die Eigenschaften der entstandenen Iridiumoxidschicht sind dabei stark von der gewählten Methode abhängig [126, 161]. So lässt sich beispielsweise im Falle der thermischen Oxidation aus Iridium ein wesentlich stabilerer Sensor herstellen, wenn die Oxidation in einer Lithiumcarbonatschmelze durchgeführt wird [81].

Generell lassen sich zwei Arten von Iridiumoxidschichten unterscheiden: Wasserhaltiges und wasserfreies Iridiumoxid haben wesentliche Unterschiede in der Struktur und auch in den pH-sensitiven Eigenschaften. Wasserhaltiges Iridiumoxid, folgend als **Iridiumoxid-Hydrat** bezeichnet, ist wesentlich poröser und hat eine Dichte, die nur einem Fünftel des Iridiumoxid-Anhydrats entspricht [126, 162]. Bei der thermischen Herstellung sowie beim Sputtern

3.6 Elektrochemische Sensorik

entstehen wasserfreie Iridiumoxidschichten. Bei der elektrochemischen Oxidation (AIROF) und der galvanischen Abscheidung (AEIROF) bilden sich wasserhaltige Schichten [126]. Letztere sind dafür bekannt, dass sie eine höhere pH-Empfindlichkeit als die in der Nernstschen Gleichung vorausgesagten 58,2 mV/pH haben [126, 147, 148, 163–165]. Dies wird manchmal als super-Nernsches Verhalten bezeichnet [166] und suggeriert eine Abweichung vom theoretisch vorhergesagten Verhalten. Es ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass auch höhere Empfindlichkeiten mit der Nernst-Gleichung erklärt werden können, wenn mehr Protonen (H^+) als Elektronen (e^-) an der Redoxreaktion beteiligt sind [162, 167].

Kieninger zeigte, wie eine galvanisch abgeschiedene Iridiumoxidelektrode durch Wärmebehandlung bei 180 °C in den wasserfreien Zustand überführt werden kann. Auf diese Weise behandelte Elektroden verloren die besonderen Eigenschaften des Hydrats und verhielten sich wie wasserfreies Iridiumoxid [153].

Im Folgenden beschränken wir uns auf die elektrochemisch hergestellten und somit wasserhaltigen Iridiumoxidschichten. Der Fokus liegt auf galvanisch abgeschiedenem Iridiumoxid, wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

3.6.1.3 Elektrochemisch abgeschiedenes Iridiumoxid

Iridium (und ebenso Ruthenium) ist seltener als Gold und Platin [168] und entsprechend teuer. Es ist demnach sinnvoll, Herstellungsmethoden zu entwickeln, die Iridiumoxid auf günstigeren Substraten abscheiden können. Abscheidung durch reaktives Sputtern benötigt ein Iridium-Target und ist somit auch mit sehr hohen Investitionen verbunden.

Um eine günstige Herstellung kleiner Elektroden zu ermöglichen, wurden Methoden entwickelt, um Iridiumoxid galvanisch aus einer Lösung abzuscheiden. Die ersten hierfür entwickelten Lösungen waren jedoch weder stabil noch lagerfähig [158]. Sie führten nur kurz nach ihrer Herstellung zu erfolgreichen Abscheidungen und waren somit in der Praxis schwer zu handhaben. Erst als Yamanaka eine für mehrere Monate stabile Lösung entwickeln konnte [158], fand diese Methode rasche Verbreitung. Obwohl Yamanaka seine Methode im Kontext von Elektrochromismus für die Anwendung in Displays publizierte, wurde sie für viele biotechnologische Anwendungen adaptiert. Die häufigsten Anwendungsfälle sind pH-sensitive Elektroden [58, 105, 148, 150, 152, 153, 163, 169–176], Referenzelektroden [58, 83, 84] und Elektroden als Schnittstelle zu neuronalen Systemen [155, 156].

Die Eigenschaften der hergestellten Elektroden sind von den Abscheidungsparametern, wie Stromverlauf, Spannungsverlauf, Dauer der Abscheidung und Temperatur, aber auch vom

Substrat abhängig. Marzouk stellte beispielsweise die schlechte Haftung von Iridiumoxid auf blanken Platinelektroden fest [150], was die Stabilität des Elektrodenpotentials beeinträchtigt hat. Er untersuchte verschiedene Substrate und stellte fest, dass die Haftung auf Titan deutlich besser ist [169].

Die Haftung auf Materialien wie Gold und Platin kann mit nicht stationären Abscheidungsspannungen verbessert werden. Verschiedene Gruppen untersuchten dazu die Abscheidung mit gepulsten Spannungen [172, 173], mit periodisch durchlaufenden Spannungsverläufen [173] oder einer Kombination beider Methoden [156, 174]. Trotz besserer Haftung bei diesen Methoden, ist die benötigte Zeit für die Erzeugung einer ausreichend dicken Iridiumoxidschicht gegenüber einer Abscheidung mit konstantem Strom oder konstanter Spannung wesentlich höher. Dies liegt vor allem daran, dass die Abscheidung von Iridiumoxid effektiv nur in einem kleinen Potentialfenster stattfindet. Deshalb müssen viele (mindestens 50) Spannungszyklen durchlaufen werden, um vergleichbare Schichtdicken zu erhalten.

Jochen Kieninger erkannte, dass die Haftung sowohl von den Abscheidungsparametern als auch vom Substrat abhängt und konnte so eine effektive Methode für die Iridiumoxidabscheidung auf Platinelektroden entwickeln [105]. Er schied hierfür auf der Platinelektrode mittels fünf bis fünfzehn periodischer Spannungszyklen eine sehr dünne aber gut anhaftende Iridiumoxidschicht ab. Dann wechselte er auf eine konstante Spannung und konnte auf der bereits vorhandenen Grundschicht weiteres, gut haftendes, Iridiumoxid aufbringen. Die Beschichtung bei konstanter Spannung hat wesentlich höhere Abscheidungsraten und erzeugt so innerhalb von sechs bis zehn Minuten eine ausreichende Iridiumoxidschicht. Die so hergestellten Elektroden hatten innerhalb der ersten zwei Tage eine Drift von ungefähr 2 mV/h und zeigten danach ein sehr stabiles Verhalten mit einer Drift von unter 0,03 mV/h bzw. 0,7 mV pro Tag. Elektroden, die jeweils nach dieser Methode abgeschieden wurden, zeigten eine sehr reproduzierbare pH-Empfindlichkeit von $-66.1 \pm 2,2$ mV/pH, schwankten jedoch in ihrem absoluten Potential um bis zu 40 mV. Dies wurde gemäß den Beobachtungen von Elsen [173] mit leichten Variationen der Schichtdicke erklärt [105].

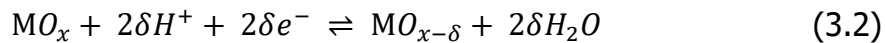
3.6.1.4 Potentialentstehung bei wasserhaltigem Iridiumoxid

Zu der Potentialentstehung bei hydriertem Iridiumoxid finden sich verschiedene Theorien [154, 166, 167]. Unterschiedliche Reaktionsmechanismen werden vorgestellt. Aus empirischer Sicht zeigt wasserhaltiges Iridiumoxid zwei charakteristische Eigenschaften, die es in den nächsten beiden Abschnitten zu erklären gilt:

3.6 Elektrochemische Sensorik

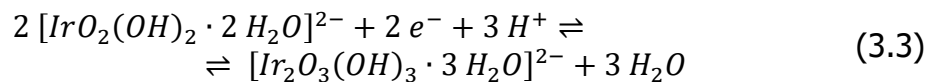
1. Wasserhaltiges Iridiumoxid hat eine Empfindlichkeit, die höher liegt als bei anderen pH-Sensoren [80, 126, 157, 163, 167, 177]. Dies wird häufig irreführend als super-Nernstsches Verhalten bezeichnet und bezieht sich auf das Übertreffen einer Empfindlichkeit von -58,2 mV/pH.
2. Es zeigt ein charakteristisches Drift-Verhalten, das nach der Herstellung mit einer starken Drift beginnt und dann in eine stationäre, wesentlich kleinere Drift übergeht. Oft wird dieser Vorgang als Einschwingen oder Aktivierung der Elektrode bezeichnet und kann sich von mehreren Stunden bis zu zwei Tagen erstrecken [105, 169, 175].

Fog und Buck formulierten fünf mögliche Erklärungen für die pH-Sensitivität von wasserfreien Metalloxiden [144]. Reßler wandte diese Erkenntnisse auf das Material Rutheniumoxid an [22]. Als der plausibelste Mechanismus wird von Fog und Buck eine Interkalationsreaktion von Sauerstoff genannt. Die Einlagerung von Sauerstoff in das Metalloxid geht mit einer Veränderung der Oxidationsstufe des Iridiumoxids einher und stellt somit eine pH-abhängige Redoxreaktion dar. Fog und Buck vernachlässigen bewusst die mögliche Hydrierung der obersten Schichten des Metalloxids und geben folgende Reaktionsgleichung an:



Dieser Mechanismus kann für wasserfreies Iridiumoxid (Iridiumoxid-Anhydrat) als ein potentialbestimmender Mechanismus angesehen werden [144, 175], jedoch nicht die erhöhte Steilheit von deutlich über -58,2 mV/pH bei hydriertem Iridiumoxid erklären.

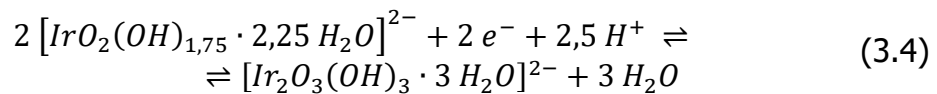
Burke und Whelan führten zykelvoltammetrische Untersuchungen an AIROF-Schichten durch. Basierend auf ihren Ergebnissen formulierten die Autoren folgende Redoxgleichung als Reaktionsmechanismus [162]:



Diese Gleichung geht von einer Bildung zahlreicher Hydroxygruppen im Iridiumoxidhydrat aus und postuliert eine Sensitivität von -87,3 mV/pH, da das Verhältnis aus Protonen und Elektronen 3:2 beträgt. Es ist bekannt, dass sich Hydroxygruppen auch bei wasserfreiem Iridiumoxid an der Oberfläche bilden, wenn es in Kontakt mit wässrigem Medium steht. Burke postuliert, dass es sich bei der Potentialbildung jeweils um Mischpotentiale aus einer hydrierten und einer nichthydrierten Phase handelt. Durch die hohe Porosität dominiert die hydrierte Phase in AIROF, wodurch die erhöhte pH-Empfindlichkeit erklärt werden kann. Basierend auf Beobachtungen von Ardizzone et al. [178] vermutet Burke unterschiedlich schnelle

Ansprechzeiten der beiden Phasen. Iridiumoxidhydrat soll also schneller auf eine pH-Änderung reagieren als das langsame Anhydrat [154].

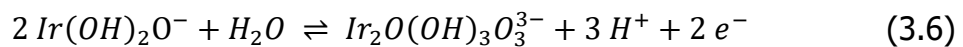
Burke et al. konnten die aus Gleichung (3.3) abgeleitete Sensitivität von -87,3 mV/pH nur über das aufgezeichnete Zyklovoltammogramm bestätigen. Bei der Messung des elektrochemischen Potentials stellten sie lediglich eine Steilheit von ca. -74 mV/pH fest. Burke erklärte dieses Phänomen mit kleinen strukturellen Änderungen im Iridiumoxidfilm, die dafür sorgen, dass die oxidierte Form des Oxids seltener Bindungen mit Hydroxygruppen eingeht. Daraus ergab sich folgende nichtstöchiometrische Reaktionsgleichung, die der Steilheit von -74 mV/pH besser entsprach [154]:



Auch Olthuis et al. vermuten, dass sich in der porösen Schicht des Iridiumoxidhydrats zahlreiche Hydroxygruppen bilden. Diese Gruppen können nach dem Site-Binding-Modell (vgl. 3.6.1.1) deprotonieren und damit ein Umladen der Elektrode ohne Beteiligung einer Redoxreaktion bewirken. Gleichung (3.5) demonstriert dies am Beispiel einer von vielen möglichen Reaktionen [167].



Um die Überschreitung der Sensitivität von -59 mV/pH zu erklären, muss dieser Mechanismus mit der Redoxreaktion zwischen drei- und vierwertigem Iridiumoxid gekoppelt werden. Dies kann beispielsweise die von Fog und Buck vorgeschlagene Sauerstoffinterkalationsreaktion sein. Die Kombination beider Reaktionsmechanismen führt zu folgender Reaktionsgleichung [167]:



Wie in Reaktionsgleichung (3.3) liegt auch hier das Verhältnis von Protonen zu Elektronen bei 3:2, womit eine pH-Sensitivität von -87,3 mV/pH zu erwarten wäre. Olthuis hebt hervor, dass es viele verschiedene hydroxylierte Formen des Iridiumoxids gibt und damit mehrere Reaktionen als potentialbestimmend in Frage kommen können. Im Gegensatz zu Burke et al. wird als Erklärung für die Sensitivität unter -87,3 mV/pH nicht die Entfernung von Hydroxygruppen aus der oxidierten Iridiumoxidform, sondern ein schwächerer Säurecharakter, also ein höherer pK_s -Wert des reduzierten Oxids genannt. Die Autoren erklärten damit die geringere pH-Empfindlichkeit der reduzierten Form und die Zunahme der pH-Empfindlichkeit bei stufenweiser Oxidation des Iridiumoxids. Olthuis et al. konnten bei oxidiertem Iridiumoxid

3.6 Elektrochemische Sensorik

eine maximale Empfindlichkeit von -80 mV/pH messen. Sie zeigten darüber hinaus, dass Iridiumoxid nur im reduzierten, aber nicht im oxidierten Zustand eine deutliche Querempfindlichkeit zu Sauerstoff hat [167].

Kontroverse Berichte über die Querempfindlichkeit auf Sauerstoff könnten somit darin begründet sein, dass verschiedene Autoren unterschiedlich stark oxidiertes Iridiumoxid verwendet haben.

Steggstra und Ahlberg publizierten 2012 detailreiche Ergebnisse über das pH-abhängige Potential von galvanisch abgeschiedenen Iridiumoxidschichten (AEIROF). Sie stellten fest, dass weder die Wahl des Substrates noch die Abscheidungsmethode einen direkten Einfluss auf Sensoreigenschaften wie pH-Empfindlichkeit (Steilheit) oder Streuung der absoluten Offsets der Elektrodenspannung, haben [166]. Ähnlich wie Olthuis et al. [167] untersuchten sie das Verhalten des Iridiumoxids in verschiedenen Oxidationsstufen. Der Oxidationszustand wurde durch Anlegen eines konstanten Potentials an die Elektrode eingestellt. Anders als Olthuis et al. führten sie diese Konditionierung nicht im sauren Milieu, sondern in $0,1 \text{ M KOH}$ durch. Hierdurch konnte das Oxid neben dem drei- und vierwertigen auch den fünfwertigen Zustand erreichen. Im sauren Medium wären hierfür höhere Spannungen nötig, die bereits zu Wasser-Elektrolyse führen würden [166].

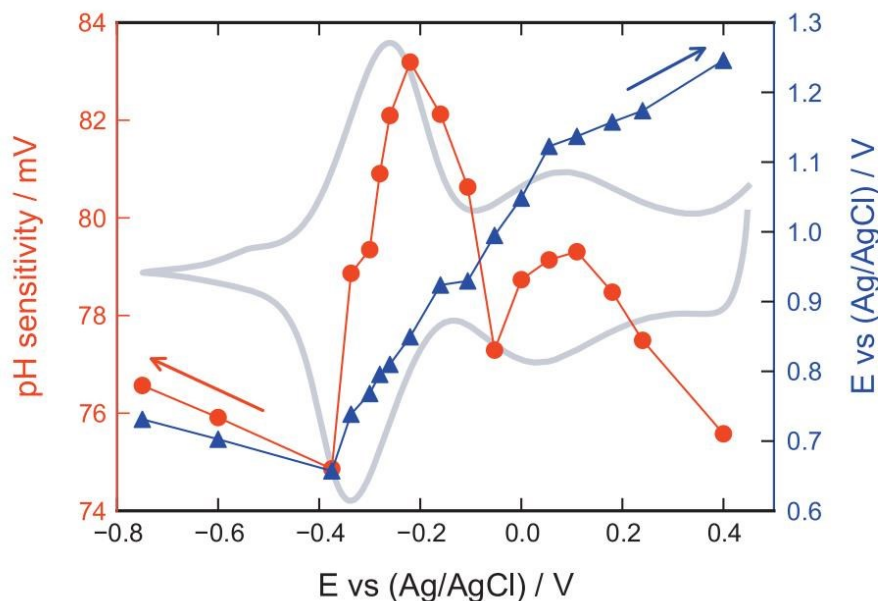


Abbildung 24: Die pH-Empfindlichkeit des Iridiumoxids variiert mit dem Oxidationszustand der Elektrode. Dies wird aus dem Zusammenhang zwischen dem Standardpotential bei Extrapolation auf pH 0 (blaue Kurve) und der pH-Empfindlichkeit (rote Kurve) deutlich. Besonders auffällig ist, dass die Empfindlichkeit in beiden Bereichen mit hoher Redox-Pufferkapazität jeweils ein lokales Maximum erreicht und dann wieder abfällt [166].

Steedstra und Ahlberg skizzierten den Zusammenhang zwischen Konditionierungspotential und der pH-Empfindlichkeit sowie des Standardpotentials (extrapoliert auf pH 0). Die entsprechende Grafik wird in Abbildung 24 gezeigt. Auffallend sind die Maxima der pH-Empfindlichkeit und der damit einhergehende Empfindlichkeitsverlust bei weiterer Oxidation des Iridiumoxids. Dieses Ergebnis weicht von den Beobachtungen von Olthuis bei elektrochemisch aufgewachsenem Iridiumoxid ab.

Weitere Untersuchungen von Steedstra und Ahlberg deuten darauf hin, dass oxidiertes und reduziertes Iridiumoxid einen ähnlichen pK_s -Wert besitzen. Deswegen gehen sie davon aus, dass der von Olthuis et al. angeführte Unterschied in der Acidität nicht für die Variation der pH-Empfindlichkeit verantwortlich ist. Stattdessen wird vorgeschlagen, dass hydriertes Iridiumoxid als eine Mischung aus Hydrat und Anhydrat zu betrachten ist. Daraus resultiert ein Mischpotential, das eine pH-Empfindlichkeit zwischen dem idealen Wert für Hydrat (-87,3 mV/pH) und Anhydrat (-58,2 mV/pH) zeigt. Entscheidend ist dabei der Anteil der jeweiligen Phase bei der Bereitstellung von Ladungen (Charge Capacity). Jene Phase, welche die meisten Ladungsträger bereitstellen kann, dominiert das Elektrodenpotential. Die Hydratphase erreicht ihre höchste Redox-Pufferkapazität, wenn sich ein Gleichgewicht aus reduziertem und oxidiertem Iridiumoxid eingestellt hat. Diese These wird durch das experimentell festgestellte Maximum der pH-Sensitivität, bei unterschiedlich stark oxidierten Iridiumoxiden, bestätigt. Steedstra und Ahlberg haben mittels elektrochemischer Impedanzspektroskopie zwei unterschiedliche Zeitkonstanten bei AEIROF-Schichten festgestellt. Dieser Effekt ist ein weiteres Indiz für die Koexistenz der zwei unterschiedlichen Iridiumoxidphasen (Hydrat und Anhydrat) [166].

Ein Zusammenhang zwischen Elektrodenkapazität und pH-Sensitivität konnte auch von Hitchman und Ramanathan experimentell bestätigt werden [179].

Die Langzeitstabilität der pH-Empfindlichkeit wurde von mehreren Autoren untersucht: Bezbaruah und Zhang lagerten jeweils drei Elektroden trocken, in Wasser und in pH 7-Pufferlösung. Sie berichteten bei den vermessenen Elektroden über geringe Änderung der Sensitivität im Bereich von 1 bis 2 mV/pH pro Woche – abhängig von der Lagerung –, wobei die in pH-Puffer gelagerten Elektroden den höchsten Verlust gezeigt haben [175]. Andere Autoren konnten keine Änderung der Empfindlichkeit bei Elektroden feststellen, die in neutralem Medium wie PBS bei pH 7 [171, 176] oder destilliertem Wasser [179] gelagert wurden.

3.6 Elektrochemische Sensorik

3.6.1.5 Potentialdrift bei wasserhaltigem Iridiumoxid

Burke unterscheidet zwei verschiedene Arten von Drift. Die erste Art von Drift wurde bei dem Überführen der Iridiumoxidelektrode von einer pH-Messlösung in eine Lösung mit anderem pH-Wert festgestellt und ist zeitlich auf wenige Minuten begrenzt. Diese Art von Drift wird mit dem porösen Charakter des Iridiumoxids in Verbindung gebracht und mit Resten des alten Mediums erklärt, die nur langsam durch neues Medium neutralisiert werden. Die zweite Art der Drift erstreckt sich bei Burkes Messungen über eine Periode von etwa zwölf Stunden und wird als Äquilibrationsprozess bezeichnet. Als Mechanismus wird eine langsam ablaufende Reorganisation der Iridiumoxidschicht vorgeschlagen. Darunter fällt zusätzliche Wasseraufnahme in noch nicht vollständig hydrierten Bereichen sowie die örtliche Umverteilung von Ir^{3+} und Ir^{4+} , da Ir^{4+} bei der zyklischen Potentialbehandlung an der Grenzschicht zwischen Metall und Oxid entsteht [154].

Für die galvanische Abscheidung kann letzterer Mechanismus jedoch nicht ohne weiteres übernommen werden, da hier das Oxid nicht in dieser Grenzschicht entsteht, sondern „von oben“ auf der Elektrode aufwächst. Dennoch tritt diese Art von Drift bei fast allen galvanisch abgeschiedenen Elektroden während der ersten Stunden auf. Einige Autoren sprechen dabei von einem Einschwingen der Elektrode und verwenden diese erst dann, wenn die hohe Potentialdrift abklingt [105, 169, 180].

Olthuis et al. konnten zeigen, dass reduzierte Elektroden anfangs eine deutlich höhere Drift (ca. 20 mV/h) zeigen als oxidiertes Iridiumoxid (ca. 0.3 mV/h). Die Drift der reduzierten Schichten tritt jedoch nur beim Vorhandensein von Sauerstoff auf [167].

Steegstra und Ahlberg zeigten, dass auch Wasserstoffperoxid (in einem pH 7-Puffer) eine beschleunigte Drift der Iridiumoxidelektrode hervorrufen kann. Im Gegensatz zu Sauerstoff trat der Effekt jedoch nur bei oxidierten Schichten auf. Zudem waren die Experimente auf fünf Minuten begrenzt, sodass es schwer fällt, eine Aussage über das Langzeitverhalten zu treffen [166].

Es finden sich Berichte, dass die Drift bei extrem sauren oder extrem alkalischen pH-Werten erhöht ist [151, 171]. Eine tiefere Untersuchung dieses Phänomens fand jedoch nicht statt.

3.6.1.6 Methoden zur Potentialstabilisierung von Iridiumoxidelektroden

Bereits in der frühen Publikation von Olthuis wurde gezeigt, dass sich das Standardpotential der Iridiumoxidelektrode über das Anlegen eines geeigneten Potentials verschieben lässt [167].

Hitchman und Ramanathan zeigten einige Jahre später, dass mittels einer solchen elektrochemischen Konditionierung der Elektrode die Schwankungen der Standardpotentiale von thermisch hergestelltem Iridiumoxid deutlich verringert werden konnte. Auch ein positiver Effekt auf die Drift der Elektroden konnte bei geeigneter Wahl des Potentials festgestellt werden [177].

Carroll und Baldwin entwickelten eine Methode zur Kalibrierung von galvanisch abgeschiedenen Iridiumoxid-pH-Sensoren, die auf der Kontrolle des Oxidationszustandes basiert. Dabei legten sie dasselbe Potential an mehrere, in diesem Moment kurzgeschlossene, Iridiumoxidelektroden an. So wurden die verschiedenen Elektroden wieder in einen definierten und vor allem in den gleichen Oxidationszustand gebracht. Zehn Elektroden, die vor der Behandlung (bei pH 7) einen Unterschied von bis zu 88 mV zeigten, hatten nach der Behandlung ein einheitliches Potential mit einem Versatz von weniger als 9 mV. Auch Elektroden, die nach Kontakt mit redoxaktiven Substanzen eine deutliche Abweichung aufwiesen, konnten mit dieser Behandlung wieder regeneriert werden [172].

Die bereits erwähnten ausführlichen Untersuchungen solcher Potentialbehandlungen von Steegsta und Ahlberg zeigen, dass eine gezielte Potentialbehandlung nicht nur Einfluss auf den Offset bzw. das Standardpotential bei einem festen pH-Wert besitzt, sondern auch die pH-Empfindlichkeit steuern kann [166].

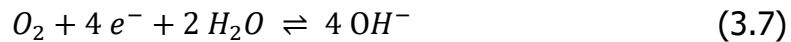
Somit kann das temporäre Anlegen eines „Konditionierungspotentials“ vor einer pH-Messung zur Verbesserung der Genauigkeit führen. Dennoch muss beachtet werden, dass die gewünschte Oxidationsstufe nur mit einem geeigneten Potential erreicht werden kann. Dieses ist jedoch wiederum abhängig vom pH-Wert der Messlösung. Dementsprechend wurden Konditionierungen stets in definierten Lösungen wie pH-Puffern oder KOH-Lösung durchgeführt [166, 172].

Kieninger berichtet davon, dass zykelvoltammetrische Messungen an galvanisch abgeschiedenen Iridiumoxidschichten zu einer Auflösung führen können [105]. Häufig durchgeführte Potentialbehandlungen könnten einen ähnlichen Effekt auf die Iridiumoxidelektrode haben und die Langzeitstabilität negativ beeinträchtigen.

3.6.2 Sauerstoffsensoren

3.6.2.1 Amperometrische Sauerstoffdetektion mit Membran nach Clark

Sauerstoff kann an einer Edelmetallelektrode, beispielsweise aus Platin, reduziert werden. Da dieser Vorgang kinetisch gehemmt ist, muss eine sogenannte Überspannung an die Elektrode angelegt werden, um die Reduktion anzutreiben. Dabei läuft folgende Reaktion ab [181]:



Dieser Zusammenhang wurde bereits 1897 von Danneel entdeckt [182] und fast fünfzig Jahre später wurden erste Platin-Elektroden als Sauerstoffsensoren in lebendes Gewebe implantiert. Dies war möglich, da die Proteinkonzentration nach abheilen der Verletzung im Gewebe gering ist. Ebenso wird eine Reinigung der Elektrodenoberfläche durch weiße Blutkörperchen vermutet. Anders verhält es sich bei Messungen in proteinhaltigen biologischen Medien, wie beispielsweise Blut. Hier wurden die Platin-Elektroden innerhalb kurzer Zeit vergiftet und eine Messung ist nicht möglich [183].

Um dieses Problem zu umgehen entwickelte Clark einen neuen Aufbau, bei dem sich Arbeits- und Referenzelektrode in einem separaten Medium befinden, das über eine Cellophan-Membran vom Messmedium getrennt ist. Das Cellophan ist durchlässig für Sauerstoff und verhindert dennoch, dass Proteine aus der Messlösung an die Arbeitselektrode gelangen. Dieser Aufbau ermöglichte die Messung der Sauerstoffkonzentration in biologischen Medien und war der Grundstein der modernen Blutgasanalyse.

Jobst et al. veröffentlichten 1993 einen planaren Aufbau einer Clark-Elektrode [184]. Sie verwendeten ein Hydrogel als interner Elektrolyt und einen fotostrukturierbaren Lack als gasdurchlässige Membran. Der Sensor setzt sich aus einer Platin-Arbeitselektrode und einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode zusammen. Um die Lebensdauer der Referenzelektrode zu verlängern, führten die Autoren eine weitere Platinelektrode als Gegenelektrode ein. An dieser findet die Gegenreaktion zur Arbeitselektrode statt (vgl. Formel (3.7)). Dies wird allgemein in der Literatur als das Ross-Prinzip bezeichnet und verhindert die Oxidation der Referenzelektrode sowie den sensorbedingten Sauerstoffverbrauch aus dem Medium. Der von Jobst et al. gezeigte Sensor wird nicht durch proteinhaltiges Serum beeinflusst und soll langzeitstabil sein. Langzeitexperimente über die Dauer von acht Stunden hinaus, wurden jedoch nicht veröffentlicht [184].

Wu et al. publizierten einen ähnlichen Aufbau mit einem Hydrogel und einer sauerstoffpermeablen Membran. Der Sensor zeigte lineares Verhalten und wurde ebenfalls unter Verwendung von proteinhaltigem Serum (fetales Kälberserum) eingesetzt. Aussagekräftige Werte bezüglich der Langzeitstabilität werden jedoch nicht gezeigt [62].

Park et al. präsentierten 2008 einen Langzeitversuch mit einer mikrosystemtechnisch gefertigten Clark-Elektrode. Als Membran wurde PDMS verwendet und die Elektrode wurde 24 Stunden betrieben. Der Sensor lieferte für elf Stunden stabile Werte und zeigte dann Ausfallerscheinungen [61].

McLaughlin et al. stellten ebenfalls einen miniaturisierten Clark-Sensor nach ähnlichem Prinzip her. Als Membran wurde Nafion verwendet und als Elektrodenmaterial Gold eingesetzt. Im Gegensatz zu den anderen Arbeiten wurde die Referenzelektrode nicht zusätzlich mit Silberchlorid beschichtet. Durch die Verwendung einer 20 µm großen Arbeitselektrode konnten die Autoren mit ihrem Aufbau ein schnelles Ansprechen ($\tau = 0,7$ s) des Sensors demonstrieren. Die Langzeitstabilität wurde nicht untersucht [185].

3.6.2.2 Direkt amperometrische Sauerstoffdetektion

Die Realisierung eines inneren Elektrolyten erweist sich bei einem planaren Aufbau als schwierig. Deswegen sind im Bereich der Zellanalytik direkt amperometrische Sensoren beliebter. Bei diesem Aufbau wird auf den inneren Elektrolyten verzichtet und die Elektroden befinden sich direkt im Messmedium. Manchmal wird eine Membran wie Nafion [59, 65, 98, 186] oder ein Hydrogel [63, 105] auf die Elektroden aufgebracht, um die Querempfindlichkeit und Sensorverschmutzung zu reduzieren sowie die Beeinflussung des Sensors durch Strömung zu eliminieren.

Hydrogele können das Verhalten des Sensors wesentlich verändern, da sie die Diffusion des Sauerstoffs in den Membranen bremsen. Neben der Dicke der Membran kann auch das Polymerisationsverfahren einen großen Unterschied in der Sensitivität und Ansprechzeit des Sensors bewirken und zu starken Abweichungen bei Sensoren aus unterschiedlichen Losen führen [105].

3.6.2.3 Einfluss der Elektrodengeometrie

Im Allgemeinen beruhen amperometrische Sensoren auf einem makroskopischen Stoffumsatz an der Elektrode. Der dabei gemessene Strom ist proportional zur umgesetzten Stoffmenge.

3.6 Elektrochemische Sensorik

Die Oberfläche der Arbeitselektrode kann als Senke für Sauerstoff gesehen werden und der Stofffluss kann somit durch die Gesetze des diffusiven und konvektiven Stofftransports beschrieben werden. Basierend auf der Annahme, dass sich die Sauerstoffkonzentration auf der Elektrodenoberfläche gegen null nähert und keine Konvektion stattfindet, lässt sich der Strom durch die Cottrell-Gleichung beschreiben [105, 129]. Es gilt, zwischen den beiden Extremfällen von unendlich ausgedehnten Elektroden und punktförmigen Mikroelektroden zu unterscheiden.

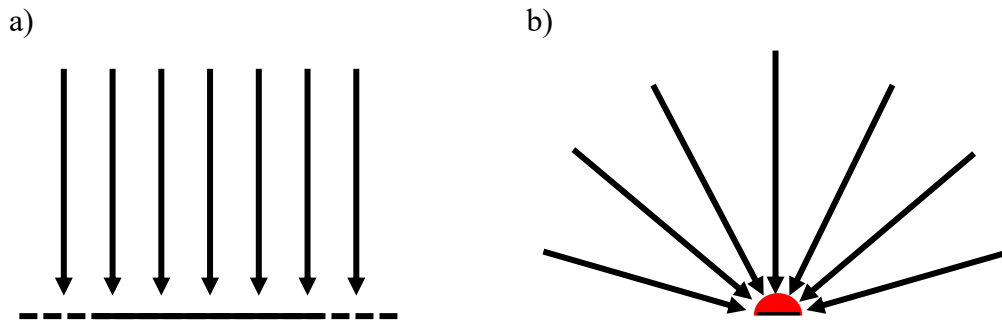


Abbildung 25: Bildliche Darstellung der Diffusion bei einer unendlich ausgedehnten Elektrode (a) und einer Mikroelektrode (b).

Im Falle einer planaren unendlich ausgedehnten Elektrode wie in Abbildung 25a) gezeigt, wird der Reaktant (z. B. Sauerstoff) an der Elektrode verbraucht und diffundiert aus dem weiter entfernten Medium nach. Es bildet sich eine sogenannte Diffusionsschicht aus, in der die Sauerstoffkonzentration geringer als im weit von der Elektrode entfernten Hauptteil der Lösung ist. Die Länge der Diffusionsschicht nimmt stetig zu und der Strom durch die Elektrode stetig ab, da weniger Edukte für die Reaktion zur Verfügung stehen.

$$i(t) = nFAc_o \sqrt{\frac{D_o}{\pi t}} \quad (3.8)$$

Gleichung (3.8) beschreibt den zeitlichen Verlauf des Stroms durch die Elektrode. Dabei steht n für die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Elektronen, A für die Fläche der Elektrode, c_o für die Konzentration des Reaktanten bei $t = 0$, D_o für die Diffusionskonstante des Reaktanten und F für die Faraday-Konstante. Gemäß der Theorie würde der Strom bei einem langen Experiment gegen null gehen. In der Praxis ist dies jedoch nicht der Fall, da sich der konvektive Einfluss nicht gänzlich vermeiden lässt und der Aufbau einer weiten Diffusionsschicht so verhindert wird [129].

Bei einer (halb-)kugelförmigen Elektrode mit dem Radius r_0 kann der Reaktant nicht nur aus der z -Richtung, sondern auch aus x - und y -Richtung nachdiffundieren. Dies wird in

Abbildung 25b) grafisch mit der roten Halbkugel als Elektrode dargestellt. Bei dieser Geometrie muss die Cottrell-Gleichung wie folgt angepasst werden [129]:

$$i(t) = nFAc_o \left(\sqrt{\frac{D_o}{\pi t}} + \frac{D_o}{r_o} \right) \quad (3.9)$$

Gleichung (3.9) besteht aus einem zeitabhängigen und einem zeitunabhängigen Term. Der erste Term dominiert das Ergebnis solange, bis die Ausdehnung der Diffusionsschicht die Größe der Elektrode wesentlich übertroffen hat. Danach dominiert der zeitunabhängige Term.

Dieser Zustand, in dem der Strom nur noch von der Konzentration des Reaktanten abhängt, wird als „Steady-State Current“ bezeichnet und ist für die Messung besonders wünschenswert. Um diesen Zustand schnell zu erreichen und den Einfluss von Konvektion zu minimieren, können (Ultra-)Mikroelektroden eingesetzt werden. Bei einer Elektrode mit dem Radius $r_o = 5 \mu\text{m}$ und einem Reaktanten mit der Diffusionskonstante $D_o = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ tritt der „Steady-State“ bereits nach etwa ein bis zwei Sekunden ein. Der erste Term in Formel (3.9) geht dann in guter Näherung gegen null. Für die hemisphärische Elektrode erhalten wir durch Einsetzen von $A = 4\pi r_o^2/2$:

$$i_{ss} = 2\pi nFD_o c_o r_o \quad (3.10)$$

In der Praxis finden planare Mikro-Elektroden häufiger Anwendung, da sie leichter zu fertigen sind. Auch eine planare Mikro-Elektrode erreicht schnell einen stationären Zustand; durch die geometrischen Unterschiede ist der Strom um den Faktor $2/\pi$ geringer als bei der hemisphärischen Elektrode [129]:

$$i_{ss} = 4nFD_o c_o r_o \quad (3.11)$$

Elektroden gelten als Mikro-Elektroden, wenn sie kleiner sind als die Diffusionsschicht, die sich während eines kurzen Experiments ausbilden kann [129]. In der Regel haben sie Dimensionen von wenigen μm und der Elektrodenstrom ist entsprechend gering und liegt meist im Picoampere-Bereich. Dies stellt hohe Anforderungen an die Präzision bei der Elektrodenherstellung und an die Instrumentierung.

Werden Mikro-Elektroden zu Arrays angeordnet und parallel geschaltet, lässt sich der zu messende Strom um die Anzahl der Elektroden im Array vervielfachen [187]. Beeinflussen sich die Diffusionsfelder der Elektroden nicht gegenseitig, erhält man eine großflächige Elektrode, die dennoch positive Eigenschaften einer Mikro-Elektrode zeigt und beispielsweise nach kurzer

3.6 Elektrochemische Sensorik

Zeit den „Steady-State“ erreicht [188]. Hierfür sollten die Mikroelektroden einen ausreichenden Abstand von mindestens dem zehnfachen Elektrodendurchmesser haben [189].

3.6.2.4 Amperometrische Messprotokolle zur Verbesserung von Ansprechzeit und Reproduzierbarkeit

Oft wird der Strom an einer Mikro-Elektrode erst dann ausgewertet, wenn er einen stationären, rein konzentrationsabhängigen Wert annimmt. Dies ist bei mittleren Elektrodengrößen (0,1-1 mm) nach einigen Sekunden der Fall. Eine schnellere Messung lässt sich erreichen, wenn der zeitabhängige Term der Cottrell-Gleichung berücksichtigt wird:

Van Rossem et al. entwickelten ein Messprotokoll, bei dem sie den Strom an der Elektrode in den ersten 10 ms nach der Polarisierung der Elektrode beobachteten. Dieser Strom entspricht (abgesehen von der Umladung der Doppelschichtkapazität) Gleichung (3.8), verhält sich linear zu $(\sqrt{t})^{-1}$ und ist proportional zur Stoffkonzentration c_0 . Durch diese Messmethode reicht eine effektive Messdauer von 10 ms aus, um Rückschlüsse auf den Sauerstoffgehalt zu ziehen. Wird die Elektrode nur für diese Zeit polarisiert, ergibt sich ein sehr geringer Verbrauch von Sauerstoff durch den Messsensor. Dies kann vor allem bei Mikroreaktionskammern von Vorteil sein, in denen der Sauerstoffkonsum durch einen amperometrischen Sensor zu Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in der Kammer führen kann [188].

Direkt amperometrische Sensoren mit kleinen Arbeitselektroden können schnell auf Änderungen des Sauerstoffgehalts reagieren, da die Elektrode direkt im Messmedium liegt und der Stoffaustausch nicht durch eine Membran gehemmt wird. In biologischen Proben wie Blut, aber auch in serumhaltigem Zellkulturmedium, kann die Arbeitselektrode durch Anlagerung von Proteinen an Sensitivität verlieren. Dadurch kann die Kinetik der Reaktion an der Elektrode soweit gehemmt werden, dass sie limitierend wird. In diesem Fall gilt die Cottrell-Gleichung nicht mehr und es ist kaum möglich, einen Zusammenhang zwischen Elektrodenstrom und Sauerstoffgehalt theoretisch herzuleiten. Wie bereits in Abschnitt 3.6.2.2 erwähnt wurde, können Membranen eingesetzt werden, um die Verschmutzung der Elektroden zu reduzieren.

Auch Kieninger erkannte dieses Problem und entwickelte innerhalb seiner Dissertation eine vielversprechende Lösung [105]: Durch die Vorpolarisation einer Platinelektrode mit verschiedenen Spannungen wird die Elektrode vor der Messung gereinigt und wieder in einen definierten Zustand überführt. Kieninger konnte die Drift mit einem dreistufigen chronoamperometrischen Protokoll effizient reduzieren. Dabei schreibt er vor allem der ersten Stufe besondere Bedeutung zu, bei der Platin an der Oberfläche der Elektrode oxidiert wird. Im zweiten Schritt wird die Elektrode wesentlich negativer polarisiert, sodass das entstandene

Platinoxid wieder zu Platin reduziert und die Doppelschichtkapazität der Elektrode umgeladen wird. Im dritten Schritt wird das Potential der Elektrode wieder leicht angehoben und der fließende Strom entspricht nun der Cottrell-Gleichung, da das Umladen der Pseudokapazität sowie der Doppelschicht bereits erfolgt ist [105].

Aus Kieninigers Arbeit geht nicht eindeutig hervor, ob die vorgenommene Beschichtung der Elektroden mit pHEMA zur Verbesserung der Langzeitstabilität beiträgt. Weltin et al. verwendeten Kieninigers Messprotokoll ohne eine Membran auf der Messelektrode und haben keine negativen Effekte berichtet [66].

3.6.2.5 Potentiometrische Sauerstoffdetektion

Auch eine potentiometrische Messung der Sauerstoffkonzentration ist möglich. Ein gutes Beispiel ist die Antimonelektrode, die bei festem pH-Wert einen gut definierten Sensor für Sauerstoff darstellt [126], vor allem wenn monokristallines Antimon verwendet wird [190].

Rutheniumoxid hat ebenfalls ein sauerstoffabhängiges Potential [80] und kann als potentiometrischer Sauerstoffsensoren eingesetzt werden, wenn der pH-Wert der Lösung konstant gehalten wird [191].

Martínez-Máñez et al. konnten das Problem der pH-Querempfindlichkeit lösen, indem sie gedruckte Rutheniumoxidschichten mit Titanoxid oder einer Polymermembran (Polyphthalamid Diphenylsulfon) bedeckten [192]. Die so behandelten Elektroden zeigten zumindest im basisch bis neutralen pH-Bereich eine deutlich verringerte pH-Sensitivität.

Der Vorteil eines potentiometrischen Sensors liegt in der stromlosen Messung. Weder wird der Analyt verbraucht, noch kann es zu einem strombedingten Spannungsabfall im Elektrolyten kommen (iR-Fehler). Im Falle des potentiometrischen Sauerstoffsensors ist die auftretende Querempfindlichkeit auf pH ein wesentlicher Nachteil. Ein weiteres Problem ist, dass die Ansprechzeit solcher Sensoren bislang nicht ausreichend untersucht wurde. Es gibt die Vermutung, dass in alkalischen Lösungen der schnelle Reaktionsmechanismus der Sauerstoffadsorption an der Elektrode von einer anderen, wesentlich langsameren Reaktion, überlagert wird [193].

3.6.2.6 ISFET-basierte Sauerstoffdetektion

Gemäß der Reaktionsgleichung (3.7) entstehen beim amperometrischen Sauerstoffsensoren durch die Reduktion des Sauerstoffs Hydroxidionen. Dies führt zu einer lokalen Änderung des pH-Wertes in der Nähe der Arbeitselektrode. Mit einem miniaturisierten pH-Sensor (z. B. ISFET),

3.6 Elektrochemische Sensorik

der sich in unmittelbarer Nähe der sauerstoffreduzierenden Elektrode befindet, kann der Sauerstoffgehalt aus der pH-Änderung berechnet werden, ohne den Stromfluss durch die Elektrode bestimmen zu müssen.

Sohn und Kim entwickelten einen solchen ISFET, dessen Gate mit einer Platinelektrode umgeben wurde. Der Sensor zeigte erwartungsgemäß ein logarithmisches Verhalten und war von der Pufferkapazität und dem pH-Wert des Messmediums abhängig. Als vorteilhaft erweist sich die gute Miniaturisierbarkeit des Sensors, ohne Abnahme der Sensitivität oder des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses [194, 195].

Eminaga et al. untersuchten ebenfalls diese Sensorkonfiguration und konnten über den Betrieb als Sauerstoffsensoren hinaus auch andere Stoffe wie z. B. Hydrochinon detektieren. Hierzu wurde die Edelmetallelektrode mit einer langsam oszillierenden Dreiecksspannung belegt und die lokale Änderung des pH-Wertes mit dem ISFET aufgezeichnet. Aufgrund der Ähnlichkeit zur Zyklovoltammetrie wird dieser Sensor als CV-FET bezeichnet [196].

3.6.3 Referenzelektroden

Bei amperometrischen Sensoren, wie dem bereits besprochenen Sauerstoffsensoren, muss die Elektrode mit einer günstig gewählten Spannung polarisiert werden. Die Spannung muss ausreichend hoch sein, um die Reduktionsreaktion zu ermöglichen, darf aber nicht zu hoch werden, da dies unerwünschte Querreaktionen begünstigen würde. Um die Polarisationsspannung definiert einzustellen, wird ein stabiles Referenzpotential benötigt. Üblicherweise werden solche Referenzpotentiale von Referenzelektroden geliefert.

Bei amperometrischen Messungen ist eine leichte Schwankung der Polarisierungsspannung meist akzeptabel und beeinflusst den gemessenen Strom lediglich gering. Bei potentiometrischen Sensoren hat das Referenzpotential großen Einfluss auf die gemessene Ionenaktivität [197] und eine Potentialverschiebung der Referenzelektrode um 59 mV kann bereits einen Messfehler von einer Zehnerpotenz bedeuten.

Eine gute Referenzelektrode ist folglich eine Elektrode, die ihr Potential möglichst konstant hält, auch wenn sie von Strom durchflossen wird oder sich die Zusammensetzung der Messlösung ändert.

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem miniaturisierbare Referenzelektroden und sogenannte Solid-State-Referenzelektroden (Elektroden ohne Innenelektrolyt) von Bedeutung. In den nachfolgenden Abschnitten wird zunächst die Silberchloridelektrode besprochen, dann werden

mögliche Strategien zur Miniaturisierung gezeigt. Danach werden alternative Konzepte vorgestellt, die in Spezialanwendungen (z. B. Durchflusssystemen) eingesetzt werden können.

Eine detaillierte Betrachtung von miniaturisierten Referenzelektroden würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen. Deswegen wird für tiefergehende Informationen auf die entsprechenden Reviews und Fachbücher verwiesen [83, 197–200].

3.6.3.1 Die Silber/Silberchloridelektrode

In der praktischen Anwendung hat die Silberchloridelektrode große Bedeutung, da sie einen einfachen Aufbau hat und ein definiertes Potential liefert. Eine gewöhnliche Elektrode dieser Art besteht aus einem Silberdraht, auf dem eine Silberchloridschicht aufgewachsen wird. Dies kann beispielsweise elektrochemisch in Salzsäure geschehen. Eine solche Elektrode ist ein potentiometrischer Sensor für Chloridionen. Dies ergibt sich aus der allgemeinen Nernstschen Gleichung und der spezifischen Reaktion der Silberchloridelektrode:



Werden die Konzentration der Chloridionen und die Temperatur konstant gehalten, ist das Potential der Silber/Silberchloridelektrode ebenfalls weitgehend konstant. Die Reaktion aus Gleichung (3.12) besitzt eine hohe Austauschstromdichte [201], was für eine simple und schnell ablaufende Reaktion ohne Zwischenschritte spricht. Durch die hohe Austauschstromdichte können Störungen des Potentials (z. B. bei Stromfluss durch die Elektrode) effektiv ausgeglichen werden.

Neben einer schwankenden Chloridionenkonzentration wirkt sich auch die Auflösung der Silber/Silberchloridschicht in der Messlösung negativ auf die Stabilität des Elektrodenpotentials aus [83]. Um beide Probleme zu lösen, wurden Elektroden zweiter Art eingeführt. Solche Elektroden beinhalten in ihrem Inneren eine definierte Elektrolytlösung und die metallische Komponente steht nicht in direktem Kontakt zur Messlösung. Dieser Innenelektrolyt ist durch ein Silberchloridsalz gesättigt, sodass keine weitere Auflösung der Silberchloridschicht auf dem Silberdraht stattfindet. Zusätzlich enthält es ein weiteres gut lösliches chloridionenbildendes Salz (meist KCl, manchmal auch NaCl) in definierter Konzentration. Über ein Diaphragma wird eine ionisch leitende Verbindung hergestellt, jedoch gleichzeitig ein rasches Vermischen von innerem Elektrolyten und der Messlösung verhindert. Da das Diaphragma von Ionen passiert werden kann, diffundieren K^+ - und Cl^- -Ionen vom inneren Elektrolyten langsam in die Messlösung. Dieser dynamische Ladungstransport erzeugt

3.6 Elektrochemische Sensorik

einen Spannungsabfall über das Diaphragma und kann das Potential einer Referenzelektrode verfälschen. Dieser Spannungsabfall wird Liquid-Junction-Potential genannt. Er kann von der Zusammensetzung der Messlösung, des inneren Elektrolyten sowie der Mobilität der wandernden Ionen im Diaphragma abhängen [129]. Der Fehlereinfluss des Liquid-Junction-Potentials wurde bereits bei pH-Messungen in verschiedenen Medien nachgewiesen und quantifiziert [127] und wird oftmals unterschätzt.

3.6.3.2 Miniaturisierung von Silberchlorid basierten Referenzelektroden

Es gibt verschiedene Ansätze der Miniaturisierung bei Ag/AgCl-Elektroden. Die wohl einfachste Methode ist das Weglassen des inneren Elektrolyts sowie des Diaphragmas. Es entsteht eine sogenannte Quasireferenzelektrode. Wird in Medien gemessen, in denen die Konzentration der Chloridionen konstant ist – was beispielsweise auf Zellkulturmedium zutrifft –, kann so ein stabiles Potential erzielt werden [105]. Die AgCl-Schicht wird sich jedoch langsam auflösen und potentielle interferierende Ionen können ungehindert die Referenzelektrode erreichen [83]. Ein weiterer Nachteil ist, dass die gelösten Ag⁺-Ionen auf Mikroorganismen, wie Zellen, toxisch wirken können.

Diese Situation lässt sich verbessern, indem eine feste Membran direkt auf der Elektrode aufgebracht wird [83] und als festes Elektrolyt die Funktion des inneren Elektrolyts übernimmt. So zeigten beispielsweise pHEMA-beschichtete Ag/AgCl-Elektroden für mindestens drei Wochen ein stabiles Potential [105]. Feste Elektrolyte werden bereits kommerziell in Referenzelektroden eingesetzt. Hauptsächlich dafür, um das Diaphragma durch eine einfache Öffnung zu ersetzen, wodurch die Elektroden weniger anfällig für Verschmutzungen werden [202].

3.6.3.3 Alternative Konzepte für Referenzelektroden

In Abschnitt 3.6.3.1 wurde erläutert, dass die Basis einer guten Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode eigentlich aus einem gut definierten Chloridsensor besteht. Durch die Festlegung der Chloridionenkonzentration an der Elektrodenoberfläche, wird daraus eine gute Referenzelektrode. Ganz analog zu dieser Betrachtung ist auch ein pH-Sensor mit geringer Querempfindlichkeit und gut definiertem Potential eine gute Referenzelektrode, wenn der pH-Wert in der Nähe der Elektrode konstant gehalten wird.

So verwenden Ges et al. zur pH-Messung zwei identische Iridiumoxidelektroden in einer Durchflusszelle. Eine solche Elektrode dient als Referenzelektrode, wenn sie so platziert wird,

dass sie sich an einem Ort mit konstantem pH befindet [58, 82]. Das entsprechende Messsystem wurde bereits in Abschnitt 3.5.2.2 erwähnt.

Van den Vlekkert et al. konnten durch die Verwendung von zwei identischen ISFET auf eine Referenzelektrode verzichten. Hierfür beschichteten sie einen konventionellen ISFET mit einer pHEMA-Membran, welche die Diffusion von H^+ -Ionen verlangsamt. Diese Struktur wurde von den Autoren als „Pseudo-REFFET“ bezeichnet und kann zusammen mit einem ISFET in Durchflusssystemen eingesetzt werden, in denen sich der pH-Wert schnell ändert. Die Eigenschaften dieses Referenzsystems sind allerdings stark von der Zusammensetzung und Herstellungsmethode der pHEMA-Membran abhängig und es können nur relative pH-Änderungen gemessen werden [203].

3.7 Isolierung und Verguss von Sensorzuleitungen

In Kapitel 3.6 wurden verschiedene elektrochemische Sensoren behandelt und es wurde gezeigt, dass ihre Eigenschaften stark von den verwendeten Materialien und der Geometrie abhängig sind. Der Fokus lag dabei auf dem Teil der Elektrode bzw. des Sensors, der mit dem Messmedium in Kontakt steht. Um in der Praxis einen zuverlässigen Sensor herzustellen, müssen auch Materialien und Technologien sorgfältig evaluiert werden, die für die Aufbau- und Verbindungstechnik des Sensors zuständig sind.

Vor allem bei elektrochemischen Sensorsystemen, die in flüssigen Medien messen, stellt der Aufbau eine Herausforderung dar. Solche Systeme bestehen im Grunde aus einem sensorischen und einem elektronischen Bereich sowie der Schnittstelle zwischen ihnen.

Die Sensorik befindet sich im Messmedium und sollte im besten Fall unterbrechungsfrei für den gesamten Messzeitraum mit diesem in Verbindung stehen. Die Elektronik dient der Auswertung des Sensorsignals und muss unbedingt vor dem Medium geschützt werden, da Feuchtigkeit auf hochintegrierten Leiterplatten rasch zu Fehlfunktion und Ausfall führen kann. Deswegen sollten beide Teile gegeneinander abgedichtet bzw. abgekapselt werden. Weiter erschwerend kommt hinzu, dass beide Teile trotzdem elektrisch verbunden werden müssen. Dieses Problem wurde in mehreren verschiedenen Arbeiten [22, 64, 105, 124, 204] thematisiert und jeweils nach ähnlichem Schema gelöst.

Anhand des Beispiels in Abbildung 26 soll der typische Aufbau von miniaturisierten Sensoren besprochen werden. Die Sensorik ist nicht zwingend trennbar mit der Elektronik verbunden und ist somit austauschbar. Die Messelektroden werden mit entsprechenden Zuleitungen auf ein

3.7 Isolierung und Verguss von Sensorzuleitungen

Trägersubstrat aufgebracht. Eine dünne Isolationsschicht bedeckt diese Zuleitungen und sorgt dafür, dass nur die Elektrode in Kontakt mit der Messlösung kommt. Diese Schicht kann dazu verwendet werden, um lediglich bestimmte Teile einer Elektrode freizulegen und so die Elektrodengeometrie zu beeinflussen. Die Anbindung an die Elektronik kann auf unterschiedliche Arten durchgeführt werden. In einigen Fällen sind die Zuleitungen des Sensors mit einem PCB – beispielsweise durch Draht-Bonden – verbunden, die wiederum eine Kontaktvorrichtung aufweist [22, 105]. In anderen Fällen werden die Zuleitungen direkt mit einer geeigneten Vorrichtung (z. B. Federkontakten) elektrisch verbunden [64, 69]. In beiden Fällen ist es essenziell, diese Schnittstelle gegen das Messmedium abzukapseln. Zu diesem Zweck reicht eine dünne Isolationsschicht nicht aus und es werden Verguss- und Dichtmittel oder dickflüssigere Klebstoffe verwendet. In den meisten Fällen wird ein Kunststoffkörper verwendet, der eine Kavität oder einen Fluidikkanal bildet. Dieser Körper wird mit einem spaltfüllenden Klebstoff an dem Sensorsubstrat befestigt, so dass nur die zulässigen Bereiche mit dem Medium in Kontakt kommen.

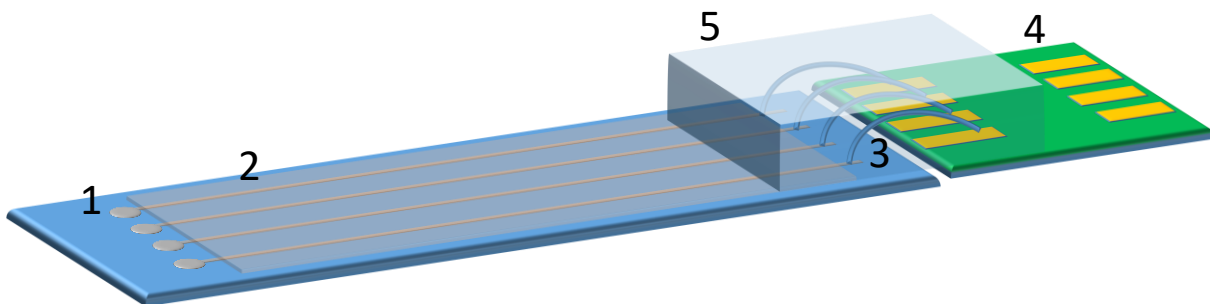


Abbildung 26: Typischer Aufbau eines miniaturisierten elektrochemischen Sensors. Auf einem Substratmaterial werden Sensorstrukturen (1) sowie entsprechende Zuleitungen aufgebracht. Eine dünne Isolationsschicht (2) verhindert, dass die Zuleitungen chemisch mit der Testlösung interagieren. Die Sensorik wird mittels geeigneter Verbindungstechnik, in diesem Beispiel Draht-Bonden (3), mit einem PCB (4) verbunden. Eine Vergussmasse (5) schützt diese Verbindung sowie die restliche Elektronik vor Kontakt mit der Messlösung.

Die dünne Isolationsschicht dient dazu, die Größe der aktiven Elektrodenfläche zu definieren. Eine fehlerhafte Isolationsschicht führt deswegen in erster Linie zu fehlerhaften Messwerten. Werden als Zuleitungen jedoch elektrochemisch aktive Materialien wie Silber verwendet, führt der Ausfall der Isolationsschicht mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Ausfall des Sensors.

Fotostrukturierbare Polymere sind eine besonders attraktive Lösung der Isolierung, da sie häufig in der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik sowie in der Fertigung von Leiterplatten

eingesetzt werden. Gleichzeitig können sie zur Fertigung von Mikroelektrodenarrays verwendet werden [102, 122, 196]. Diverse Polymere, die bei der Passivierung von ISFET eingesetzt werden, finden sich in folgendem Review [195].

SU-8 2000 der Firma „Microchem Corp.“ ist ein solcher Fotolack und wird in der Mikrosystemtechnik häufig eingesetzt. Der Lack ist in verschiedenen Viskositäten verfügbar und kann so per Rotationsbeschichtung in verschiedenen Schichtdicken aufgebracht werden. Auch wenn dieser Lack gute Isolationseigenschaften aufweist [205], wurde bei dickeren Schichten von Haftproblemen [206] und Rissbildung [207] berichtet. Kieninger konnte dieses Problem lösen, indem er eine besser haftende Version des Lacks (SU-8 3000) verwendete [105].

Carlier et al. konnten die Haftung des SU-8 2000-Lacks verbessern, indem sie eine dünne Grundsicht auf den Wafer aufbrachten und erst nach dem Hardbake dieser Schicht eine weitere nun dickere Schicht aufprozessierten [206].

Pemberton et al. verwendeten anstelle eines Fotolacks einen Schichtaufbau aus Siliziumnitrid und Siliziumoxid. Diese Isolationsschicht konnte mittels Gasphasenabscheidung aufgebracht werden und war für Ionen undurchlässig. Der Schichtenaufbau verringerte die mechanische Spannung und somit das Risiko der Rissbildung [64].

Ist die Vergussmasse nicht ausreichend dicht, können Federkontakte und Bonding-Drähte elektrochemisch korrodieren. Dies hat meist einen raschen Ausfall des Sensors zur Folge. Um Probleme zu vermeiden, muss die Wahl der Vergusstechnik und des verwendeten Klebstoffes wohlüberlegt erfolgen und an das gesamte Messsystem angepasst sein. Einen interessanten Überblick über mögliche Vergusstechniken bietet das Review von Oelßner et al. am praktischen Beispiel des ISFET [208].

PDMS ist ein präferiertes Polymer, um individuelle Mikrofluidiken oder Messkammern herzustellen. Mittels einer Dichtung [22, 59], eines Klebstoffes [66, 153, 209, 210] oder eines entsprechenden Dichtmittels [64] wird PDMS mit dem Sensorsubstrat verbunden. Auch ohne Dichtmittel haftet PDMS auf vielen wichtigen Substraten wie Glas oder Fotolacken [211] und kann zusammen mit einer geeigneten Klemmvorrichtung eine dichte Kammer erzeugen [57, 212]. Diese Verbindung ist lösbar und daher für Forschungszwecke eine gute Alternative zu unlösbaren Verklebungen.

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

In Kapitel 3.6 wurden am Beispiel des pH- und Sauerstoffsensors potentiometrische und amperometrische Sensoren beschrieben. Der Unterschied liegt darin, ob ein Stromfluss durch die Arbeitselektrode verhindert werden muss oder erwünscht ist.

In den nächsten beiden Abschnitten sollen schaltungstechnische Methoden besprochen werden, die diese Arten der Messungen ermöglichen. Anschließend wird die elektrochemische Impedanzmessung besprochen, die eine besondere Art der Amperometrie, genauer gesagt der Voltammetrie, darstellt [213].

Der Fokus liegt hierbei auf der ersten Verstärkerstufe nach dem Sensor, die in den folgenden Abschnitten als analoges Front-End bezeichnet wird. Dieser Schaltungsteil muss auf die besonderen Bedürfnisse der elektrochemischen Sensoren angepasst werden. Die darauffolgende Signalkette, bestehend aus Filtern, weiteren Verstärkern und Datenwandlern, bedarf keiner besonderen Anpassung und kann nach gängigen Methoden entworfen werden.

3.8.1 Potentiometrie

Die stromfreie Spannungsmessung des stationären Zustands einer Elektrode wird als Potentiometrie bezeichnet. Davon abzugrenzen ist die Voltammetrie, die eine Spannungsmessung bei Stromfluss benennt, sowie die Voltammetrie, bei der ein Stromfluss bei variabler Spannung gemessen wird [213].

Die Potentiometrie kann verwendet werden, um die elektromotorische Kraft an einer Elektrode oder den Potentialunterschied über einer Membran zu messen. Stromfluss durch die Membran verursacht, bedingt durch das ohmsche Gesetz, eine zusätzliche Potentialdifferenz und verfälscht somit den Messwert. Vor allem bei Membranen mit sehr hohem Widerstand, wie bei einer Glaselektrode, muss der Stromfluss durch die Elektrode so gering wie möglich sein (üblicherweise im Femtoampere-Bereich). Bei metalloxidbasierten pH-Sensoren gilt dies ebenso, um die Eigenschaften des Sensors [214] und der Referenzelektrode nicht durch strombedingte Redoxreaktionen zu verändern.

Zur Messung wurden historisch betrachtet zuerst Elektrometer, später röhrenbasierte Verstärker und ab 1966 auch Transistorschaltungen verwendet [215]. Heutzutage sind zahlreiche integrierte Verstärkerschaltungen verfügbar, die es ermöglichen, einen Elektrometerverstärker sehr einfach aufzubauen.

Die einfachste Schaltung für diesen Zweck basiert auf einem einzelnen Operationsverstärker, der als Spannungsfolger beschaltet und mit der Sensorelektrode verbunden ist. Die Referenzelektrode wird niederohmig mit der Schaltung verbunden und definiert so das Potential der Messlösung.

Eine andere Möglichkeit ist ein Differenzverstärker, beispielsweise in Form eines Instrumentenverstärkers. In diesem Fall ist sowohl die Arbeitselektrode als auch die Referenzelektrode hochohmig mit der Schaltung verbunden. Dies kann zur Folge haben, dass das Potential der Messlösung nicht oder nur schlecht definiert ist. Es wird deswegen empfohlen, die Messlösung niederohmig mittels einer weiteren Elektrode mit der Schaltungsmasse zu verbinden [216, 217].

Eine Technik, um potentiometrische Sensordaten günstig per Funk zu übertragen, besteht in der Verwendung einer Kapazitätsdiode. Horton et al. konnten zeigen, dass es mit einer gedruckten Spule sowie einer Kapazitätsdiode möglich ist, einen passiven pH-Sensor herzustellen. Die Kapazitätsdiode wird zwischen Referenz- und pH-Elektrode aus Antimon angeschlossen und ändert ihre Kapazität in Abhängigkeit des Potentials der pH-Elektrode. Dieser Effekt wird wiederum verwendet, um die Resonanzfrequenz des Schwingkreises aus Spule und Kapazitätsdiode zu verstimmen. Diese Verstimmung kann mit einer entsprechenden Empfangsschaltung gemessen werden [218].

3.8.2 Amperometrie

Bei einem amperometrischen Sensor wird ein makroskopischer Umsatz des Analyten gezielt an der Elektrode herbeigeführt und der daraus resultierende Strom wird zur Bestimmung der Konzentration verwendet. Die Spannung an der Elektrode muss hierfür gezielt verändert werden, wozu ein stabiles Referenzpotential nötig ist. Im einfachsten Fall genügt es, zwischen einer Arbeits- und Referenzelektrode eine Spannung einzustellen und den Stromfluss zu messen. Dies wird als Zweielektrodenanordnung bezeichnet. Hierbei fließt der Strom der Arbeitselektrode auch durch die Referenzelektrode und kann Referenzelektrodenpotential verfälschen sowie die Lebensdauer einer miniaturisierten Elektrode wesentlich verkürzen (vgl. Abschnitt 3.6.3).

Ein weiteres Problem der Zweielektrodenanordnung ist, dass der Strom durch den Elektrolyten fließt. Hierdurch kommt es zu einem Spannungsabfall, der gleich dem Produkt aus Strom und dem Widerstand des Elektrolyten ist und in der Literatur häufig als iR -Fehler bezeichnet wird.

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

Eine mögliche Lösung besteht darin, die Arbeitselektrode klein zu dimensionieren und so den fließenden Strom gering zu halten [129, 213]. Ist die Referenzelektrode jedoch ebenfalls sehr klein, verbessert diese Maßnahme lediglich den iR -Fehler und nicht die Probleme der Referenzelektrode.

Um den Stromfluss durch die Referenzelektrode zu verhindern, wurde die Dreielektrodenanordnung entwickelt, bei der eine weitere Hilfelektrode eingeführt wird. Diese Elektrode, im englischen „Auxiliary Electrode“ genannt, dient als Gegenelektrode zur Arbeitselektrode und wird vom selben Strom durchflossen. Die Spannung an der Arbeitselektrode wird weiterhin in Bezug zur Referenzelektrode eingestellt, wobei diese aber stromfrei bleibt. In Elektrolyten mit hohem Widerstand wird die Referenzelektrode direkt in der Nähe der Arbeitselektrode platziert, um den iR -Fehler zu minimieren.

3.8.3 Potentiostatenschaltungen

Die Dreielektrodenanordnung bietet den Vorteil, einen Stromfluss durch die Referenzelektrode zu verhindern. Die schaltungstechnische Umsetzung ist jedoch komplizierter als bei der Zweielektrodenanordnung, da die Spannung zwischen Referenz- und Arbeitselektrode auf einen konstanten Wert geregelt werden muss. Dabei dient die Spannung (und somit der resultierende Stromfluss) zwischen Arbeits- und Gegenelektrode als Stellgröße.

Eine Schaltung, die diese Regelung vornimmt, wird im Allgemeinen als Potentiostat bezeichnet. Da es sich um einen Regler handelt, kann es bei schlechtem Design, genauer gesagt bei schlechter Kompensation des Zeitverhaltens der Regelstrecke, zu instabilem Verhalten kommen. Im schlimmsten Fall wird die Schaltung zu einem Oszillator. Diese Situation ist komplex, da die Elektroden sowie das Messmedium Teil der Regelstrecke sind und somit das dynamische Verhalten des Potentiostaten beeinflussen [213].

Neben der beschriebenen Regelung besitzen übliche Potentiostaten einen weiteren Schaltungsteil, der zur Messung des Stroms durch die Arbeitselektrode dient. Die Stabilität der Schaltung muss immer als Ganzes betrachtet werden, da sich beide Teile der Schaltung beeinflussen können. Eine weitere Kategorie elektrochemischer Regelschaltungen sind Galvanostaten. Sie werden eingesetzt, um den Strom durch die Arbeitselektrode konstant zu halten.

Um Anordnungen von Elektroden in elektrischen Schaltplänen darzustellen, ist die Verwendung eines Schaltzeichens sinnvoll. Für die Dreielektrodenanordnung gibt es kein

standardisiertes Zeichen. Die in der Literatur verwendeten Schaltzeichen folgen samt einem Schema, bei dem die Gegenelektrode (GE) groß und die Arbeitselektrode (AE) klein dargestellt wird. Die Referenzelektrode (RE) liegt näher an der Arbeitselektrode als an der Gegenelektrode und wird häufig durch einen Pfeil repräsentiert. Für diese Arbeit wurde nach dieser gängigen Praxis das Schaltbild aus Abbildung 27 angefertigt.

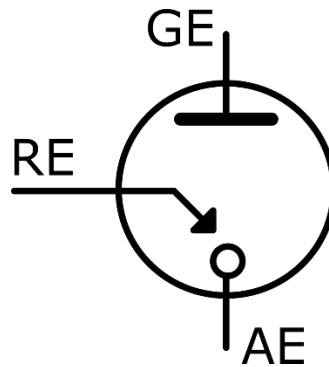


Abbildung 27: Schaltbild einer Dreielektrodenanordnung mit der Gegenelektrode (GE), der Arbeitselektrode (AE) und der Referenzelektrode (RE).

3.8.3.1 Kategorisierung und Unterschiede verschiedener Potentiostatenschaltungen

Potentiostatenschaltungen können auf unterschiedliche Arten unterteilt werden. Roknsharifi unterscheidet zwischen widerstands-, kondensator- und stromspiegelbasierenden Potentiostaten [219] und bezieht sich damit auf die Methode, die zur Strommessung herangezogen wird. Abbildung 28 zeigt die prinzipielle Architektur dieser Schaltungen: In a) wird der Transimpedanzverstärker **OPV2** verwendet, um den Stromfluss in eine messbare Spannung zu wandeln. In b) wird **OPV2** als Integrierer verwendet, um von der im Kondensator **C_Mess** gespeicherten Ladungsmenge auf den Stromfluss Rückschlüsse zu ziehen. Der Schalter **T_Reset** dient zum Zurücksetzen des Integrierers, indem die Kapazität **C_Mess** entladen wird. Die in c) gezeigte Schaltung basiert auf einem Stromspiegel und beseitigt einen Nachteil des Integrierers. Der Stromspiegel verhindert, dass das Schalten von **T_Reset** einen Einfluss auf die Potentialregelung der Arbeitselektrode hat. **OPV1** hat bei diesen drei Schaltungstypen jeweils dieselbe Aufgabe und regelt das Potential der Referenzelektrode bezüglich der Schaltungsmasse.

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

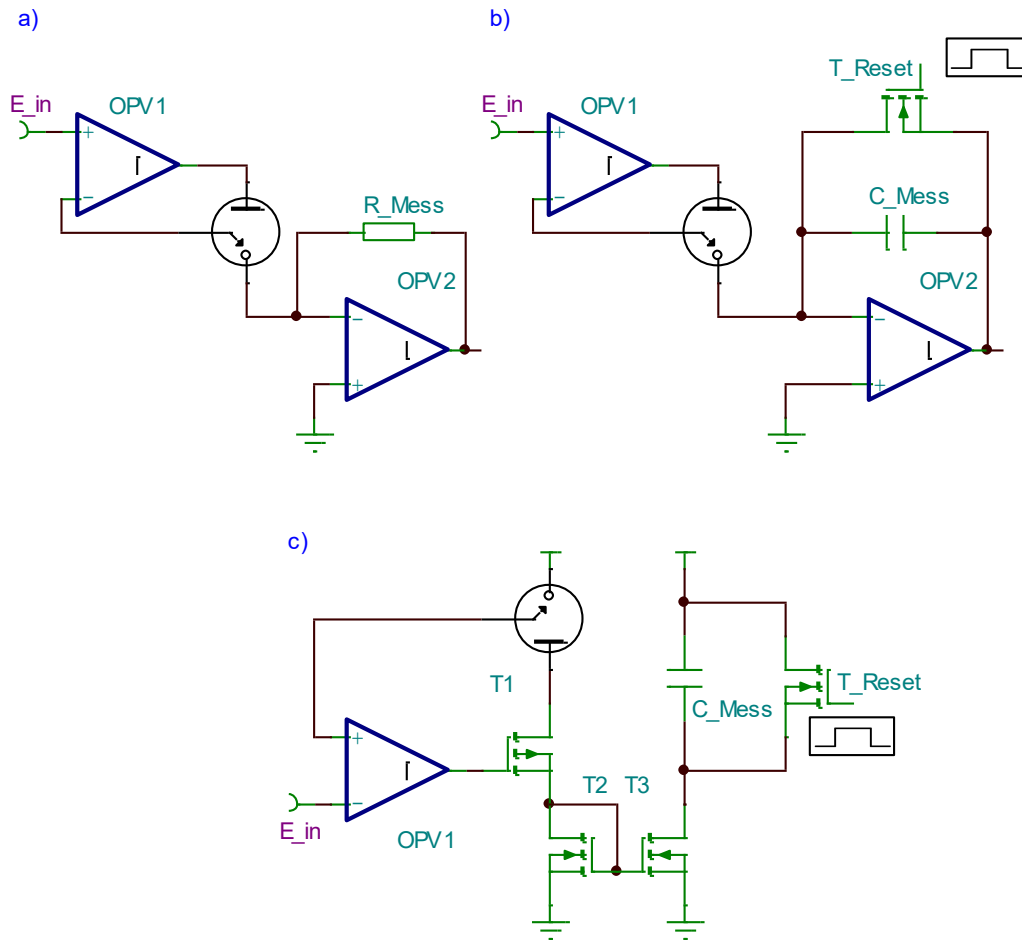


Abbildung 28: Kategorisierung von Potentiostaten nach der Messmethode für den Zellstrom: a) resistive Messung basierend auf einem Transimpedanzverstärker; b) kapazitive Messung auf Basis eines Integrierers; c) kapazitive Messung mit zusätzlicher Entkopplung durch einen Stromspiegel; in Anlehnung an [219].

Britz [220] und Wipf [213] unterscheiden nach der Art der Eingangsschaltung zwischen Potentiostaten mit differentielllem Eingang und Potentiostaten mit additivem Eingang. In Abbildung 29 werden beide Schaltungen gegenübergestellt. Potentiostaten mit differentielllem Eingang (a) basieren auf der Spannungsfolgerschaltung und können im einfachsten Fall mit einem einzigen Operationsverstärker realisiert werden. Potentiostaten mit additivem Eingang (b) basieren auf der Addierer-Schaltung und benötigen mindestens einen weiteren Operationsverstärker. **OPV2** dient in dieser Schaltung als Impedanzwandler und verhindert den Stromfluss durch die Referenzelektrode.

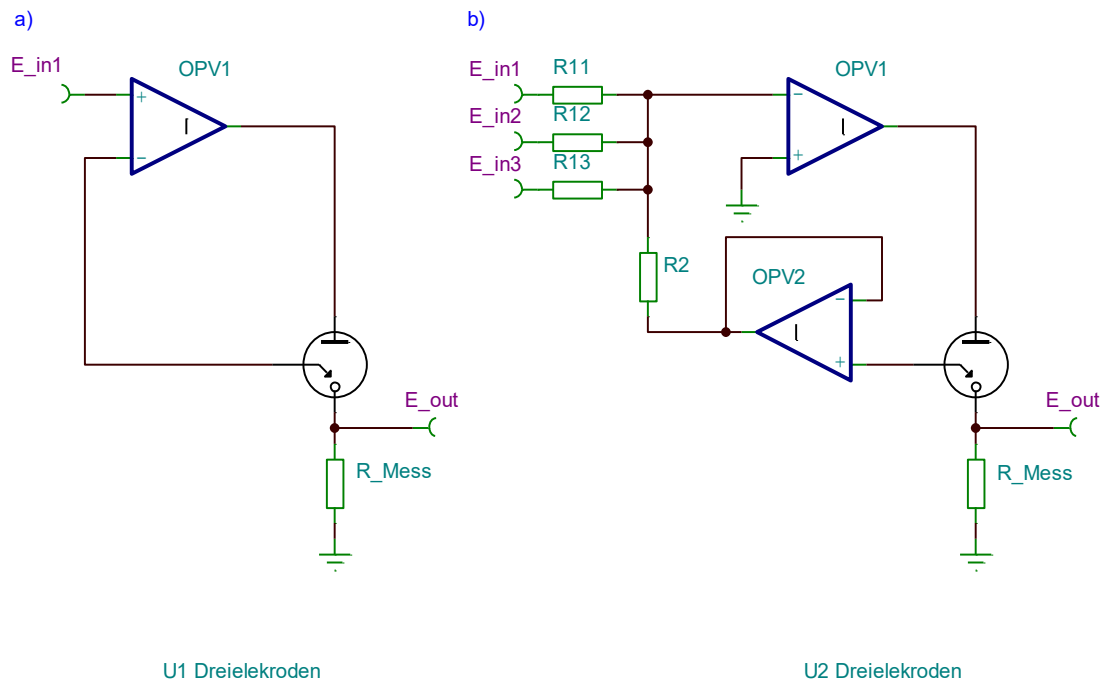


Abbildung 29: a) Potentiostaten mit einem differentiellen Eingang basieren auf der Spannungsfolgerschaltung; b) Potentiostaten mit additivem Eingang sind von der Addierer-Schaltung abgeleitet; in Anlehnung an [213, 220].

3.8.3.2 Funktionsweise von Potentiostaten

Die Beschreibung eines einfachen Potentiostaten ist für den stationären Fall mit dem Nullor-Modell des idealen Operationsverstärkers möglich. Dies ist für ein hinreichendes Verständnis der Grundfunktion der Schaltungen ausreichend. In der Praxis muss jedoch das dynamische Verhalten von nichtidealem Operationsverstärker und elektrochemischer Zelle berücksichtigt werden. Dies ist rechnerisch oder mittels Simulation möglich, wenn komplexere Modelle verwendet werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass sich das Ersatzschaltbild einer elektrochemischen Zelle im Verlauf des Experiments unvorhergesehen ändern und somit das dynamische Verhalten der Messschaltung beeinflussen kann [213].

Das Nullor-Modell (Nullator-Norator-Modell) beschreibt einen idealen Operationsverstärker, der mittels einer negativen Rückkopplungsschleife so beschalten wurde, dass zwischen den Eingängen keine Spannungsdifferenz herrscht. Da die Eingänge hochohmig sind fließt kein Strom in die Eingänge des OPV. Sie sind daher ein Nullator. Der Ausgang kann zum Erreichen dieses Zustands beliebige Ausgangsströme und Spannungen liefern, er ist ein Norator. In der Praxis herrschen einige Einschränkungen, z. B. liegt zwischen den Eingängen eine kleine Differenzspannung (Input Offset Voltage) im Bereich von einigen Mikrovolt bis hin zu wenigen Millivolt an. Es fließt ebenso ein kleiner Eingangsstrom (Input Bias Current), der je nach

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

internem Aufbau des Operationsverstärkers Werte im Femtoampere- bis Mikroampere-Bereich annehmen kann.

Wird die elektrochemische Zelle durch ein einfaches Ersatzschaltbild aus zwei Widerständen beschrieben, so lässt sich die Schaltung aus Abbildung 29a) in Abbildung 30 überführen. Diese Schaltung entspricht einem Spannungsfolger mit einem Widerstand im negativen Rückkopplungszweig. Der positive Eingang des OPV ist mit der Eingangsspannung E_{in} beschaltet, der negative Eingang wird mit der Referenzelektrode (RE) verbunden. Aus der Nullator-Bedingung ergibt sich, dass die Referenzelektrode stromfrei bleibt und ebenfalls auf dem Potential der Eingangsspannung E_{in} liegt. Die Spannungsdifferenz zwischen der auf Masse liegenden Arbeitselektrode (AE) und der Referenzelektrode (RE) ist somit E_{in} . Der Ausgang des OPV definiert die Gegenelektrode (GE) und kann beliebige Spannungswerte annehmen. Aus der grundlegenden Schaltungstheorie ergibt sich die Spannung an der Gegenelektrode (GE) aus dem Widerstand R_c und dem Stromfluss durch die Arbeitselektrode (AE), der dem Strom durch die Gegenelektrode entspricht. Der Strom durch die Arbeitselektrode (AE) wird wiederum durch die angelegte Eingangsspannung E_{in} und den Widerstand R_u definiert.

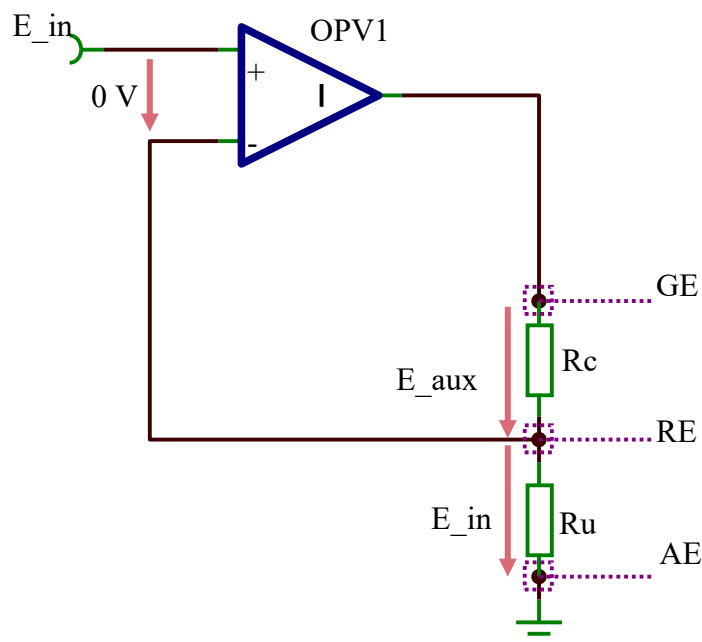


Abbildung 30: Eine einfache Potentiostatenschaltung lässt sich mit einem einzelnen Operationsverstärker aufbauen. Wendet man das Nullor-Modell des idealen OPV an, so wird deutlich, dass die Spannung zwischen Referenzelektrode (RE) und Arbeitselektrode (AE) der Eingangsspannung (E_{in}) gleich ist. Die Spannung der Gegenelektrode (GE) kann jedoch beliebige Werte annehmen und wird durch den Strom der Arbeitselektrode und den Widerstand (R_c) definiert.

An dieser Stelle ist es wichtig zu verstehen, dass die Änderung des Widerstands R_u den Stromfluss durch die Arbeitselektrode auch bei konstanter Eingangsspannung E_{in} verändern wird. Die Änderung des Widerstands R_c wird den Stromfluss jedoch nicht ändern. Deswegen wird R_c als kompensierter Widerstand der Zelle bezeichnet und R_u als unkompensierter Widerstand. In der Realität sind beide Widerstände an komplexe elektrochemische Vorgänge gebunden, sodass sie nicht als rein resistiv betrachtet werden können. Sie müssen in der Praxis als nichtlineare komplexwertige und sogar zeitvariante Größen behandelt werden.

Es ist bei dieser Schaltung möglich, eine oder mehrere zusätzliche Arbeitselektroden einzufügen. Ein solcher Aufbau wird als Bi- oder Multipotentiostat bezeichnet. Ist die zusätzliche Arbeitselektrode stromdurchflossen, fließt ein Teil dieses Stroms durch die unkompensierten Widerstände der übrigen Arbeitselektroden und verfälscht so die Regelung des Potentials. In der Praxis wird deswegen empfohlen, die Referenzelektrode möglichst nahe an der Arbeitselektrode mit dem höchsten Stromfluss zu platzieren [213].

Das dynamische Verhalten eines Potentiostaten kann mit Standardmethoden der Schaltungs- und Regelungstechnik bestimmt werden, wenn sich die Eigenschaften der elektrochemischen Zelle ausreichend gut mit linearen Schaltungselementen approximieren lassen. Für alle anderen Komponenten sind die Modelle entweder ausreichend gut in der Literatur beschrieben oder werden von den Bauteilherstellern zur Verfügung gestellt. Dies ermöglicht eine Simulation des Potentiostaten samt approximierter Messzelle mit Schaltungssimulationstools, wie dem weitverbreiteten Programm SPICE.

3.8.3.3 Weiterentwicklung der Potentiostatentechnik

Die ersten Weiterentwicklungen von Potentiostatenschaltungen betrafen die Verbesserung der Stabilität [213, 220, 221] und die Kompensation des iR -Fehlers [220, 222, 223]. Dabei zeigte sich das Problem, dass eine vollständige schaltungstechnische Kompensation des iR -Fehlers zur Verschlechterung der Stabilität führt, da die Messzelle aus Sicht des Potentiostaten rein kapazitiv ist [220]. Eine rein kapazitive Last am Operationsverstärker verringert die Phasenreserve des Operationsverstärkers und führt zu instabilem Verhalten.

Neue Entwicklungen in den Bereichen der Point-of-Care-Diagnose und der intelligenten Implantate benötigen integrierbare und miniaturisierte Potentiostaten. Hierfür wurden in den letzten Jahren zahlreiche energieeffiziente Potentiostaten in CMOS-Technologie realisiert. Diese Schaltungen integrieren alle aktiven Elemente auf einem Chip und ermöglichen so die Herstellung miniaturisierter Potentiostaten. In einigen Fällen wurden die Sensoren durch

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

zusätzliche Prozessschritte ebenfalls auf dem CMOS-Chip integriert. Für Details zu dieser Entwicklung möchte ich auf das aktuelle und sehr detaillierte Review von Arya et al. [224] verweisen.

Die Entwicklung von Potentiostaten für die multiparametrische Messung an mehreren Sensoren ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung und wird in Abschnitt 3.8.5 separat behandelt.

3.8.4 Impedimetrie

Der lineare Zusammenhang zwischen einer Spannung, die an einem Zweipol anliegt, und dem Strom, der durch diesen Zweipol fließt, kann im stationären Fall einfach durch den ohmschen Widerstand beschrieben werden. Handelt es sich um eine Wechselspannung, muss die komplexe Impedanz des Zweipols betrachtet werden. Auch dabei kann ein linearer Zusammenhang zwischen Spannung und Strom bestehen, der das Verhältnis der Amplituden sowie die Phasenverschiebung frequenzabhängig beschreibt.

In der Praxis müssen alle Bauelemente als frequenzabhängige Impedanzen betrachtet werden. So bildet beispielsweise ein Widerstand, der sich in der Nähe einer metallischen Fläche befindet, eine Kapazität mit ihr. In den meisten niederfrequenten Anwendungen ist dieser Effekt vernachlässigbar klein und der Widerstand kann als rein ohmscher Widerstand betrachtet werden. In Hochfrequenzanwendungen kann der Effekt jedoch beträchtlich sein oder sogar das Verhalten der Schaltung dominieren. Dies wird als parasitärer Effekt bezeichnet.

Für eine präzise Impedanzmessung müssen parasitäre Effekte entweder minimiert oder im Modell berücksichtigt werden.

3.8.4.1 Modellierung der elektrochemischen Zelle als Impedanz

Elektrochemische Zellen lassen sich durch lineare Impedanzen modellieren, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind. Werden die Zuleitungsimpedanzen vernachlässigt, besteht eine Zweielektrodenanordnung aus einer Serienschaltung von Arbeitselektrode, Elektrolyt und Referenzelektrode. Der Elektrolyt verhält sich in guter Näherung wie ein ohmscher Widerstand und ist linear. Für die Elektroden ist dies im Allgemeinen nicht der Fall [129].

Auch im einfachsten Fall einer ungehemmten einstufigen Redoxreaktion an der Elektrode, zeigt der Strom eine nicht lineare Abhängigkeit von der angelegten (Über-)Spannung. Dieses Verhalten wird bereits durch die exponentiellen Terme in der Butler-Volmer-Gleichung prognostiziert, die den Stromfluss durch eine Elektrode beschreibt [93, 129]. Lediglich bei kleinen Spannungsamplituden ist eine lineare Approximation zulässig. Der daraus resultierende

Widerstand wird als Ladungstransfer-Widerstand (Charge Transfer Resistance) bezeichnet und spiegelt das Kleinsignalverhalten der Elektrode wider. Der Wert dieses Widerstands ist vom Arbeitspunkt abhängig.

Der Frequenzgang der Impedanz einer Elektrode wird neben dem Ladungstransfer auch durch die Diffusion der Reaktionsprodukte und Edukte an der Elektrode bestimmt. Dieses Verhalten kann mittels der Warburg-Impedanz modelliert werden und ist vor allem bei niederfrequenten Impedanzmessungen relevant. Da der Ladungstransfer an der Elektrode und die Diffusion seriell ablaufen, macht es Sinn die modellierenden Elemente ebenfalls seriell anzuordnen.

In höheren Frequenzbereichen ist die Helmholtzsche Doppelschicht relevant, die sich an der Elektrode ausbildet. Ohne auf die Details [93, 129] einzugehen, sei erklärt, dass sich eine Schicht orientierungspolarisierter Wassermoleküle gefolgt von Ladungsträgern (Ionen) des Elektrolyten an der Elektrode ausbildet. Diese Schichten bilden einen Kondensator, bei dem vereinfacht betrachtet eine Platte aus der Elektrode und die andere Platte aus dem Elektrolyten besteht. Diese Doppelschichtkapazität verhält sich annähernd wie eine ideale Kapazität, wenn sich die Zusammensetzung des Elektrolyten nicht ändert [129]. Die Auf- und Entladung dieser Kapazität findet parallel zum obengenannten Faradayschen Ladungstransfer statt. Die modellierte Kapazität sollte deswegen parallel zum Ladungstransfer-Widerstand und der Warburg-Impedanz liegen.

Diese drei obengenannten Prozesse können mit der Ersatzschaltung von Randles beschrieben werden, die in Abbildung 31 dargestellt wird. Abbildung 32 zeigt den dazugehörigen Nyquist- und Bode-Plot.

Der Bode-Plot bildet Amplituden- und Phaseninformation über die Frequenz ab und bietet somit eine vollständige Beschreibung des linearen Ersatzschaltbildes. Dennoch ist es für ein ungeschultes Auge schwierig, das Ersatzschaltbild aus dem Bode-Plot abzuleiten.

Im Nyquist-Plot lassen sich die einzelnen Elemente der Schaltung leicht ausfindig machen. So ist die Eigenschaft der konstanten Phase der Warburg-Impedanz für den geraden Verlauf bei niedrigen Frequenzen verantwortlich. Der Halbkreis ist für die Parallelschaltung einer Kapazität C_{dl} mit einem Widerstand R_{ct} charakteristisch. Der serielle Widerstand R_s ist durch die Verschiebung entlang der reellen Achse direkt ableitbar.

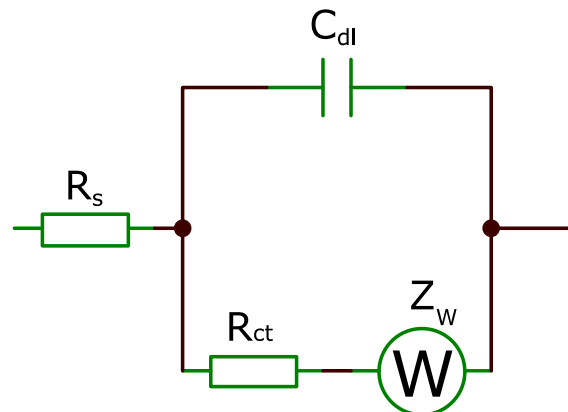


Abbildung 31: Einfaches Ersatzschaltbild einer Elektrode nach Randles: R_s beschreibt das annähernd rein resistive Verhalten des Elektrolyten, C_{dl} das kapazitive Verhalten der elektrochemischen Doppelschicht bei konstanter Elektrolytzusammensetzung an der Elektrode, R_{ct} beschreibt den (im allgemeinen nicht linearen) Ladungstransferwiderstand des Reaktionsedukts an die Elektrode, Z_w (Warburg-Impedanz) modelliert an der Reaktion beteiligte Diffusionsprozesse und tritt als komplexwertige Impedanz mit konstantem Phasenwinkel in Erscheinung.

Durch die Analyse beider Diagramme ist zu erkennen, dass einzelne Bauelemente des Ersatzschaltbildes in bestimmten Frequenzbereichen dominieren. Dies kann dafür verwendet werden, um ausgewählte Effekte, wie die Warburg-Impedanz, durch die entsprechende Wahl des Frequenzbereichs auszublenden. Komplexere Elektrodenprozesse, wie zum Beispiel Adsorption oder mehrstufige Reaktionen, bedürfen eines komplexeren Ersatzschaltbildes und können mit der Randles-Schaltung nicht ausreichend gut beschrieben werden.

Für die in Abschnitt 3.5.3 beschriebene impedanzbasierte Messung der Zell-zu-Substrat-Haftung ist es von Vorteil, den Einfluss von Elektrodeneffekten so gut wie möglich zu reduzieren. Dies kann sowohl durch die Wahl der Elektrode (Vergrößerung von C_{dl}) oder durch die höheren Messfrequenzen (geringerer Einfluss von Z_w) erreicht werden. Anstelle des reellen Widerstands R_s muss bei diesen Messungen zusätzlich das elektrische Ersatzschaltbild der biologischen Zellen beachtet werden. Durch die Messung bei verschiedenen Frequenzen (elektrochemische Impedanzspektroskopie) können die Parameter dieses Ersatzschaltbildes ausgemessen werden. Änderungen der elektrischen Eigenschaften der Zellen lassen Rückschlüsse auf physiologische Zustandsänderungen zu. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist, dass das Ersatzschaltbild auf dem physikalischen Verständnis der Systems bzw. der Zelle beruht und nicht rein mathematisch aus den Messdaten generiert wurde [225].

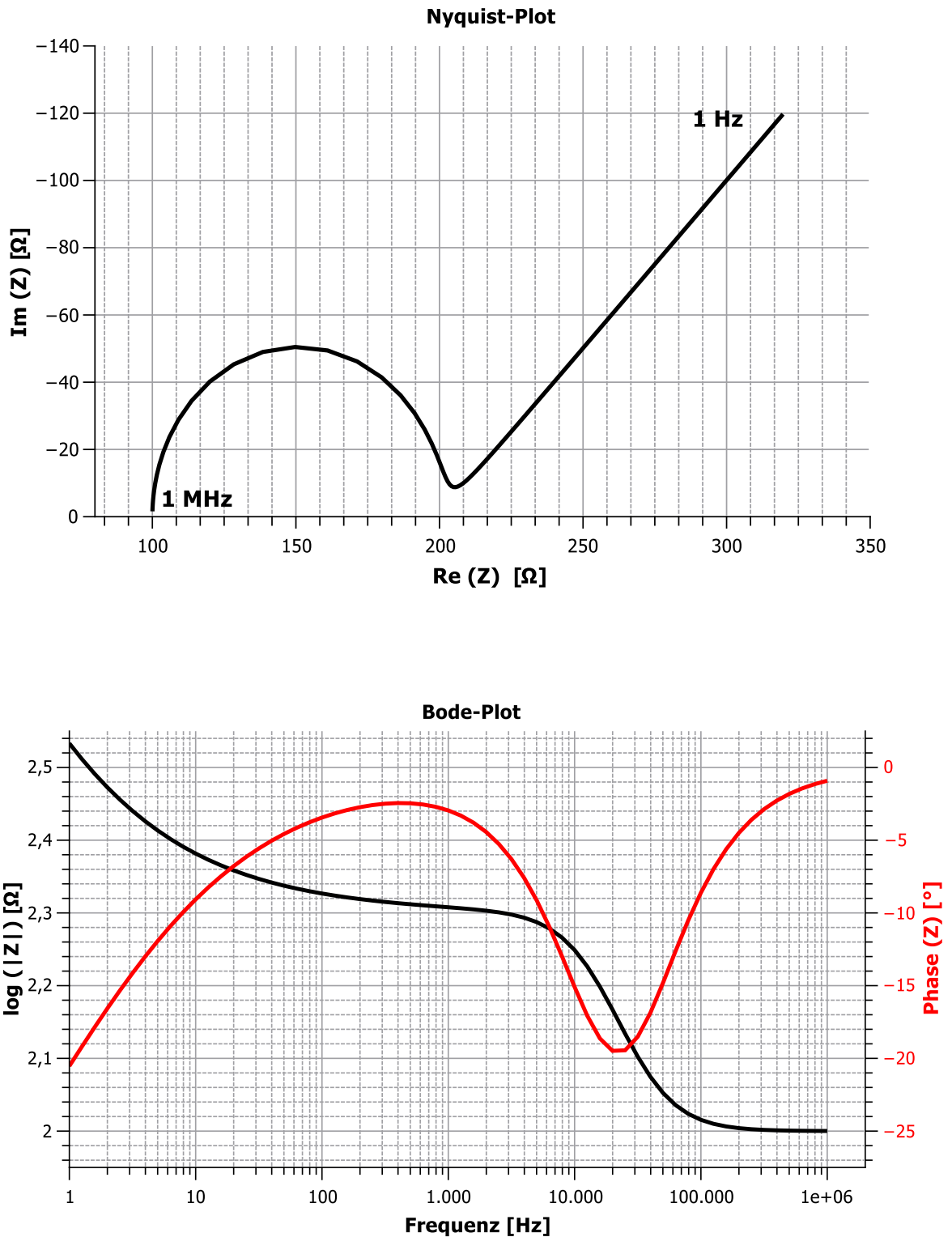


Abbildung 32: Simulierter Nyquist-Plot (oben) und Bode-Plot (unten) eines Randles-Circuit mit den Elementen $R_s = R_{ct} = 100 \Omega$, $C_{dl} = 100 \text{ nF}$, $A_w = 300 \Omega \cdot \text{s}^{-1/2}$. Die Simulation erfolgte mit der Software EC-Lab V11.16 (ZSim-Modul) der Firma Bio-Logic Science Instruments Ltd.

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

3.8.4.2 Einfluss der Elektrodengeometrie auf die Impedanzmessung

Bei der Impedanzmessung wirkt sich die Elektrodengeometrie in zwei verschiedenen Hinsichten auf die Impedanzmessung aus.

Zum einen hat die Größe der Oberfläche der Elektrode einen Einfluss auf den Ladungstransferwiderstand, die Warburg-Impedanz sowie die Doppelschichtkapazität. Die Warburg-Impedanz kann zusätzlich auch von anderen geometrischen Faktoren, wie dem Elektrodenabstand und der Form der Messkammer, abhängig sein.

Zum anderen ist der Widerstand des Elektrolyten von seinem spezifischen Widerstand und von dem Abstand und der Fläche der Messelektroden abhängig.

Um die geometrische Abhängigkeit bei der Messung der Leitfähigkeit von Flüssigkeiten zu kompensieren, wurde die Zellkonstante eingeführt. Sie ist eine geometrieabhängige Konstante, die den Zusammenhang zwischen spezifischem Widerstand und dem tatsächlichen Widerstand zwischen zwei Elektroden (also der Zelle) beschreibt:

$$\rho = \frac{R}{\kappa} \quad (3.13)$$

Dabei steht ρ für die spezifische Leitfähigkeit, R für den Widerstand und κ für die Zellkonstante. Unter Idealbedingungen ist κ für eine festgelegte Elektrodengeometrie konstant und R somit direkt proportional zu ρ .

3.8.4.3 Instrumentierung für die Impedanzmessung

Bei ECIS werden kleine Wechselfspannungen unter 50 mV_{pp} zwischen den Elektroden angelegt, um Zellschädigung zu vermeiden. Ein weiterer Vorteil der geringen Anregungsspannung ist das annähernd lineare Verhalten der elektrochemischen Zelle. In diesem Fall fließt bei sinusförmiger Anregung der Messzelle stets ein sinusförmiger Strom mit derselben Frequenz. Steigt die Amplitude der angelegten Überspannung und verlässt den linearen Bereich, erscheinen Oberschwingungen im Frequenzspektrum des Stromes. Im Folgenden wird der lineare Fall (ohne Oberschwingungen) behandelt. In der entsprechenden Fachliteratur [129] findet sich ein guter Ausgangspunkt zum Thema der nichtlinearen Impedanzspektroskopie.

Da im linearen Fall Strom und Spannung dieselbe Frequenz haben, können Lock-in-Verstärker verwendet werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich zu verbessern [129, 213, 226]. So kann die Impedanz der Elektrode selbst bei sehr niedrigen Anregungsspannungen und

verrauschten Signalen noch zuverlässig gemessen werden. Lock-in-Verstärker können analog aufgebaut sein oder digital implementiert werden [227].

Wie bei der Amperometrie und Potentiometrie wird ein angepasstes analoges Front-End für die Elektroden benötigt. Hierbei sollten folgende drei Fälle unterschieden werden:

1. Zweielektrodenanordnung: Spannung und Strom werden zwischen zwei Elektroden gemessen. Die Impedanz beider Elektroden und des Elektrolyten trägt zur Gesamtimpedanz bei.
2. Dreielektrodenanordnung: Analog zur Potentiostatenschaltung in Abschnitt 3.8.3 wird die Referenzelektrode bei dieser Anordnung stromfrei gehalten. So tragen nur die Impedanz der Arbeitselektrode sowie des Elektrolyten zur gemessenen Impedanz bei. Der Anteil des Elektrolyten verringert sich, je näher die Referenzelektrode an der Arbeitselektrode positioniert wird.
3. Vierelektrodenanordnung: Eine Erweiterung der Dreielektrodenanordnung, bei der auch die Arbeitselektrode in eine stromfreie Referenzelektrode und eine weitere stromführende Gegenelektrode aufgespalten wird. Das System besteht nun aus zwei stromfreien Referenzelektroden und zwei stromdurchflossenen Gegenelektroden. Somit trägt nur die Impedanz des Elektrolyten zur gemessenen Impedanz bei.

Die Zweielektrodenanordnung wird häufig für ECIS eingesetzt. Um die Elektrodenherstellung einfach zu halten und Probleme mit der Biokompatibilität zu meiden, werden beide Elektroden meist aus dem gleichen inerten Material gefertigt. Bei symmetrischem Aufbau der Zelle werden häufig IDEs eingesetzt. Bei nichtsymmetrischen Zellen ist eine Elektrode häufig wesentlich größer dimensioniert als die andere Elektrode, sodass die Impedanz der kleinen Elektrode das Verhalten der Zelle dominiert [44].

Die einfachste Form einer Messschaltung für die Zweielektrodenkonfiguration besteht darin, einen Widerstand R_M in Serie zur Messzelle zu schalten. Ist die Impedanz des Widerstands um Größenordnungen höher als die Impedanz der Messzelle R_{Zelle} , kann eine Wechselspannungsquelle U_{Quelle} verwendet werden, um einen sinusförmigen Strom mit konstanter Amplitude einzuprägen. Es gilt:

$$I_{Zelle} = \frac{U_{Quelle}}{R_{Zelle} + R_M} \approx \frac{U_{Quelle}}{R_M} \quad (\text{für } R_{Zelle} \ll R_M) \quad (3.14)$$

Ist R_M bekannt und zusammen mit U_{Quelle} korrekt dimensioniert, kann der Anregungsstrom über Formel (3.14) aus der Anregungsspannung berechnet werden. Der Lock-in-Verstärker misst die Spannung an der Zelle und setzt Amplitude und Phase in Verhältnis zum Anregungsstrom. Auf

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

diese Weise lässt sich mit einfachen Mitteln die Impedanz des Zweielektrodensystems bestimmen. Giaever und Kesse setzten diese Technik bereits 1984 für ECIS ein [44].

Um unabhängig von der Elektrodengröße eine geringe Anregungsspannung sicherzustellen, kann statt der Einprägung des Wechselstroms eine Wechselspannung angelegt werden. Für diese Konfiguration wird eine Wechselspannungsquelle mit der gewünschten Anregungsamplitude an eine der beiden Elektroden angeschlossen. Die andere Elektrode wird mit einem Transimpedanzverstärker verbunden. Dieser sorgt dafür, dass die Elektrode auf einem definierten konstanten Potential liegt. Gleichzeitig wandelt er den Strom, der durch die Zelle fließt, in eine messbare Spannung (vgl. Abschnitt 3.8.3.2) [17, 228].

Mucha et al. entwickelten einen Impedanz-zu-Frequenz-Wandler und realisierten diesen in CMOS-Technologie, um ihn für ECIS zu verwenden [90]. Neben der Elektronik wurden 64 Arbeitselektroden in asymmetrischer Zweielektrodenanordnung auf dem Chip integriert. Zur Messung der Zellimpedanz wird die kapazitive Eigenschaft der Messelektrode genutzt. Eine schaltbare Stromquelle lädt oder entlädt die Messelektrode mit einem konstanten Strom, wobei die Spannung an der Arbeitselektrode einen Komparator steuert, um die Stromquelle umzupolen. Erhöht sich der Widerstand zwischen den Elektroden, fällt durch die konstante Stromquelle eine höhere Spannung zwischen ihnen ab und die Schwellspannung des Komparators wird schneller erreicht. Das Resultat ist ein pulsweitenmoduliertes Signal am Ausgang des Komparators. Die Spannungsamplitude an der Arbeitselektrode wird über die Wahl der Schaltzeitpunkte auf 20 mV limitiert. Die Integration von Messelektronik und Sensor auf einem gemeinsamen Chip führt zu einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis trotz der geringen Größe der Arbeitselektroden [89–91].

Impedanzmessungen mittels einer Dreielektrodenanordnung können mit den in Abschnitt 3.8.3 beschriebenen Potentiostatenschaltungen durchgeführt werden. Hierbei muss geprüft werden, ob die eingesetzten Verstärker für den Frequenzbereich der Messung geeignet sind. Der Einfluss des Transimpedanzverstärkers auf die Messung wurde bei FET-basierten ECIS-Messungen von Susloparova in [229] ausführlich beschrieben.

Ein hoher Rückkopplungswiderstand am Transimpedanzverstärker wirkt sich negativ auf die Phasenreserve des Verstärkers aus. Zusätzlich addiert sich die Kapazität der Elektrode zur Eingangskapazität des Verstärkers, wodurch die Phasenreserve weiter reduziert wird. Dies kann zu Instabilitäten in Form von Überschwingen und Oszillation führen. Bei der Verwendung einer großen Gegenelektrode ergibt sich für den Spannungsregler der Referenzelektrode eine

besonders hohe kapazitive Last, die ebenfalls die Phasenreserve des verwendeten Verstärkers reduziert.

Die Vierelektrodenanordnung ist für ECIS nicht relevant, da der zellulär bedingte Spannungsabfall nur in unmittelbarer Nähe der stromführenden Elektrode messbar ist. Die Vierelektrodenanordnung unterdrückt generell den Einfluss von Elektrodeneffekten an den beiden stromführenden Elektroden und wird deswegen bei Messungen der Impedanz von Elektrolyten oder Membranen eingesetzt. Ein Beispiel aus der Mikrobiologie ist die TEER (Transepithelial Electrical Resistance) Messung, bei der die Impedanz einer zellbesiedelten Membran gemessen wird.

Pliquette et al. beschreiben, wie die Vorteile der Vierelektrodenanordnung durch die Anregung mit einer symmetrischen Stromquelle voll ausgeschöpft werden können. So können parasitäre Effekte der Instrumentierung mit Hilfe einer differentiellen Signalaufnahme kompensiert werden [230]. Dies muss vor allem bei Messungen in hohen Frequenzbereichen (> 1 MHz) in Betracht gezogen werden.

3.8.5 Instrumentierung bei multiparametrischer Messung

Um einen bestimmten Analyten elektrochemisch zu detektieren, wird ein Sensor in Kombination mit einer geeigneten Messmethode eingesetzt. In der Regel werden Sensor und Messmethode so gewählt, dass eine hohe Sensitivität für den Analyten und eine geringe Querempfindlichkeit für andere Stoffe erreicht wird. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass verschiedene Analyten mit verschiedenen Sensoren und in einigen Fällen auch mit unterschiedlichen Messmethoden detektiert werden müssen.

Elektrochemische Mehrsensorsysteme stellen eine besondere Herausforderung an die Instrumentierung dar, wenn sich die Sensoren in demselben Elektrolyt befinden [99]. Die nachfolgenden Abschnitte sollen dieses Problem verdeutlichen und neben den bekannten Lösungsstrategien den jüngsten Stand der Forschung zusammenfassen.

3.8.5.1 Potentiometrische Mehrsensorsysteme

Im Falle rein potentiometrischer (stromfreier) Messungen können mehrere Sensoren ohne Probleme kombiniert werden. Wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben wurde, kann die Referenzelektrode niederohmig mit der Schaltungsmasse verbunden und die Arbeitselektrode über einen Spannungsfolger angeschlossen werden. Weitere Messelektroden können mit

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

zusätzlichen Spannungsfolgern hochohmig angeschlossen werden. Dadurch wird der Stromfluss zwischen den einzelnen Elektroden und somit eine Beeinflussung verhindert.

Dennoch können die nichtidealen Eigenschaften eines realen Operationsverstärkers zu Problemen führen, beispielsweise wenn die Stromversorgung eines einzelnen OPV abgeschaltet wird. Dies kann je nach internem Aufbau des OPV bewirken, dass der Eingangswiderstand des Verstärkers drastisch reduziert wird und dies zu einem Stromfluss durch die entsprechende Messelektrode sowie durch die niederohmig angeschlossene Referenzelektrode führt. Hierdurch ändert sich das Potential der Referenzelektrode und verschiebt folglich das gemessene Potential aller übrigen Elektroden. In der Regel sind die ESD-Schutzdioden des OPV für dieses Phänomen verantwortlich.

3.8.5.2 Amperometrische Mehrsensorsysteme

Amperometrische Messungen können mit geeigneten Schaltungen parallel an mehreren Sensoren durchgeführt werden. Der nötige Schaltungsaufwand variiert dabei je nach verwendeter Potentiostatenschaltung [213].

Die einfachste Umsetzung basiert auf den in Abbildung 28 (a) und (b) gezeigten Schaltungen (siehe Abschnitt 3.8.3.1). **OPV1** behält dabei seine Funktion als Regler des Referenzelektrodenpotentials bezüglich der Schaltungsmasse bei. **OPV2**, samt seiner Beschaltung als Transimpedanzverstärker, kann entsprechend der Anzahl der Sensoren vervielfältigt werden. Um die zusätzlichen Arbeitselektroden auf eine individuelle Spannung zu polarisieren, muss eine abweichende Offsetspannung am nichtinvertierenden Eingang des jeweiligen Transimpedanzverstärkers angelegt werden [213].

So können beliebig viele Arbeitselektroden dem System hinzugefügt werden und sich eine gemeinsame Referenzelektrode teilen. Die Gegenelektrode führt in diesem Fall die Summe der Gegenströme aller Arbeitselektroden. Werden die Sensoren in unterschiedlichen Arbeitsbereichen (anodisch sowie kathodisch) betrieben, dann heben sich die Ströme auf und der Strom durch die Gegenelektrode kann betragsmäßig geringer ausfallen als bei einem einzeln betriebenen Sensor.

3.8.5.3 Kombination verschiedener Messmethoden

Eine für Elektroingenieure sehr intuitive Methode zur Realisierung von Mehrsensorsystemen ist das Duplizieren bzw. Vervielfältigen gesamter Potentiostatenschaltungen samt Referenz- und Gegenelektrode. Dies ist jedoch nur möglich, wenn jede dieser Schaltungen von den anderen galvanisch getrennt bzw. elektrisch isoliert wird. Durch die Verwendung von isolierten

Spannungswandlern oder Trennverstärkern können die einzelnen Schaltungsteile voneinander entkoppelt und Ausgleichsströme verhindert werden [17, 213, 231–233].

Sind die einzelnen Messschaltungen nicht potentialfrei zueinander, würden die jeweiligen Regler des Referenzelektrodenpotentials die Potenzialdifferenz der Messschaltungen kompensieren und es würden permanent Ausgleichsströme zwischen den entsprechenden Gegenelektroden fließen. Dies wäre selbst dann der Fall, wenn die einzelnen Messschaltungen auf dem gleichen Bezugspotential liegen, da Referenzelektroden fertigungsbedingt eine gewisse Potentialabweichung von einigen Millivolt zeigen, welche die Regler dann kompensieren würden.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die galvanische Trennung der einzelnen Sensoren eine gegenseitige Beeinflussung verhindert oder sogar ausschließt [17, 23, 231]. Dies muss jedoch nachfolgend differenzierter betrachtet werden.

Die galvanische Trennung sorgt dafür, dass jeder einem Sensor zugeordnete Schaltungsteil eine individuelle und potentialfreie Masse erhält. Die Messschaltung setzt die Referenzelektrode in einen fixen Bezug zu dieser Masse (siehe Abschnitt 3.8.1 bis 3.8.3). Würde man verschiedene Referenzelektroden auf dieselbe Masse legen bzw. auf ein und dasselbe Potential, so würden durch diesen Kurzschluss Ausgleichsströme fließen. Der Stromfluss durch die Referenzelektroden kann das Bezugspotential und somit die gesamte Messung verfälschen. Galvanisch getrennte Massen verhindern somit die Ausgleichsströme zwischen einzelnen Sensoren und zugehörigen Schaltungsteilen, sodass diese auf unterschiedliche elektrochemisch definierte Bezugspunkte referenziert werden können.

Trotz galvanischer Trennung können sich amperometrische oder impedimetrische Messungen beeinflussen, da bei diesen Messungen ein Stromfluss durch den Elektrolyten gegeben ist. Zusammen mit dem Widerstand des Elektrolyten bewirkt dieser Stromfluss einen Spannungsabfall, der das Potential der Arbeitselektrode verfälscht. Dies wird allgemein als iR -Fehler bezeichnet (vgl. Abschnitt 3.8.2). Wie groß der Fehler ist, hängt von der Stromstärke, der Geometrie und der Positionierung der Elektroden in der Zelle ab [213]. Ändert sich bei einem Mehrsensoren-System der Messstrom eines Sensors, kann dies über den iR -Fehler eine Rückwirkung auf die restlichen Sensoren haben.

Wiest verwendete bei der Implementierung eines ISFET-basierten Sauerstoffsensors (vgl. Abschnitt 3.6.2.6) Trennverstärker, um die amperometrisch betriebene Elektrode zur Sauerstoffreduktion vom Rest der ISFET-Schaltung zu entkoppeln [23]. In diesem Fall

3.8 Instrumentierung elektrochemischer Sensoren

verhinderte die galvanische Trennung einen Stromfluss zwischen der Referenzelektrode der ISFET-Schaltung und den Elektroden für die Sauerstoffreduktion.

Schmidhuber setzte drei galvanisch getrennte Schaltungen ein, um eine multiparametrische Messung von pH, Sauerstoffgehalt und Impedanz zu ermöglichen [17]. So konnten bereits beschriebene Schaltungen für potentiometrische, amperometrische und impedimetrische Messungen miteinander kombiniert werden. Schmidhuber hat darauf hingewiesen, dass die Verwendung von DC/DC-Wandlern und Trennverstärkern, elektromagnetische Störungen [des Messsignals] bewirken können und einen hohen schaltungstechnischen Aufwand mit sich bringen [17]. Schmidhuber gibt für die Messung von pH und Sauerstoff ein Rauschen von 5 mV_{pp} an. Umgerechnet in das Rauschen des pH-Wertes entspricht dies – bei Berücksichtigung der achtfachen Verstärkung der Schaltung – einem Peak-to-Peak-Rauschen von ca. 0,01 pH.

Vonau et al. entwickelten einen Messaufbau für die simultane Messung von pH, Redoxpotential, Sauerstoffgehalt und Glukosekonzentration. Sie verwendeten für diesen Zweck zwei potentiometrische Schaltungen (für pH und Redoxpotential) sowie zwei amperometrische Schaltungen (für die Sauerstoff- und Glukosemessung). Alle vier Schaltungsteile wurden auch hier galvanisch getrennt, um Wechselwirkungen der Sensoren zu verhindern. Mit Hilfe von Multiplexern konnten bis zu sechs dieser Sensorarrays parallel betrieben werden. Abbildung 33 zeigt den Messaufbau sowie den zur Messung verwendeten Potentiostaten [231, 233].



Abbildung 33: Ein Multikanal-Interface zur multiparametrischen Messung in sechs verschiedenen Probekammern [233].

Lima et al. thematisierten ebenfalls die multiparametrische Messung in mehreren parallel betriebenen Probekammern [99]. Hierfür entwickelten die Forscher einen modularen Potentiostaten, der für Mehrsensoren-systeme ausgelegt ist. Da das System auf dem Cytosensor Microphysiometer (vgl. Abschnitt 3.5.2.1) aufbaut, wurde es so gestaltet, dass eine Beeinflussung zwischen LAPS und Multipotentiostat ausgeschlossen ist. Der Potentiostat hat die Größe eines 19-Zoll-Racks (normiertes Leiterplatten-Einschubsystem) und kann bis zu acht verschiedene Module aufnehmen. Die Autoren beschreiben zwei Arten von Modulen, die miteinander kombinierbar sind: Das Multipotentiostaten-Modul kann amperometrische Messungen mit drei verschiedenen Arbeitselektroden durchführen. Diese drei Elektroden teilen sich in diesem Fall eine gemeinsame Referenz und eine Gegenelektrode. Das Modul wird für die Sauerstoffmessung sowie die Messung von Glukose und Laktat verwendet.

Das OCP-Modul (Open Circuit Potential) misst die Leerlaufspannung zwischen zwei Elektroden und wird für pH-Messungen mittels einer Iridiumoxid-Arbeitselektrode eingesetzt. Durch die Verwendung eines Instrumentenverstärkers ist sowohl die Referenzelektrode als auch die Arbeitselektrode hochohmig angebunden, sodass Ausgleichsströme zwischen den Referenzelektroden des OCP-Moduls und dem Multipotentiostat verhindert werden.

Die Analog-/Digital-Wandlung findet in einem weiteren Modul statt, das als Steckkarte in einem Computer verbaut wird. Bei den durchgeführten Messungen zeigte der Potentiostat allgemein ein niedriges Rauschen, das sich durch die Kombination der verschiedenen Module nur geringfügig verschlechterte. Die Autoren merkten an, dass der Betrieb der angebundenen Peristaltikpumpen zu einer Verschlechterung des Rauschens geführt hat. Es wurde eine Standardabweichung von ca. 0,11 % für das OCP-Modul und von ca. 1,2 % für den Multipotentiostat angegeben [99].

4 ENTWICKLUNG DES MIKROTITERPLATTEN-BASIERTEN MIKROPHYSIOMETERS

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

4.1.1 Grundlagen und Modellbeschreibung

Elektrochemische Prozesse koppeln chemische Redoxreaktionen an einen elektrischen Ladungstransfer. In der Regel findet dies an einer Elektrode statt. Ein solcher Ladungstransfer kann zu einer Potentialänderung der Elektrode führen. Werden zwei Elektroden mit unterschiedlichem Potential über einen Widerstand verbunden, fließt die generierte Ladung ab und chemische Energie wird kontinuierlich in elektrische Energie umgewandelt.

Elektrochemische Sensoren basieren auf der Strom- und/oder Spannungsmessung zwischen zwei oder mehreren Elektroden. Die Auswertung der elektrischen Signale lässt einen Rückschluss auf die Messgröße zu.

Für die nachfolgenden Betrachtungen werden die elektrochemischen Messprinzipien in drei Kategorien unterteilt:

1. Die Potentiometrie bezeichnet die stromlose Messung des Potentialunterschieds zwischen zwei Elektroden. In der Praxis wird die Leerlaufspannung der elektrochemischen Zelle ermittelt und der Stromfluss durch den Sensor mit einer geeigneten Messschaltung sowie einem sorgfältig gewählten Messaufbau nahe null gehalten. Gute Messgeräte mit Triaxialkabeln können den Stromfluss auf Femtoamper-Level begrenzen.
2. Die Voltametrie und die Amperometrie sind strombehaftete Messprinzipien, bei denen der Zusammenhang zwischen Stromfluss und Potentialdifferenz betrachtet wird. In der Regel werden hierfür entweder der Stromfluss oder die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden auf den gewünschten Wert geregelt und der andere Parameter gleichzeitig

aufgezeichnet. Die hierzu eingesetzten Messschaltungen werden Potentiostaten genannt.

3. Die Impedimetrie stellt einen Spezialfall der Volta- und Amperometrie dar und misst den komplexen Widerstand. Im Zentrum der Betrachtung steht deswegen der frequenzabhängige Verlauf der Impedanz. Die typische Messmethode besteht darin, eine sinusförmige Wechselspannung oder einen sinusförmigen Wechselstrom einzuprägen und den komplementären Parameter zu messen. Die Amplitude zur Anregung wird ausreichend klein gewählt, um nichtlineare Effekte zu verhindern. Dies ist notwendig, da viele elektrochemische Effekte einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen Spannung und Strom haben.

Um ein elektrochemisches Mehrsensoren-system aufzubauen, ist es essenziell, ein modellhaftes Verständnis für die einzelnen Sensorkomponenten zu erhalten. Die wichtigsten Komponenten sind die Elektroden, die Membranen und der Elektrolyt. Bei der Beschreibung der Komponenten ist es hilfreich, zwischen dem stromfreien und dem strombehafteten Fall zu unterscheiden.

Im stromfreien Fall herrscht zwischen einer Elektrode und dem Elektrolyten ein Gleichgewicht ihrer elektrochemischen Potentiale. Daraus resultiert eine elektrische Potentialdifferenz zwischen diesen beiden Phasen. Die Potentialdifferenz ist durch die chemische Beschaffenheit der Elektrode und des Elektrolyten gegeben und wird in der Nernst-Gleichung beschrieben. Die Potentialdifferenz kann mit einer idealen Spannungsquelle modelliert werden.

Im strombehafteten Fall führt der Stromfluss durch die Elektrode zu einem Ungleichgewicht der elektrochemischen Potentiale und dementsprechend zu Ausgleichsreaktionen, die bestrebt sind, das ursprüngliche Gleichgewicht wiederherzustellen. Diese Reaktionen können auf verschiedene Arten gehemmt sein, beispielsweise durch den nötigen Stofftransport zur Elektrode oder durch eine langsame Reaktionskinetik. Die Hemmung der Ausgleichsreaktionen führt zu einem Spannungsabfall und kann durch einen Widerstand modelliert werden. Der Widerstand ist in der Regel nicht linear und wird von verschiedenen Parametern, wie Elektrodenfläche, -geometrie und Beschaffenheit von Elektrode und Elektrolyt bestimmt.

Membranen im elektrochemischen Sprachgebrauch sind Strukturen, die eine Durchlässigkeit für bestimmte Stoffe besitzen, jedoch eine schnelle Durchmischung von zwei Phasen verhindern. Bei der strombehafteten Messung kann eine Membran als ohmscher Widerstand betrachtet werden. Die Membran hemmt den Durchtritt der Ladungsträger (Ionen) und es fällt eine Spannung über der Membran ab.

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

Bei stromfreier Messung ist die Spannungsdifferenz über die Membran null, wenn auf beiden Seiten der Membran dieselben Ionenkonzentrationen vorliegen. Ist dies nicht der Fall, finden diffusive Ausgleichsprozesse statt und es kommt zu einem Stofftransport durch die Membran. Dies kann auch im stromfreien Fall zu einer kleinen Potentialdifferenz im ein- bis zweistelligen Millivoltbereich führen, wenn sich Kationen und Anionen unterschiedlich schnell durch die Membran bewegen. Dieser Effekt spielt bei Referenzelektroden eine wichtige Rolle und kann bei Nichtbeachtung zu Messfehlern führen [234].

Die Zusammensetzung des Elektrolyten spielt beim Einstellen des Gleichgewichts an Elektroden und Membranen eine essenzielle Rolle. Sie hat eine direkte Auswirkung auf das Elektroden- bzw. Transmembranpotential. Diese konzentrationsabhängige Potentialänderung machen sich potentiometrische Sensoren zunutze.

Werden Messungen im Niederfrequenzbereich an Lösungen mit hoher Ionenkonzentration (z. B. physiologische Lösungen) durchgeführt, ist es ausreichend, das Elektrolyt als einen rein ohmschen Widerstand zu beschreiben. Sein Wert ist abhängig von der Ionenkonzentration im Elektrolyten.

4.1.2 Wechselwirkungen zwischen elektrochemischen Sensoren

Elektrochemische Sensoren können sich über drei verschiedene Mechanismen gegenseitig beeinflussen:

1. Physikalisch: Die Sensoren beeinflussen sich, indem sie die physikalischen Gegebenheiten des Messsystems verändern. Ein Beispiel ist ein Sensor, der durch übermäßige Wärmeabgabe das Gesamtsystem aufheizt. Ein weiteres Beispiel ist ein Sensor, der durch seine Geometrie und Positionierung einen anderen Sensor so verdeckt bzw. von der Messlösung abschirmt, dass dieser in seiner Funktion beeinträchtigt wird.
2. Chemisch: Das Messsystem wird durch die Sensoren in seiner chemischen Zusammensetzung (lokal oder global) verändert. Ein Beispiel sind zwei amperometrische Sensoren für die Sauerstoffmessung. Bei diesen Sensoren kommt es zur elektrochemischen Umwandlung des Analyten an der Messelektrode, wodurch die Messgröße in unmittelbarer Nähe des Sensors verändert wird. Werden zwei jener Sensoren so nah aneinander positioniert, dass sich ihre lokalen Einflussbereiche überlappen, werden sich die Sensoren gegenseitig beeinflussen. Ein anderes Beispiel ist eine tropfende Quecksilberelektrode, die kontinuierlich Quecksilber an die Messumgebung abgibt.

3. Elektrisch: Diese Art der Wechselwirkung tritt auf, wenn der beeinflussende Sensor elektrisch mit dem Messsystem interagiert. Dies muss vor allem bei amperometrischen Sensoren, die einen Stromfluss durch den Elektrolyten bewirken, berücksichtigt werden. Durch den Widerstand des Elektrolyten kommt es zu einem Spannungsabfall. Diese Spannung addiert sich als Störgröße auf alle gemessenen Potentiale. Als Beispiel wird ein potentiometrischer Sensor genannt, der zwischen zwei Elektroden eine Spannung misst. Da die Messung stromfrei erfolgt, ist der Spannungsabfall über den Elektrolyten gleich null. Wird ein amperometrischer Sensor so positioniert, dass ein Teil des Messstromes durch den Elektrolyten zwischen dem potentiometrischen Sensor fließt, kommt es zu einem zusätzlichen Spannungsabfall. Die Höhe dieser Störspannung kann bei hohen Strömen oder geringer Leitfähigkeit des Elektrolyten einen wesentlichen Messfehler verursachen.

4.1.3 Reduktion der elektrischen Wechselwirkung

In der Lehre der elektromagnetischen Verträglichkeit (EMV) werden vier unterschiedliche Kopplungsmechanismen zwischen einer Störquelle und einer Störsenke unterschieden. Die elektromagnetische Kopplung wird durch elektromagnetische Strahlung geschlossen und kann über lange Distanzen wirken. Kapazitive und induktive Kopplung beruhen auf der Wirkung eines elektrischen bzw. eines magnetischen Feldes. Die galvanische Kopplung tritt auf, wenn Quelle und Senke eine gemeinsame Impedanz besitzen.

Die galvanische Kopplung ist für elektrochemische Systeme ausschlaggebend, wenn Sensoren mindestens eine gemeinsame Komponente (z. B. Elektroden, das Elektrolyt oder die elektrischen Anschlüsse) besitzen und es zum Stromfluss durch diese Komponente kommt. Die kapazitive und die induktive Kopplung spielen für die elektrische Wechselwirkung zwischen elektrochemischen Sensoren eine untergeordnete Rolle. Sie sind dennoch bei der Betrachtung des Messsystems relevant.

Die induktive Kopplung muss beispielsweise beim Leiterplattenentwurf der Messschaltung berücksichtigt werden, um Erdschleifen zu verhindern. Sie darf auch bei der Auslegung der Messkammer und der Fluidik nicht vernachlässigt werden. Durch seine Leitfähigkeit kann der Elektrolyt eine Erdschleife bilden und so externe Störungen in das System schleusen. Lange Schlauchsysteme sind hierfür besonders anfällig.

Durch die Analogie zur EMV-Lehre können vier wesentliche Lösungsstrategien abgeleitet werden:

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

1. Gemeinsame Komponenten vermeiden. wenn diese stromdurchflossen sind und einen Beitrag an den gemessenen bzw. geregelten Potentialen haben. Eine gemeinsame Gegenelektrode für mehrere amperometrische Sensoren ist von der rein elektrischen Betrachtung her unproblematisch, wenn eine Dreielektrodenanordnung verwendet wird (vgl. Abschnitt 3.8.5.2).
2. Ströme gering halten. Nicht immer lässt sich der Stromfluss durch eine gemeinsame Komponente verhindern, z. B. wenn sich mehrere Sensoren denselben Elektrolyten teilen. Dadurch auftretende Störspannungen können minimiert werden, wenn der Strom der amperometrischen Sensoren reduziert wird. Dies kann in der Praxis durch die Minimierung der Elektrodenfläche erreicht werden.
3. Widerstand der gemeinsamen Komponenten reduzieren. Die Störspannung kann weiter minimiert werden, wenn der Widerstand von geteilten Komponenten, wie dem Elektrolyten, verringert wird.
4. Unnötige Ausgleichsströme verhindern. Wenn mehrere Sensoren in einem elektrochemischen System betrieben werden, kann ungewünschter Stromfluss ohne die direkte Beteiligung einer amperometrischen Messung entstehen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Potentialdifferenz zwischen Messlösung und Messschaltung überbestimmt ist und kann auftreten, wenn mehrere Potentiostatenschaltungen gleichzeitig in demselben Elektrolyten betrieben werden, ohne dabei die Schaltungsteile galvanisch zu trennen.

Die genannten Lösungsstrategien können durch geeignete Wahl von Elektrodenfläche, Geometrie, Position, Elektrolyt und externer Beschaltung der Sensoren verfolgt werden. In der weiteren theoretischen Betrachtung soll die Instrumentierung der Sensoren untersucht werden. Die Geometrie und Position der Sensoren werden in Abschnitt 4.3.4 und den folgenden Abschnitten behandelt.

4.1.4 Schaltungsentwurf für Mehrsensorsysteme

An dieser Stelle wird der grundlegende Schaltungsentwurf für die kombinierte Instrumentierung verschiedener Sensoren durchgeführt. Alle verwendeten Bauteile, Regler und Komponenten werden nachfolgend als ideal angenommen. In Abschnitt 4.3.2.1 wird die hier entwickelte idealisierte Schaltung durch Dimensionierung der Bauteile realisiert und an praktisch relevante Gegebenheiten (Stabilität, Spannungsversorgung, Bandbreite) angepasst.

Der Schaltungsentwurf basiert auf dem bekannten Stand der Technik (siehe Kapitel 3.8) sowie auf der Anwendung von EMV-Lehren auf elektrochemische Systeme.

4.1.4.1 Kombinierte Instrumentierung von ampero- und potentiometrischen Sensoren

Amperometrische und potentiometrische Messschaltungen haben gemeinsam, dass sie den Stromfluss durch die Referenzelektrode auf ein Minimum reduzieren. Bei der amperometrischen Schaltung ist der Stromfluss durch die Arbeitselektrode erwünscht und notwendig, wohingegen bei der potentiometrischen Messung die Arbeitselektrode stromfrei bleiben muss. Deshalb benötigt lediglich die amperometrische Dreielektrodenschaltung eine stromführende Gegenelektrode.

Obwohl beide Schaltungen den Stromfluss durch die Referenzelektrode verhindern, setzen sie das auf zwei unterschiedliche Arten um. Bei der potentiometrischen Schaltung kann die Referenzelektrode niederohmig auf ein durch die Messschaltung definiertes Bezugspotential gelegt werden. Messlösung und Messschaltung haben in diesem Fall dasselbe Bezugspotential. Die Arbeitselektrode wird über einen Impedanzwandler hochohmig mit der Messschaltung verbunden. Hierdurch wird der Stromfluss zwischen beiden Elektroden verhindert, auch wenn eine Potentialdifferenz zwischen ihnen herrscht. Bei der amperometrischen Messung wird eine Potentiostatenschaltung (siehe Abschnitt 3.8.3) eingesetzt, um das Potential der Referenzelektrode so zu regeln, dass es einen definierten Bezug zur Schaltungsmasse aufweist. Die Referenzelektrode ist in diesem Fall hochohmig mit der Messschaltung verbunden. Eine zusätzliche Elektrode, die Gegenelektrode, wird aus diesem Grund niederohmig an die Messschaltung angeschlossen. Ein Regler steuert das Potential der Gegenelektrode, die als Stellgröße dient, und somit das Potential der Messlösung. Das Potential der Referenzelektrode ist über die in Abschnitt 4.1.1 genannten Mechanismen an das Potential der Messlösung gekoppelt.

Es ist wichtig zu verstehen, dass beide Methoden das gleiche Resultat liefern: Das Potential der Referenzelektrode hat einen definierten Bezug zur Messschaltung. Daraus folgt die Erkenntnis, dass ein potentiometrischer Sensor ebenfalls mit einer Potentiostatenschaltung betrieben werden kann. Dies wird in Abbildung 34 dargestellt.

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

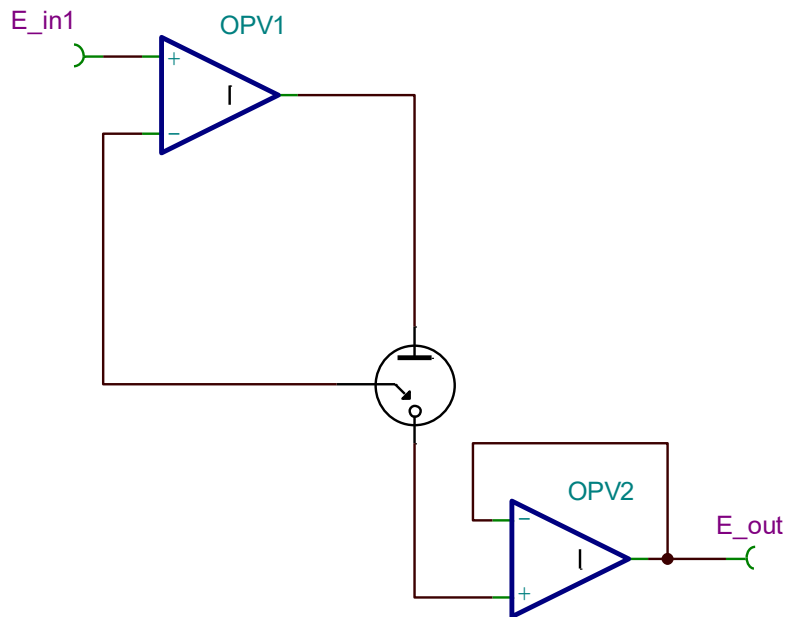


Abbildung 34: Die gezeigte Schaltung ermöglicht eine potentiometrische Messung in Verbindung mit einer Potentiostatenschaltung. Im Gegensatz zur amperometrischen Messung wird ein Stromfluss durch die Arbeitselektrode mit dem Spannungsfolger OPV2 verhindert. OPV1 stellt sicher, dass das Potential der Referenzelektrode auf E_{in1} geregelt wird. Das gemessene Potential der Arbeitselektrode kann dadurch auf die Referenzelektrode bezogen werden.

Diese Schaltung kann mit den in Abschnitt 3.8.3.2 beschriebenen Methoden analysiert werden. Die Referenzelektrode liegt demnach auf dem Potential E_{in1} . Die Differenz ΔE zwischen Referenzelektrode und Messelektrode ergibt sich zu:

$$\Delta E = E_{Mess} - E_{Ref} = E_{out} - E_{in1} \quad (4.1)$$

Eine Veränderung der Eingangsspannung E_{in1} führt nicht zu einer Änderung des Ergebnisses ΔE , da das Anheben des Referenzelektrodenpotentials über ein Anheben des Potentials der Messlösung (bezogen auf die Messschaltung) erfolgt. Folglich erhöhen sich gleichermaßen das Potential der Messelektrode und die Ausgangsspannung E_{out} .

Beim Verständnis dieser Schaltung ist es hinderlich, die Gegenelektrode als stromführende Elektrode zu betrachten. Denn anders als bei der amperometrischen Dreielektrodenmessung, gibt es hier keine weiteren stromführenden bzw. niederohmig angeschlossenen Elektroden und somit auch keinen makroskopischen Stromfluss. Die niederohmig angeschlossene Gegenelektrode ist dennoch nötig, um das Potential der Referenzelektrode zu regeln und Störungen entgegenzuwirken. Ein Beispiel für eine solche Störung ist die elektrostatische Aufladung von Messlösung oder Messschaltung, die dafür sorgen kann, dass sich die Bezugspotentiale der beiden Komponenten unkontrolliert voneinander entfernen.

Durch die Verwendung der Potentiostatenschaltung ist es möglich, beliebig viele zusätzliche Messelektroden einzufügen. Dabei legt die Beschaltung der Messelektrode fest, ob sie potentiometrisch oder amperometrisch betrieben wird.

Abbildung 35 zeigt eine Beispielschaltung, die neben einem amperometrischen Sensor zwei potentiometrische Sensoren betreiben kann. Die Schaltung verwendet eine gemeinsame Referenzelektrode für alle Arbeitselektroden. Da nur ein Referenzsystem verwendet wird, kommt es zu keinen Ausgleichsströmen zwischen diesen und auf eine galvanische Trennung der einzelnen Messelektroden kann verzichtet werden.

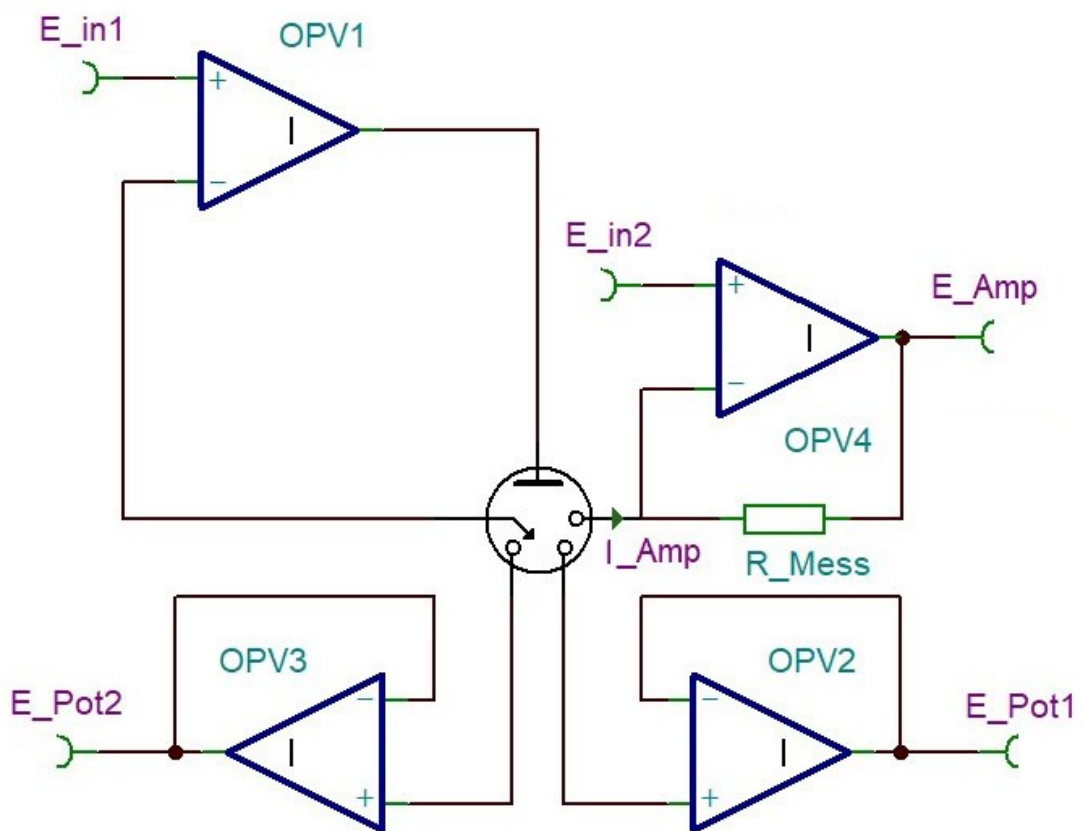


Abbildung 35: Die gezeigte Potentiostatenschaltung basiert auf vier Operationsverstärkern und erlaubt neben zwei potentiometrischen Messungen simultan eine amperometrische Messung. OPV1 regelt hierbei die Spannung der Referenzelektrode auf ein definiertes Potential (E_{in1}). Die als Spannungsfolger geschalteten OPV2 und OPV3 dienen als Impedanzwandler und stellen sicher, dass unabhängig von der weiteren Signalkette kein Strom durch die Arbeitselektroden fließt. OPV4 ist als Transimpedanzverstärker beschaltet. Er regelt das Potential der angeschlossenen Arbeitselektrode auf E_{in2} und wandelt den Elektrodenstrom (I_{Amp}) in eine proportionale Spannung (E_{Amp}) um.

Der ideale Operationsverstärker OPV1 definiert das Bezugspotential der Messschaltung bezüglich der Referenzelektrode. OPV2 und OPV3 sind als Spannungsfolger beschalten und

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

bilden hochohmige Eingänge für die potentiometrischen Sensoren. **OPV4** regelt das Potential der amperometrisch betriebenen Arbeitselektrode auf E_{in2} . Die Polarisierungsspannung ΔE_{pol} ist die Potentialdifferenz zwischen dieser Arbeitselektrode und der Referenzelektrode:

$$\Delta E_{pol} = E_{in1} - E_{in2} \quad (4.2)$$

Gleichzeitig ist **OPV4** als Transimpedanzverstärker beschalten. Seine Ausgangsspannung E_{Amp} hängt von dem Strom durch die Messelektrode I_{Amp} ab:

$$E_{Amp} = E_{in2} - I_{Amp} R_{Mess} \quad (4.3)$$

Zu beachten bleibt nichtsdestotrotz, dass der Strom der amperometrisch betriebenen Elektrode zusammen mit dem Elektrolyten einen Spannungsabfall verursacht. Dieses Problem ist als iR -Fehler bekannt und in allen amperometrischen Messungen involviert (siehe Abschnitt 3.8.2 und 3.8.5.3). Wie stark sich der iR -Fehler auswirkt, wird neben der Stromstärke und dem Elektrolytwiderstand durch die Position der einzelnen Elektroden bestimmt. Je näher eine Elektrode an der gemeinsamen Referenzelektrode sitzt, desto geringer fällt der Fehler aus.

4.1.4.2 Einbindung der impedimetrischen Messung

Potentiostatenschaltungen sind in der Lage, neben einer Gleichspannung auch eine sinusförmige Wechselspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode einzuprägen. Analog zur bereits beschriebenen amperometrischen Messung wandelt ein Transimpedanzverstärker den resultierenden Wechselstrom in eine Spannung. Aus der Anregungsspannung und dem gemessenen Stromfluss lässt sich die Impedanz zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode berechnen. Es muss beachtet werden, dass es sich hierbei um die für einen bestimmten Arbeitspunkt linearisierte Impedanz handelt.

Bei der in Abbildung 35 gezeigten Potentiostatenschaltung kann im einfachsten Fall die sinusförmige Anregungsspannung zur Eingangsspannung E_{in1} addiert werden. So lässt sich eine Wechselspannung zwischen der Referenz und der Arbeitselektrode einprägen, während E_{in2} konstant bleibt. Der Wechselspannungsanteil von E_{Amp} ist proportional zum Wechselstrom durch die Messzelle. Bei Systemen mit mehreren Sensoren ergibt sich dadurch ein Problem: Wie aus den vorherigen Abschnitten ersichtlich ist, bedeutet dies, dass die Spannungen aller Sensoren mit dieser sinusförmigen Spannung beaufschlagt werden. Diese zusätzliche Spannung kann mit analogen oder digitalen Tiefpassfiltern entfernt werden. Bei unzureichender analoger Filterung und niedrigen Abtastraten kann Aliasing auftreten und die Signalqualität vermindern. Zudem ist es mit dieser Methode nicht möglich, zwei verschiedene Elektroden mit

sinusförmigen Anregungsspannungen unterschiedlicher Frequenz oder Amplitude zu beaufschlagen.

Dieses Problem lässt sich umgehen, wenn die Wechselspannung, wie in Abbildung 36 gezeigt, am Transimpedanzverstärker eingepreßt wird. E_{in1} und E_{in2} bezeichnen in diesem Fall die Gleichspannungen, die an den nichtinvertierenden Eingängen der Operationsverstärker **OPV1** und **OPV2** angelegt wird. Über die Spannungsdifferenz zwischen E_{in1} und E_{in2} kann der Arbeitspunkt der Arbeitselektrode bezüglich der Referenzelektrode eingestellt werden. Die sinusförmige Anregungsspannung E_{sin} wird ebenfalls am nichtinvertierenden Eingang von **OPV2** angelegt. Analog zu Gleichung (4.3) ergibt sich die Ausgangsspannung E_{imp} des **OPV2** wie folgt:

$$E_{imp} = E_{imp}^{\sim} + E_{imp}^{-} = E_{in2}^{-} + E_{sin}^{\sim} - i_{sin}^{\sim} R_{Mess} - i_{DC}^{-} R_{Mess} \quad (4.4)$$

Die Indizes \sim und $-$ geben an, ob es sich um einen Gleich- oder Wechselanteil handelt. Der Strom durch die Arbeitselektrode setzt sich aus dem Wechselstromanteil i_{sin} und der Gleichstromkomponente i_{DC} zusammen. Um sicherzustellen, dass der Arbeitspunkt der Arbeitselektrode in einem Bereich liegt, in dem kein Gleichstrom durch die Elektrode fließt, kann der Gleichanteil von E_{imp} gemessen werden. Für den Fall, dass kein Gleichstrom fließt ($i_{DC} = 0$), gilt:

$$E_{imp}^{-} = E_{in2}^{-} \quad (4.5)$$

Ist diese Bedingung nicht erfüllt, kann der Arbeitspunkt verschoben werden, indem entweder E_{in1} oder E_{in2} variiert wird, bis die Bedingung aus Gleichung (4.5) erfüllt wird.

Für die Berechnung der linearisierten Impedanz Z_{lin} der Messzelle genügt der Wechselanteil der Spannungen aus Gleichung (4.4). Für die linearisierte Impedanz Z_{lin} gilt folgender Zusammenhang:

$$Z_{lin} = \frac{E_{sin}^{\sim}}{i_{sin}^{\sim}} \quad (4.6)$$

Entfernt man die Gleichspannungsanteile, ergibt sich durch das Einsetzen von Gleichung (4.4) in Gleichung (4.6) die linearisierte Impedanz Z_{lin} zu:

$$Z_{lin} = \frac{E_{sin}^{\sim} R_{Mess}}{E_{sin}^{\sim} - E_{imp}^{\sim}} \quad (4.7)$$

4.1 Theoretische Betrachtung der Wechselwirkung elektrochemischer Sensoren

Aus Gleichung (4.7) lässt sich erkennen, dass die Impedanz Z_{lin} gegen unendlich geht, wenn E_{sin} gleich E_{imp} ist, der Nenner somit 0 ist. Dies kann in der praktischen Umsetzung genutzt werden, um E_{sin} zu messen, indem die Schaltung ohne angeschlossene Messzelle betrieben ($Z_{lin} = \infty$) und E_{imp} gemessen wird. Der gemessene Wert von E_{sin} kann in den folgenden Messungen von E_{imp} abgezogen werden, um die Berechnung von Z_{lin} zu vereinfachen.

Bei der Umsetzung der Messschaltung muss beachtet werden, dass die oben angestellten Betrachtungen auf dem Modell eines idealen Operationsverstärkers beruhen. Ein realer OPV wird – insbesondere bei hohen Frequenzen oder kapazitiven Lasten – von diesem Verhalten abweichen. Es ist daher empfehlenswert, die Validität der getroffenen Annahmen nach Auswahl des realen Operationsverstärkers durch Simulation oder geeignete Messungen zu prüfen.

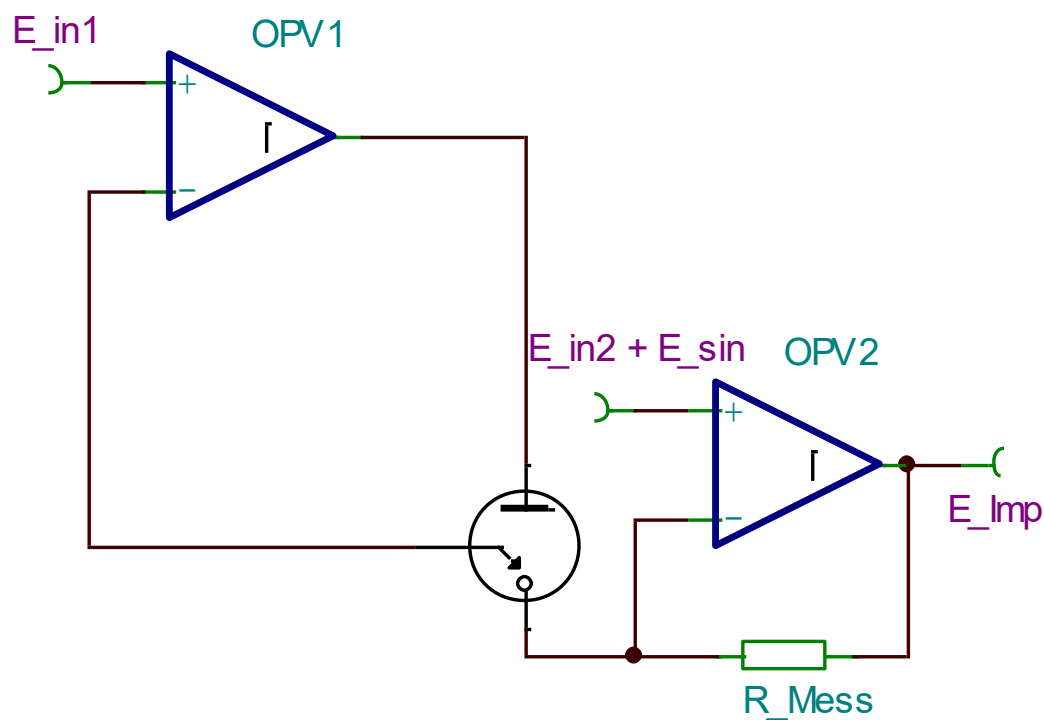


Abbildung 36: Die sinusförmige Polarisierung der Arbeitselektrode erfolgt bei dieser Schaltung über die Addition einer Sinusspannung am nichtinvertierenden Eingang des Transimpedanzverstärkers OPV2. Im Gegensatz zur üblichen Methode (Einprägen der Sinusspannung an OPV1) bleibt die Referenzelektrode gegenüber der Messschaltung auf einem konstanten Potential.

4.2 Problemanalyse

In den folgenden Abschnitten werden Probleme der bisher beschriebenen Messsysteme analysiert. Grundlage dieser Analyse sind die in Kapitel 3 beschriebene Literaturrecherche sowie die persönlichen Erfahrungen des Autors.

4.2.1 Messsystem

Die ersten wissenschaftlichen und kommerziellen Entwicklungen für Systeme zur Messung des zellulären Metabolismus basieren auf einzelnen Mikroreaktionskammern, die mit Schlauchsystemen versorgt werden. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das „Cytosensor Microphysiometer“ der Firma Molecular Devices (vgl. Abschnitt 3.5.2). Hohe Probendurchsätze sind mit solchen Systemen nur schwer zu erreichen. Der Reinigungsaufwand für wiederverwendbare Komponenten steigert zusätzlich den Aufwand pro Probe und kann zu Problemen, wie Kontamination, führen. Dem steht entgegen, dass ausreichend große Stichproben bei biologischen Versuchen essenziell sind. Steriles Arbeiten ist im Zellkulturbereich zwingend erforderlich, um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren.

Steve Chomicz, der Vizepräsident der Firma Seahorse Bioscience, macht aus diesen Gründen die Verwendung von Einzelkavitäten für das kommerzielle Scheitern des Cytosensors verantwortlich [235].

In der Tat haben sich – im kommerziellen Umfeld – Systeme schneller durchgesetzt, die Einwegartikel (disposables) im Mikrotiterplattenformat verwenden. Unternehmen wie Acea Biosciences und Seahorse Bioscience haben dies in den letzten zehn Jahren gezeigt [236–238]. Trotz der höheren Materialkosten überwiegen die Vorteile von Parallelisierung, Zuverlässigkeit und dem geringeren Vor- und Nachbereitungsaufwand.

4.2.1.1 Messprinzip

Für die Messung des zellulären Metabolismus bieten sich kalorimetrische, fotochemische und elektrochemische Messsystemen an. Kapitel 3.5 liefert eine Übersicht der wichtigsten Beispiele aus Wissenschaft und Industrie. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile, die im Folgenden betrachtet werden.

Die kalorimetrische Messung hat den Vorteil, dass keine Sensoren im Inneren der Messkammer benötigt werden, da der Wärmetransport durch das normale Zellkulturgefäß erfolgt. So wird eine mögliche Beeinträchtigung der Zellen durch einen inkompatiblen Sensor innerhalb des

4.2 Problemanalyse

Kultivierungsgefäßes systembedingt ausgeschlossen. Beim kalorimetrischen Sensor wird der Effekt der Gesamtheit an Stoffwechselprozessen gemessen. Es wird beispielsweise nicht zwischen anaerobem und aerobem Stoffwechsel unterschieden. Zudem muss die Temperatur des gesamten Zellkultivierungssystems sehr konstant gehalten werden. Die Zugabe von Wirkstoffen während des Versuches wird die Messung temporär stören, wenn es dadurch zu Temperaturschwankungen kommt. Somit unterliegt das System einer gewissen Trägheit und Reaktionen auf einen Stimulus werden nicht sofort erkannt.

Fotochemische Messsysteme bieten vor allem für multiparametrische Systeme einen Vorteil, da die Interferenz zwischen zwei Sensoren sehr intuitiv zu verstehen und leicht abzustellen ist, indem die optischen Pfade der Sensoren voneinander getrennt werden. Es gibt jedoch auch einige Nachteile bei dieser Art der Sensoren. So kann es zu Interferenzen kommen, wenn sich fluoreszierende Stoffe im Messmedium befinden, der optische Pfad zum Sensor verschmutzt wird oder seine Eigenschaften ändert. Damit das Messergebnis von der Konzentration des Analyten und nicht von der Konzentration des fotochemischen Farbstoffes abhängt, sind ratiometrische Messungen nötig. Dies erhöht die Komplexität des Messsystems und die Anforderungen an den Farbstoff selbst. Um die Beeinflussung der Probe durch den Farbstoff zu minimieren, werden die Farbstoffe in eine Kunststoffmatrix fixiert, die jedoch die Diffusion des Analyten zum Farbstoff hemmt, wodurch die Ansprechzeit des Sensors erhöht wird.

Elektrochemische Messsysteme für die Überwachung des zellulären Metabolismus bieten den Vorteil einer hohen Auflösung, haben kurze Ansprechzeiten und können bei korrekter Instrumentierung rauscharm ausgelesen werden. Ein Nachteil ist, dass die Sensoren elektrisch kontaktiert werden müssen. Elektrochemische Systeme sind generell anfällig für Querempfindlichkeiten auf redoxaktive Substanzen. Werden mehrere elektrochemische Sensoren gleichzeitig betrieben, kann es zu Interferenzen kommen. Einer der Hauptgründe für solche Interferenzen ist der iR -Fehler, der durch den Stromfluss bei amperometrischen Messungen verursacht wird. Eine andere Quelle für interferierenden Stromfluss durch den Elektrolyten sind Ausgleichsströme, die bei der Überbestimmung der Potentialdifferenz zwischen Messmedium und Bezugspotential der Messschaltung entstehen (vgl. Abschnitt 4.1.3).

4.2.1.2 Kontaktierung

Elektrochemische Sensoren sind auf eine elektrische Kontaktierung des Sensors angewiesen. Bei einem konventionellen Aufbau werden pro Sensor mindestens zwei Anschlüsse (Mess- und

Referenzelektrode sowie evtl. eine Gegenelektrode) benötigt. In diesem Fall sind bei einem 24-Kanal-Messsystem mit vier Sensoren pro Kanal mindestens 192 elektrische Kontakte nötig.

Bei potentiometrischen Sensoren, die hochohmig an die Messelektronik angeschlossen werden, begünstigen lange Sensorleitungen die Einkopplung von Störungen. Bis zum Eingangsverstärker müssen die Leitungen aus diesem Grund möglichst kurz gehalten werden.

Im TUM-Screen-System wurden PLCC68-Sockel zur Kontaktierung des Biochips eingesetzt [123]. Der Kontaktwiderstand zeigte eine schlechte Reproduzierbarkeit und der Sockel konnte bei einem Ausfall nur sehr umständlich getauscht werden [23]. Ausfälle des PLCC68-Sockels traten häufig auf, wenn Messmedium auf die Kontakte des Sockels gelangt ist.

Federkontaktstifte werden häufig für die Kontaktierung eingesetzt [21, 23], da sie einen guten Kontaktwiderstand haben, flexibel positioniert werden können und tolerant gegenüber Höhenunterschieden sind. Federkontakte haben in der Praxis jedoch einen Nachteil: Bei Kontakt mit Zellkulturmedium korrodiert die innere Mechanik, was innerhalb kurzer Zeit zu einem Totalausfall des Kontakts führt. Selbst vergoldete Federkontakte sind hiervon betroffen, da es durch die Art des Messaufbaus zur aggressiveren Elektrokorrosion kommen kann.

Eine andere bekannte Möglichkeit der Kontaktierung sind Zebrastreifen und Goldkontaktstreifen [17, 23]. Sie stellen jeweils in z-Richtung eine Verbindung zwischen zwei metallischen Flächen her, ohne in x-Richtung zu verbinden und wurden ursprünglich für die Kontaktierung von Displays verwendet. Sie haben weniger Toleranz gegenüber Höhenunterschieden und fallen bei Kontakt mit Zellkulturmedium korrosionsbedingt aus.

Aus den oben genannten Gründen müssen die Anzahl der benötigten Kontakte reduziert und die Robustheit der verwendeten Kontaktierung erhöht werden.

4.2.1.3 Größe und Komplexität des Messsystems

Multiparametrische elektrochemische Messungen stellen besondere Anforderungen an die Instrumentierung (vgl. Abschnitt 3.8.5). Dies schlägt sich in der Komplexität der benötigten Schaltungen nieder und somit auch auf den Platzbedarf für die Schaltungsrealisierung. Die Skalierung der bislang eingesetzten Schaltungen auf ein 24-fach- oder gar 96-fach-System sind aus diesem Grund nur schwierig umzusetzen. Da die Messsysteme üblicherweise in einem Brutschrank eingesetzt werden, ist das Platzangebot limitiert. Die räumliche Trennung zwischen Sensorik und Messelektronik, z. B. mittels eines langen Kabels, ist bei empfindlichen Messsystemen aus EMV-Gründen als Notlösung anzusehen.

4.2 Problemanalyse

Die optimale Größe für ein Messsystem liegt in der Größenordnung einer Mikrotiterplatte. So kann das Messsystem in zahlreiche bestehende Systeme für die automatisierte Beprobung von Mikrotiterplatten integriert werden.

Allgemein muss bei der Entwicklung des Messsystems auf ein einfaches und dennoch zielführendes Design geachtet werden. In der Regel erhöht sich dadurch auch die Robustheit, da Fehlerquellen in einem überschaubaren System leichter zu entdecken und zu beheben sind.

4.2.1.4 Messauflösung und Rauschen

Elektrochemische Sensoren haben potenziell ein hohes Auflösungsvermögen. Als Beispiel ist das sehr gute SNR des Cytosensors (vgl. 3.5.2.1) zu nennen. Bei multiparametrischen Systemen erhöht sich die Komplexität der Schaltung und es können neue Probleme durch Sensorinterferenzen entstehen. Der Einsatz von DC/DC-Wandlern für die galvanische Trennung einzelner Sensorgruppen und der Digitalteil der Messelektronik sind weitere Quelle für Störungen. Sie können das Messsignal überlagern, wenn keine geeigneten Maßnahmen auf Schaltungs- oder Leiterplattenebene ergriffen werden. Der gesamte Signalweg, angefangen beim Sensor bis hin zum AD-Wandler, muss hierbei berücksichtigt werden.

Die Messauflösung kann durch geeignete Auswahl der elektrischen Komponenten bis in den Mikrovoltbereich verbessert werden. Sinnvoll ist dies nur, wenn alle Störquellen so gut wie möglich eliminiert werden. Aus diesem Grund müssen die in Kapitel 4.1 beschriebenen Betrachtungen für den Schaltungsentwurf herangezogen werden, um sowohl den elektrochemischen Konzepten als auch der EMV-Lehre gerecht zu werden.

4.2.1.5 Energieversorgung und Wärmeabgabe

Biologische Proben reagieren auf ihre Umgebungstemperatur. Vor allem Säugetierzellen tolerieren nur einen sehr schmalen Temperaturbereich.

Messsysteme, die einen hohen elektrischen Leistungsbedarf haben, geben dementsprechend viel Wärme ab. Dies kann wiederum die zu untersuchende Zellkultur schädigen. Der TUM-Screen wurde aus diesem Grund so konzipiert, dass die wärmeproduzierende Elektronik nicht in direkter Nähe zum Sensorchip und der Zellkulturkammer platziert wurde. Trotz dieser Bemühungen kam es zu übermäßiger Erwärmung der Proben, da die Abwärme über die Leiterplatte zum Sensorchip geleitet wird.

Heutzutage sind zahlreiche integrierte Schaltungen verfügbar, die eine geringe Leistungsaufnahme haben. Durch die gezielte Auswahl solcher Komponenten wird die

Selbsterwärmung der Messelektronik auf ein akzeptables Maß reduziert. Gleichzeitig wird es dadurch möglich, auf ein externes Netzteil zu verzichten und die Schaltung beispielsweise über USB (Universal Serial Bus) zu versorgen. Somit kann ein einziges Kabel für Datenübertragung und Energieversorgung genutzt werden.

4.2.2 Sensorik

Elektrochemische Sensoren können nur dann in eine Zellkulturplatte integriert werden, wenn sie ausreichend gut miniaturisierbar sind und mit vertretbarem Aufwand hergestellt werden können. Einstabmessketten, wie die Glaselektrode, die in der elektrochemischen Analytik eingesetzt werden, sind aus diesen Gründen nicht geeignet. Zielführender sind planare Sensoren, die in den Boden der Mikrotiterplatte integriert werden können.

Solche Sensoren, die sich für den Einsatz in sensorischen Zellkulturplatten eignen, sind aktuell Gegenstand der Forschung. Die spezifischen Probleme dieser Sensoren werden in den nachfolgenden Abschnitten analysiert.

4.2.2.1 Clark-Elektrode als Sauerstoffsensoren

Das Messprinzip des Sauerstoffsensors nach Clark ist gut beschrieben und die Sensorelektroden lassen sich gut miniaturisieren. Bei direkter Messung in proteinhaltigen Lösungen, wie Blut oder Zellkulturmedium, tritt jedoch Sensitivitätsverlust auf, wenn der Sensor ohne Membran verwendet wird. Die Miniaturisierung von Membran und Zwischenelektrolyt ist komplexer, wurde aber in der Literatur bereits beschrieben [184].

Die Empfindlichkeit des Sauerstoffsensors ist von der Geometrie der Arbeitselektrode abhängig. Vor allem bei stark miniaturisierten Elektroden erweist es sich als schwierig, die Größentoleranz der hergestellten Elektroden klein zu halten. Dies schlägt sich in höheren Schwankungen der absoluten Genauigkeit der hergestellten Sensoren nieder. Diese Schwankungen werden üblicherweise durch Kalibrieren der Sensoren kompensiert.

Um einen zuverlässigen Sauerstoffsensoren herzustellen, ist die Isolation der Zuleitung bis zum Sensor von großer Bedeutung. Falls die Isolation während der Messung versagt, agiert der freigelegte Teil der Zuleitung ebenfalls als Sauerstoffsensoren. Hierdurch verändert sich die aktive Fläche des Sensors oft um ein Vielfaches und eine reproduzierbare Messung wird unmöglich.

4.2 Problemanalyse

Besteht die Zuleitung zum Sensor aus einem reaktionsfreudigen Material, wird dieser Effekt verstärkt. Gleichzeitig kommt es zu einer Elektrokorrosion der Leiterbahn, was üblicherweise nach gewisser Zeit zum Totalausfall des Sensors führt.

4.2.2.2 Iridiumoxid als pH-Elektrode

Eine pH-Elektrode für die Messung zellulärer Ansäuerungsraten hat folgende vier Kriterien zu erfüllen:

1. Schnelles und definiertes Ansprechverhalten, da auch der zelluläre Metabolismus transientes Verhalten zeigen kann.
2. Stabile Empfindlichkeit, da die Änderung der Empfindlichkeit der Messelektrode technisch nicht von einer Abnahme der zellulären Aktivität zu unterscheiden ist.
3. Stabiles Potential bzw. geringe Drift, da driftbedingte Änderungen des Elektrodenpotentials nicht von einer pH-Änderung des Messmediums unterschieden werden können.
4. Gute Miniaturisierbarkeit, um die Integration der Elektrode in die Zellkulturkammer zu ermöglichen.

Abschnitt 3.6.1.1 stellt potenzielle Kandidaten für eine solche Elektrode vor. Im Hinblick auf günstige Herstellungsmethoden sind vor allem leitfähige Polymere und galvanisch abgeschiedenes Iridiumoxid relevant.

Leitfähige Polymere können in ihren pH-sensitiven Eigenschaften den Metalloxiden als ebenbürtig angesehen werden. Für den praktischen Einsatz müssen die potentialbildenden Mechanismen, der Einfluss der Dotierung und die Biokompatibilität der jeweiligen Polymere weiter erforscht werden. Viele der in der Literatur beschriebenen Polymere werden durch Elektropolymerisation hergestellt. Hierdurch relativiert sich der Vorteil eines einfachen Fertigungsprozesses der Polymere gegenüber der galvanischen Abscheidung des Iridiumoxids.

In Abschnitt 3.6.1 wurde die Verwendung von Iridiumoxid als pH-sensitive Elektrode beschrieben. Trotz der zahlreichen positiven Eigenschaften dieses Metalloxids wird deutlich, dass die Herstellungsmethode einen großen Einfluss auf das Verhalten dieser Elektrode hat. Bei galvanischer Abscheidung des Iridiumoxids zeigen die Elektroden oft unterschiedliche Standardpotentiale [166], auch wenn die Herstellungsbedingungen konstant gehalten werden [105, 172]. Toleranzen im Bereich 80-90 mV wurden berichtet [172], was einem Fehler von einer pH-Einheit entspricht.

Problematisch sind auch die pH-Wert-unabhängigen Schwankungen (bzw. Drift) des Elektrodenpotentials. Frisch hergestellte Iridiumoxidsensoren zeigen nach der Herstellung eine starke Drift, die sich über einige Stunden bis zu einem Tag erstrecken kann. Danach folgt eine Phase mit wesentlich geringerer Drift. Als mögliche Ursachen dieser Drift wird die weitere Hydrierung bzw. Hydroxylierung tieferliegender Iridiumoxidschichten [154] sowie die Interaktion mit redoxaktiven Stoffen wie Sauerstoff [167] oder Wasserstoffperoxid [166] vorgeschlagen. Stoffe mit starker oxidierender oder reduzierender Wirkung können zudem die pH-Empfindlichkeit stark reduzieren und die pH-Messung beeinträchtigen bis gar unmöglich machen [144, 172, 175].

Es ist möglich, dass die Drift vom pH-Wert der Lagerlösung abhängt. Die Messdaten einiger Publikationen weisen darauf hin, dass es vor allem bei sehr hohen pH-Werten größer 10 und bei sehr niedrigen pH-Werten kleiner 3 zu erhöhter Drift kommt [151, 171, 174].

Das Ansprechverhalten hingegen wird durch die elektrische Kapazität der Elektrode und über die Schichtdicke des Iridiumoxids beeinflusst. Eine ausreichend dicke Iridiumoxidschicht wird als Voraussetzung für ein stabiles Elektrodenverhalten genannt. Eine zu dicke Schicht führt zu einem trägen Ansprechen der Elektrode [173].

Hieraus ergibt sich eine Liste von Einflussfaktoren, welche die Messung mit Iridiumoxidelektroden beeinflussen können:

1. Herstellungsmethode
2. Parameterwahl bei der Herstellung
3. Lagerungsbedingungen (z. B. Lagerung an Luft oder in einem wässrigen Medium)
4. Zusammensetzung des Messmediums (vor allem in Bezug auf redoxaktive Stoffe)
5. Instrumentierung (zu geringe Eingangsimpedanz der Messelektronik)

Die galvanische Abscheidung von Iridiumoxid bietet eine kostengünstige Alternative zur Dünnschichttechnologie. In der Literatur wurden bereits galvanische Abscheidungsmethoden beschrieben, die gut haftende Schichten auf verschiedenen Substraten wie Iridium, Titan, Gold, und Platin aufgebracht haben. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das Potential des Substrates während der Abscheidung geregelt werden muss. Diese Regelung erfolgt über die gesamte Dauer des Abscheidvorgangs, die je nach Methode und gewünschter Schichtdicke etwa zehn Minuten beträgt. Für eine Mehrkanalsensorik mit 24 oder 48 Iridiumoxidelektroden ist diese Abscheidungsmethode sehr zeitintensiv, da jede Elektrode einzeln behandelt wird.

4.2 Problemanalyse

4.2.2.3 Referenzelektrode

Sowohl für die Sauerstoff- als auch für die pH-Messung wird ein stabiles Referenzpotential benötigt. Hierfür muss eine Referenzelektrode eingesetzt werden, die gut zu miniaturisieren und für den jeweiligen Einsatzzweck geeignet ist.

Die Silber/Silberchlorid-Elektrode liefert in Lösungen mit definierter Chloridionenkonzentration ein stabiles Potential. Sie eignet sich damit potenziell für den Einsatz im Zellkulturmedium und ist leicht zu miniaturisieren.

Es besteht jedoch ein wesentliches Problem bei dieser Referenzelektrode: Silberchlorid ist ein schwer lösliches Salz. In Lösungen, deren Silberionenkonzentration gegen null geht, werden dennoch Silberionen der Elektrode in Lösung gehen. In biologischen Medien reagieren sie zu mikroskopisch kleinen Silberchloridpartikeln, die durch einen Proteinhülle in Dispersion gehalten werden [239].

Dies führt zu einem langsamen Abbau der Silberchloridschicht, die die Langzeitstabilität der Elektrode verringert. Hinzu kommt die zytotoxische Wirkung des Silberchlorids [239], die den Einsatz von Silberchlorid in unmittelbarer Nähe der Zellen problematisch macht.

Eine biokompatible Alternative für eine Referenzelektrode stellt Iridiumoxid dar, das bei kurzen Messzeiträumen ein sehr stabiles Potential hat, bei Langzeitmessungen führt die bereits angesprochene Drift zu Fehlern. Iridiumoxid kann nur in Medien mit konstantem pH-Wert als Referenzelektrode eingesetzt werden, weshalb ein direkter Einsatz als Referenzelektrode bei der pH-Messung nicht möglich ist.

4.2.3 Sensorintegration

Der Einsatz von elektrochemischen Sensoren ist stets mit der Herausforderung verknüpft, zwei sehr unterschiedliche Bereiche elektrisch miteinander zu verbinden. Der Sensorbereich ist kontinuierlich von einem wässrigen Elektrolyten umgeben, der in diesem Fall ein korrosiv wirkendes Zellkulturmedium ist. Der Bereich der Messelektronik hingegen ist darauf angewiesen, im Trockenen betrieben zu werden. Bereits die Bildung von Kondenswasser kann unerwünschte Leckströme verursachen, die bei empfindlichen elektrochemischen Messungen zu signifikanten Messfehlern führen.

Um dieses Problem zu verstehen und bei der Sensorintegration effektiv zu umgehen, muss verstanden werden, welche Auswirkungen die Feuchtigkeit auf die einzelnen Komponenten des Messsystems hat.

Die beteiligten Komponenten wurden bereits in Kapitel 3.7 vorgestellt. Sensorelektroden und Zuleitungen befinden sich innerhalb der Zellkulturkammer, wobei die Zuleitungen mit einer Isolationsschicht vor dem Kontakt mit dem Messmedium geschützt werden. Löst sich diese Isolationsschicht durch schlechte Haftung von den Zuleitungen, ist dieser Schutz nicht mehr gewährleistet. Ebenfalls ist es möglich, dass die Isolation durch langfristigen Kontakt mit dem Messmedium aufquillt und so ihre isolierenden Eigenschaften zum Teil verliert.

Außerhalb der Zellkulturkammer werden die Sensorzuleitungen mit einem guten elektrischen Leiter, meist Kupfer, bis zu den Kontakten der Messelektronik weitergeführt. Kupfer ist ein reaktionsfreudiges Material. Es reagiert beim Kontakt mit dem Messmedium elektrochemisch, wodurch das Sensorsignal überlagert wird. Deswegen müssen Kleb- und Vergussstoffe eingesetzt werden, um die Zellkulturkammer abzudichten. Diese dichtenden Klebeverbindungen dürfen sich bei langfristigem Kontakt mit dem Messmedium nicht lösen. Scherkräfte, die auf die Zellkulturkammer wirken, können die Dichtigkeit der Klebeverbindung gefährden. Dies muss berücksichtigt werden, falls die sensorbestückte Zellkulturkammer zur Kontaktierung mechanisch eingespannt wird. Es sei darauf hingewiesen, dass sich der Kleber im Bereich der Sensorzuleitungen nicht mit dem Sensorsubstrat verbindet, sondern mit der oben genannten Isolationsschicht. Eine ausreichend gute Haftung der Isolation ist in diesen Fällen eine Grundvoraussetzung für die Abdichtung der Zellkulturkammer.

Bei der Verklebung von Zellkulturkammer und Sensorsubstrat muss der Kleber in der richtigen Menge am richtigen Ort aufgebracht werden. Wird zu wenig Kleber verwendet, kann das zu Leckstellen führen und Medium tritt aus der Zellkammer aus, wodurch es an den Sensorzuleitungen zu Kurzschlüssen sowie unerwünschten elektrochemischen Reaktionen des Kupfers kommt. Luftblasen im Kleber können solche Leckagen ebenfalls verursachen. Wird zu viel Kleber aufgebracht, besteht die Gefahr, dass der Überschuss die Elektroden am Rand der Zellkulturkammer überdeckt und so zum Ausfall der entsprechenden Sensoren führt. Kleber kann bei Überdosierung oder falscher Aufbringung in den Zu- oder Ablauf des Dreikammersystems gelangen und damit den Austausch von Medium in der Zellkulturkammer verhindern. Nach Aufbringen des Klebers muss das Sensorsubstrat exakt an die vorgesehene Endposition gebracht werden. Ein nachträgliches Verschieben des Substrates verschmiert den Kleber und kann zu den oben genannten Fehlern führen.

4.2.4 Mikrofluidik

Bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate einer Zellkultur wird das Kulturmedium regelmäßig ausgetauscht. Hierzu können Schlauchsysteme mit Pumpen verwendet werden. Alternativ werden speziell ausgeprägte Zellkulturplatten mit mehreren untereinander verbundenen Kammern eingesetzt. In letzterem Fall ist es möglich, das Medium mit einem Pipettierroboter zu wechseln.

Schlauchsysteme bieten eine gewisse Flexibilität: Beispielsweise können sie eingesetzt werden, um verschiedene Zellkulturkammern in Reihe zu schalten. Sind das Schlauchsystem, die Zellkulturkammer und das Vorratsgefäß verschlossen, kann das Eindringen von Keimen in das System verhindert werden. Hierdurch kann das System in einer unsterilen Umgebung betrieben werden, wenn die Befüllung und die Vorbereitungen steril erfolgt sind und das System über geeignete Sterilfilter belüftet wird.

Gleichzeitig haben Schlauchsysteme mehrere Nachteile: Zum einen muss der Experimentator jeden Sensorchip einzeln an das Schlauchsystem anschließen, was zeitaufwändig ist und Angriffsfläche für Anwenderfehler bietet. Zum anderen müssen die Schläuche nach dem Experiment gereinigt oder sogar getauscht werden, was zeit- und kostenintensiv ist. Ein weiterer Nachteil der Schlauchsysteme ist die begünstigte Entstehung von Luftblasen an den Kanten und Verbindungsstücken. Erreicht eine Luftblase eine gewisse Größe, kann sie sich lösen und zum Sensorchip gespült werden. Große Luftblasen können dort entweder die Zellen schädigen oder die elektrochemischen Sensoren beeinträchtigen, wenn eine oder mehrere Elektroden abgedeckt werden.

Die Integration der Mikrofluidik in eine Zellkulturplatte hat für den Anwender in der Praxis eine Reihe von Vorteilen. Wenn die Platte als Einwegartikel ausgelegt und steril geliefert wird, ist weder eine Sterilisation noch eine Reinigung zwischen den Experimenten nötig. Dies spart Arbeitszeit und minimiert das Kontaminationsrisiko. Die Vorbereitung der Experimente kann schneller und routinierter durchgeführt werden, da Mikrotiterplatten ein Standardverbrauchsmittel im Zellkulturlabor sind. In vielen Laboren gibt es spezielle Hilfsmittel wie Mehrkanalpipetten oder automatisierbare Liquid-Handling-Stationen, die Mikrotiterplatten befüllen können. Die parallele Verarbeitung mehrerer Proben ist wichtig, um den Durchsatz des Systems zu erhöhen und den Anforderungen moderner Labore gerecht zu werden.

Zellkulturplatten, die mit einem Pipettierroboter befüllt werden, sind weniger anfällig für die Bildung von Luftblasen, wenn die Zuläufe richtig dimensioniert und die Pipettierparameter

sorgfältig ausgewählt werden. Zudem muss die Kammer, in die das Medium eingefüllt wird, ausreichend groß sein und der Pipettierroboter sollte das Medium nahe an der Oberfläche hinzugeben. Hierdurch schwimmen die Luftblasen, die sich in der Pipettenspitze befinden, auf und werden nicht in die Zellkulturkammer gespült.

Generell lassen sich Probleme mit Luftblasen verhindern, indem die Oberfläche der Innenwände der Mikrofluidik hydrophil gestaltet wird. Zudem sollte das Zellkulturmedium mindestens 24 Stunden vor dem Experiment auf die Temperatur des Brutschranks gebracht werden, um eine kontrollierte Entgasung zu ermöglichen. In Problemfällen können Luftblasenfallen in Schlauchsysteme oder Mikrofluidikkanäle eingebaut werden, um Luftblasen abzufangen, bevor sie die Zellkulturkammer erreichen.

Je nachdem, wie die Mikrofluidik ausgelegt ist, kann es vorkommen, dass das Zellkulturmedium überläuft, an undichten Stellen austritt oder von der Pipettenspitze heruntertropft. Wie bereits erwähnt, ist das verwendete Medium durch den hohen Salzgehalt als korrosiv einzustufen. Bei Kontakt zwischen Messmedium und elektronischen Komponenten, wie Steckverbindungen, Bauteilen und Durchkontaktierungen auf der Leiterplatte, kommt es zu Korrosion. Bei spannungsführenden Bauteilen wird der Effekt durch Elektrokorrosion zusätzlich beschleunigt. Die Auswirkungen einer derartigen Korrosion können vielfältig sein und reichen von erhöhtem Stromverbrauch der Messelektronik über die schleichende Störung einzelner Messwerte bis zum Totalausfall der Messvorrichtung.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Ausgehend von den in Kapitel 2 genannten Zielen wurde in dieser Arbeit ein System entwickelt, mit dem zellulärer Sauerstoffverbrauch, extrazelluläre Ansäuerungsrate und Bewachungsgrad des Kulturbodens in 24 parallelen Zellkulturkammern gemessen werden kann. Die folgenden Abschnitte beschreiben im Detail sowohl das Gesamtsystem als auch die entwickelten Teilmodule.

4.3.1 Gesamtkonzept

Eine Explosionsdarstellung des Mikrophysiometers wird in Abbildung 37 gezeigt. Das System besteht aus einer Mikrotiterplatte (1), die mit dem Sensorsubstrat (2) verbunden werden kann, das den Boden der Zellkulturkammer bildet. Unterhalb dieser Platte befindet sich die Messelektronik (3).

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

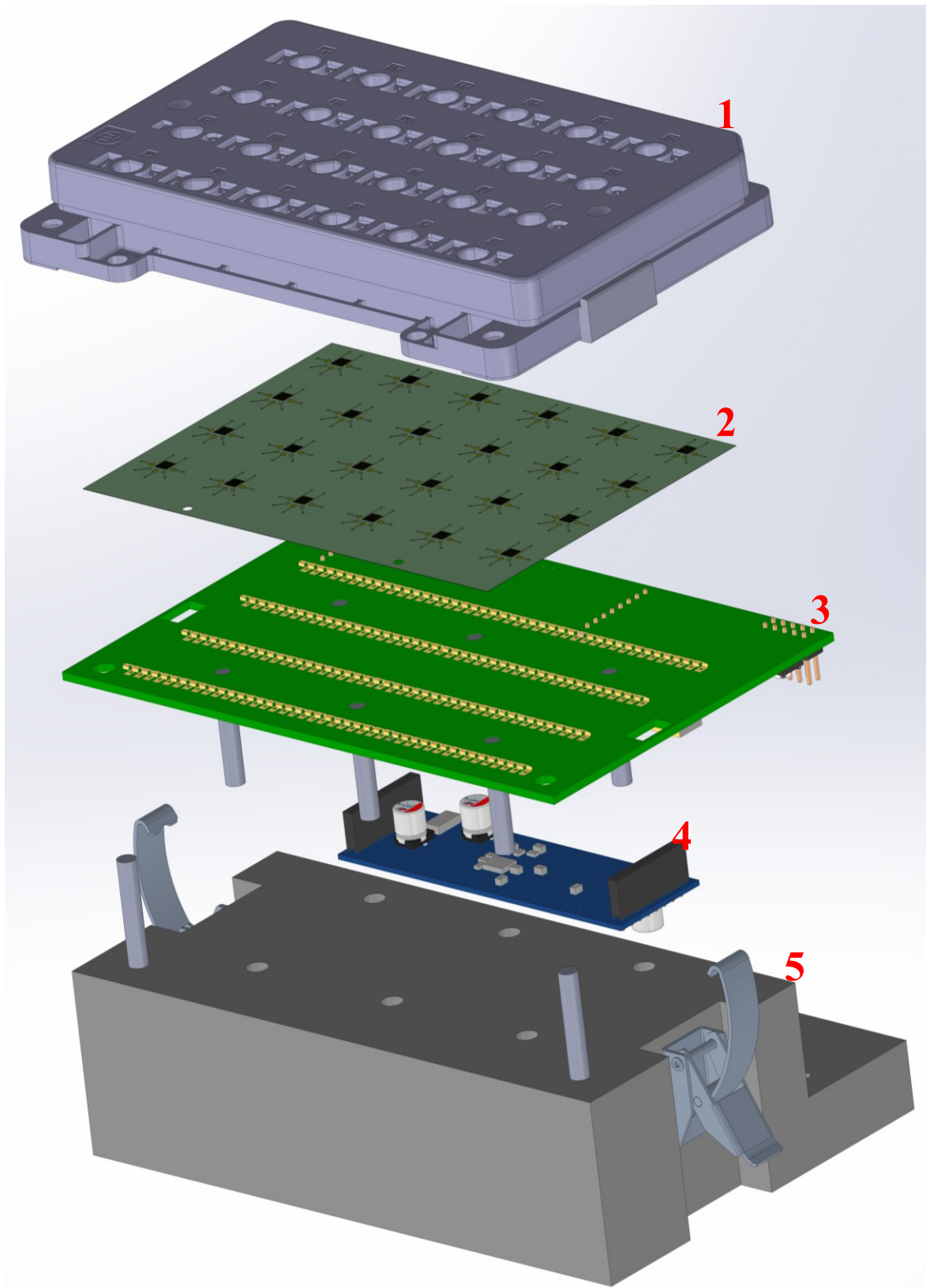


Abbildung 37: Die Explosionsdarstellung des Mikrophysiometers zeigt folgende Komponenten: 1. Mikrotiterplatte mit Zellkulturkammern und Durchflusssystem; 2. Sensoren auf einem Substrat; 3. Messelektronik mit Federkontakten; 4. Elektronikmodul für ECIS; 5. Spannvorrichtung zur Verbindung von Sensorik (2) und Messelektronik (3).

Die Sensoren können auf diese Weise mit sehr kurzen Zuleitungen an die Elektronik angebunden werden. Dadurch wird die Einkopplung von Störungen wesentlich reduziert. Die für ECIS benötigte Elektronik befindet sich auf einer separaten Leiterplatte (4) und kann mittels Steckverbindern an das Hauptmodul angeschlossen werden. Eine speziell entwickelte Spannvorrichtung (5) sorgt dafür, dass alle 144 Sensorleitungen zuverlässig kontaktiert werden können.

Die Entwicklung der verwendeten Mikrotiterplatte (1) samt Mikrofluidik ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Sie wurde aus vorangegangenen Arbeiten [69, 109] übernommen. Durch das auf dieser Platte integrierte Drei-Kammer-System können Zellen kontinuierlich mittels Pipetten versorgt werden. Eine Beurteilung der Mikrofluidik wurde von Pfister [24] durchgeführt.

Alle übrigen Komponenten wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Die folgenden Abschnitte gehen im Detail auf die einzelnen Teilsysteme ein und liefern Lösungsstrategien für die in Kapitel 4.2 dargelegten Probleme.

4.3.2 Messelektronik

Bei der Entwicklung der Messelektronik wurde das Ziel verfolgt, möglichst wenige Komponenten einzusetzen und dennoch ein SNR zu erhalten, das bisherige Systeme übertrifft. Gleichzeitig sollte der Stromverbrauch der Schaltung minimal sein. Aus diesem Grund wurde die Schaltung mittels moderner integrierter Schaltungen realisiert.

Die Gesamtschaltung lässt sich in drei Teile gliedern:

1. Das **analoge Front-End (AFE)** basiert auf mehreren Operationsverstärkern und steht in direkter Verbindung mit den Messelektroden. Die Schaltungen sind individuell auf die Sensoren abgestimmt und haben jeweils ein Spannungssignal als Ausgang.
2. Im **Mixed-Signal-Teil** der Schaltung werden die vom AFE ausgegebenen analogen Spannungen, mit Multiplexern selektiert und analog zu digital gewandelt.
3. Der **Digital-Teil** regelt die Kommunikation zwischen den Komponenten der Mixed-Signal-Schaltung und einem Computer.

Die einzelnen Schaltungsteile werden über separate Spannungsregler versorgt, um die analoge von der digitalen Versorgungsspannung zu entkoppeln.

Abbildung 38 bietet einen Überblick über den schematischen Aufbau der Messschaltung. Die Elektroden der Sensoren werden mit 24 parallel aufgebauten analogen Front-Ends verbunden.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

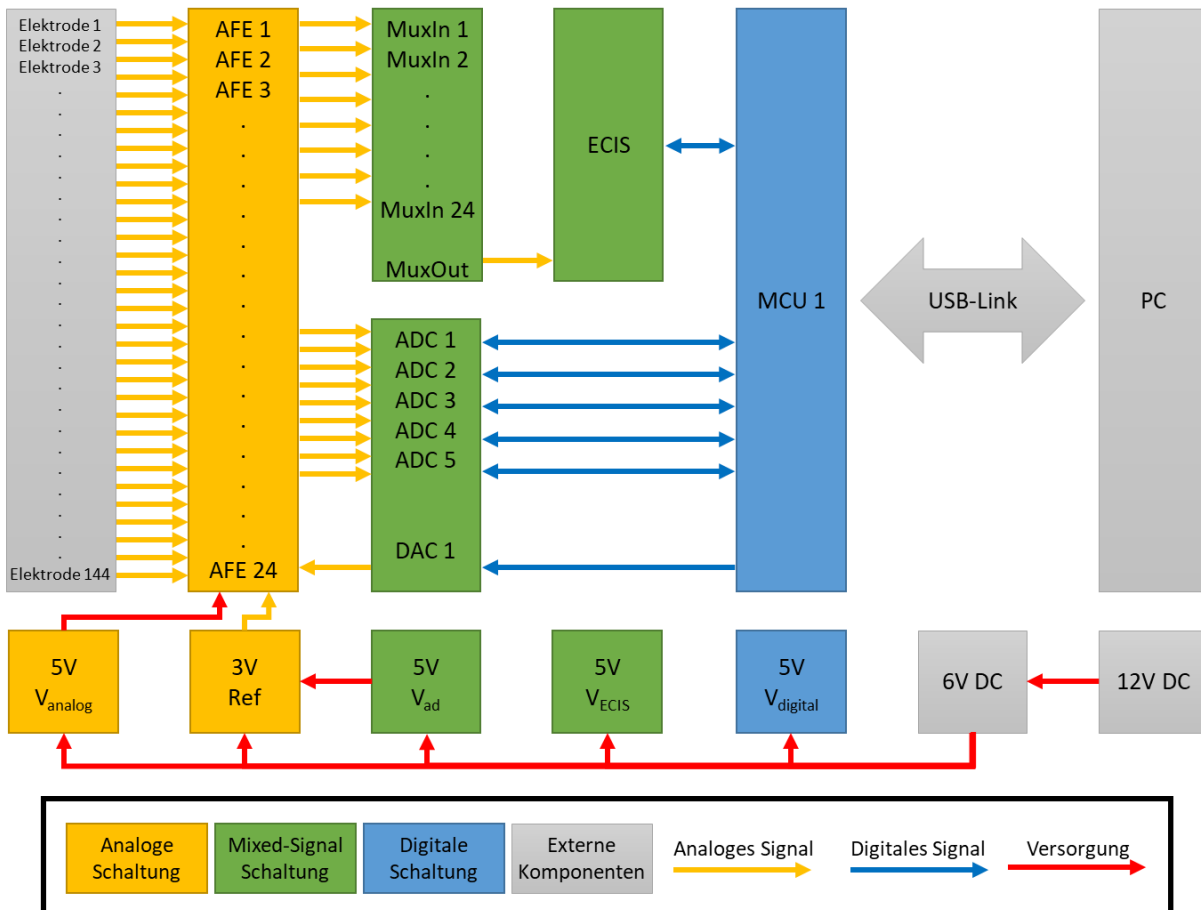


Abbildung 38: Die Messelektronik lässt sich schematisch in einen analogen, einen digitalen und einen Mixed-Signal-Teil untergliedern. Jeder Schaltungsteil besitzt eine eigene Spannungsversorgung sowie eigene Referenzspannungsquellen. Alle Elektroden der eMTP werden direkt an das analoge Front-End angebunden. Im Mixed-Signal-Teil werden die analogen Signale gemultiplext und in digitale Signale gewandelt. Das digitalisierte Signal wird von einem Mikrocontroller (MCU) empfangen, verrechnet und per USB-Schnittstelle an einen Computer übertragen.

Da die Ausgangsimpedanz der Sensoren als hoch angenommen werden muss, wurden lange Leitungen zwischen Sensorelektrode und AFE vermieden. Jedes Ausgangssignal der AFE wurde mit einem von fünf parallel geschalteten AD-Wandlern verbunden, um die Gesamtabtastrate zu erhöhen und zusätzliche Multiplexer-Kaskaden zu vermeiden. Eine Ausnahme bildet die ECIS-Messung, bei der sich AFE und Mixed-Signal-Teil auf einer externen Leiterkarte befinden. Lediglich der vorgeschaltete Multiplexer befindet sich auf dem Hauptmodul. Die digitalisierten Signale werden von einem Mikrocontroller verarbeitet und per USB-Schnittstelle an einen Computer übertragen. In digitaler Form können die Messdaten störungsunempfindlich über größere Distanzen übermittelt werden. Beim Entwurf des Platinenlayouts wurde darauf geachtet, die Einkopplung von digitalen Signalen in die analogen Signalpfade zu verhindern.

4.3.2.1 Analoges Front-End

Das analoge Front-End basiert auf der in Abschnitt 4.1.4 diskutierten und in Abbildung 35 gezeigten Schaltung. Als 4-facher Operationsverstärker wurde ein OPA4376 von Texas Instruments verwendet. Dieser Baustein wurde aufgrund des sehr geringen Eingangsstroms (Input Bias Current) sowie der geringen Eingangsdifferenzspannung (Input Offset Voltage) ausgewählt. Der Verstärker ist unity gain stable und kann in dieser Konfiguration kapazitive Lasten von bis zu 250 pF betreiben, ohne dass zusätzliche Kompensation notwendig ist. Ein weiteres entscheidendes Kriterium ist das ausreichend hohe GBP (Gain–Bandwidth Product) von 5,5 MHz. Dieses ist nötig, um die Integration der Impedanzmessung zu ermöglichen. Es reicht nicht aus, den Operationsverstärker an der Impedanzmeselektrode mit einem hohen GBP zu dimensionieren. Auch der Verstärker der Potentialregelschleife (**OPV1** bzw. **U1**) muss in der Lage sein, die nötigen Gegenströme an der Gegenelektrode ausreichend schnell bereitzustellen.

Ein realer Operationsverstärker kann von dem idealen Verhalten des Nullator-Norator Modells abweichen. Aus diesem Grund muss das dynamische Verhalten des Operationsverstärkers bei der Schaltungsauslegung berücksichtigt werden. Kapazitive Lasten im Rückkopplungszweig können die Phasenreserve des Operationsverstärkers verringern und zu Oszillation führen.

Aus Abschnitt 3.8.4.1 ist bekannt, dass Elektroden nach dem Randles-Modell eine kapazitive Komponente besitzen. Wird dieses Wissen auf die Schaltung in Abbildung 35 angewandt, wird deutlich, dass **OPV1** und **OPV4** an ihrem invertierenden Eingang jeweils eine kapazitive Last besitzen. Die Last ist jedoch nicht rein kapazitiv, da durch den Widerstand des Elektrolyten ein Widerstand in Reihe geschaltet wird, was der Stabilität zugutekommt. Die Kapazität ist stark von der Geometrie und Beschaffenheit der Elektrode abhängig. Die Elektrode und der Elektrolyt können ihre elektrischen Eigenschaften während eines Versuchs ändern, so dass es nötig wird, bei den Stabilitätsbetrachtungen der Schaltung ausreichende Reserven vorzusehen.

Im Schaltungsentwurf wurden zwei Kompensationskondensatoren **C1** und **C2** eingeführt. Abbildung 39 zeigt die resultierende Schaltung. Die Kapazität **C2** ist nicht zwingend erforderlich, da die kapazitiven Anteile von Referenz- und Gegenelektrode ausreichen können. Diese Kapazität wurde dennoch vorgesehen, um bei Instabilität der Schaltungen diesen entgegenwirken zu können. **C1** wird für eine stabile Schaltung benötigt, insbesondere dann, wenn hohe Rückkopplungswiderstände (R_{Mess}) eingesetzt werden.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

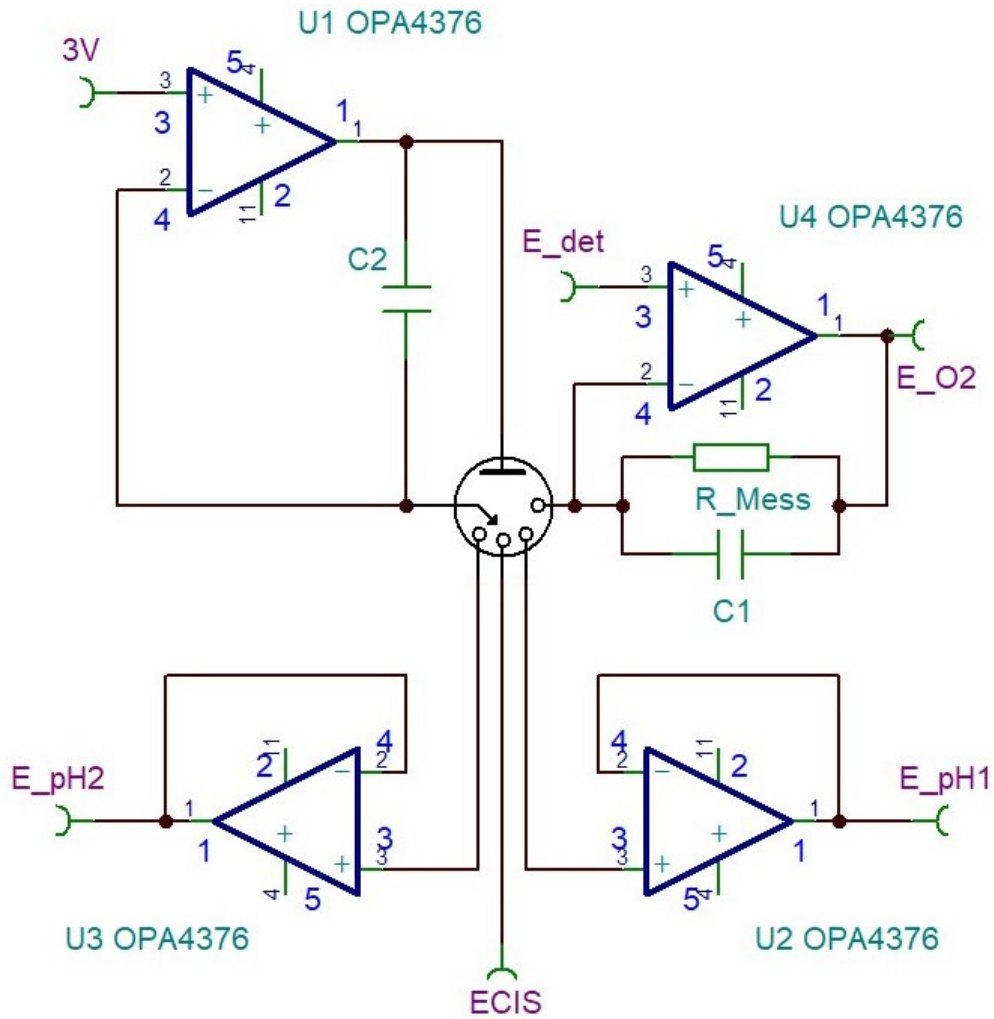


Abbildung 39: Das analoge Front-End der Messschaltung basiert auf der in Abbildung 35 gezeigten Potentiostatenschaltung. Die Kondensatoren C1 und C2 dienen der Kompensation des kapazitiven Charakters der elektrochemischen Messzelle und verhindern eine Instabilität der Operationsverstärkerschaltung.

Bauteil	Parameter
U1, U2, U3, U4	OPA4376
C1	2,5 nF
C2	Nicht verwendet
R _{Mess}	1 MΩ

Tabelle 4-1: Bauteilparameter für das analoge Front-End der pH- und Sauerstoff-Messung

Für die ECIS-Messung wurde ein analoges Front-End verwendet, das auf der in Abschnitt 4.1.4.1 beschriebenen Schaltung beruht. Die Umsetzung der Schaltung wird in Abbildung 40 gezeigt. E_{sin} wird im Mixed-Signal-Teil der Schaltung erzeugt und setzt sich aus einem sinusförmigen AC-Signal von 198 mV_{pp} mit einem DC-Offset von 173 mV zusammen.

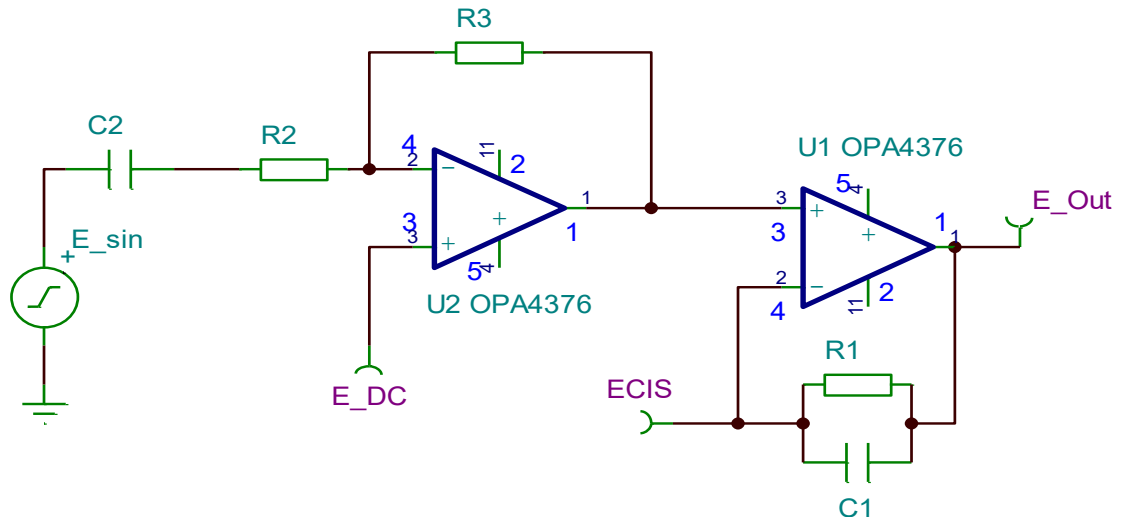


Abbildung 40: Das analoge Front-End für die ECIS-Messung basiert auf einem Transimpedanzverstärker (U_1), an dessen nichtinvertierendem Eingang eine sinusförmige Spannung eingepreßt wird. Die Kapazität C_1 verbessert die Stabilität der Schaltung bei hohen kapazitiven Lasten am invertierenden Eingang. Der restliche Schaltungsteil (U_2 , C_2 , R_2 , R_3) dient dazu, die sinusförmige Anregungsspannung (E_{sin}) auf ein nicht zellschädigendes Niveau zu dämpfen und um einen Offset (E_{DC}) zu verschieben. Der Offset wird so gewählt, dass kein DC-Strom durch die ECIS-Elektrode fließt.

Bauteil	Parameter
U1, U2	OPA4376
C1	32 pF
C2	1 μ F
R1, R2	20 k Ω
R3	2 k Ω

Tabelle 4-2: Bauteilparameter für das analoge Front-End der ECIS-Messung

Um zellschädigende Effekte auszuschließen, wurde das AC-Signal durch einen invertierenden Verstärker um das Zehnfache reduziert. Allgemein gilt für solche invertierende Verstärker mit einem Verstärkungsfaktors von $A < 1$, dass sie stabil sind, wenn der verwendete

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Operationsverstärker bei $|A|=1$ stabil ist. **C2** blockiert als Hochpassfilter den ursprünglichen DC-Offset des Signals. Der DC-Offset des abgeschwächten Signals lässt sich über den Spannungseingang E_{DC} einstellen.

Der folgende Teil der Schaltung basiert auf einem Transimpedanzverstärker. Die Messelektrode wurde mit dem invertierenden Eingang des Operationsverstärkers verbunden. **C1** wurde zur Kompensation der kapazitiven Eigenschaft der Messelektrode verwendet.

E_{Out} setzt sich aus dem gewandelten DC- und AC-Stromfluss durch die Messelektrode zusammen. E_{DC} kann dadurch so geregelt werden, dass es dem DC-Anteil von E_{Out} entspricht. In diesem Fall ist der DC-Anteil des Stromes durch die Elektrode gleich null.

4.3.2.2 Simulation des analogen Front-Ends

Um die Stabilität der entwickelten Schaltung zu bewerten, wurden Simulationen mit SPICE durchgeführt. Hierzu wurde die Software TINA-TI von Texas Instruments verwendet.

Bei den Simulationen wurden weder die pH-Elektroden noch die angeschlossenen Spannungsfolger berücksichtigt. Die pH-Elektroden sind weder Teil des Regelkreises der beiden Spannungsfolger noch Teil des Regelkreises der Potentiostatenschaltung, da sie hochohmig am nichtinvertierenden Eingang der Spannungsfolger angeschlossen sind. Der Einfluss der pH-Messschaltung auf die Stabilität der Potentiostatenschaltung ist deswegen vernachlässigbar.

Für die übrigen Elektroden der Messzelle wurde ein Ersatzschaltbild erstellt. Als Basis diente das in Abschnitt 3.8.4.1 vorgestellte Randles-Modell. Da bei der Stabilitätsbetrachtung insbesondere höhere Frequenzen ab 1 kHz relevant sind, wurde die Warburg-Impedanz ignoriert und das Randles-Modell so auf seine rein kapazitiven und resistiven Elemente vereinfacht. Dies ist zulässig, da die Warburg-Impedanz Diffusionsprozesse beschreibt und diese lediglich bei niedrigen Frequenzen zur Impedanz beitragen.

Für die Parametrisierung des Ersatzschaltbildes wurde die Impedanz der einzelnen Elektroden mittels elektrochemischer Impedanzspektroskopie gemessen. Hierfür wurde ein Potentiostat vom Typ Vertex der Firma Ivium Technologies verwendet. Als (Quasi-)Referenzelektrode diente eine Goldelektrode mit einer großen Oberfläche von 5 mm². Anschließend wurden die Parameter des vereinfachten Randles-Modells mittels Anpassung bestimmt. Dies erfolgte mit der Software Ivium Equivalent Circuit Evaluator. Berücksichtigt wurden hierbei der Frequenzbereich von 0,2 kHz bis 100 kHz.

Das analoge Front-End für die Sauerstoffmessung und für die ECIS-Messung wurde separat betrachtet. Abbildung 41 zeigt das zur Simulation verwendete Ersatzschaltbild der Messzelle.

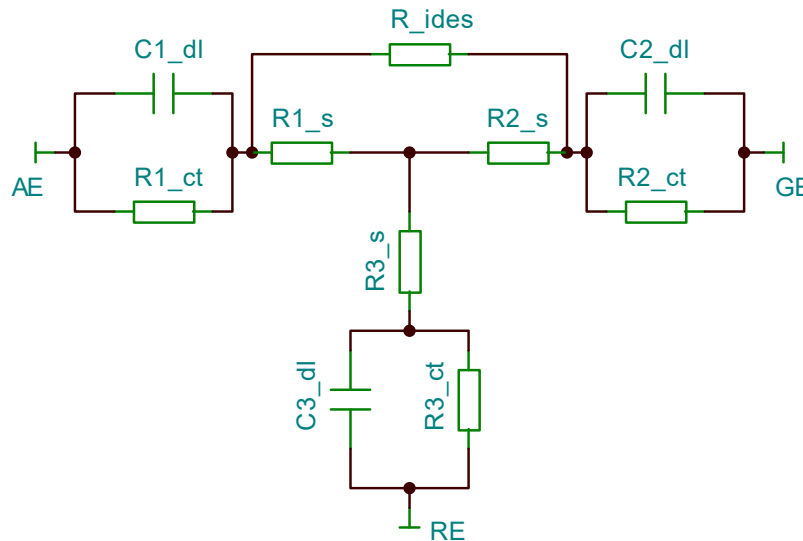


Abbildung 41: Die gezeigte Schaltung stellt ein Modell der eingesetzten elektrochemischen Messzellen dar. Das Modell basiert auf der Randles-Schaltung (vgl. Abschnitt 3.8.4.1), die durch das Weglassen der Warburg-Impedanz vereinfacht wurde. Die Schaltung ist sowohl zur Simulation der Sauerstoff- als auch der ECIS-Messschaltung geeignet, wenn die Bauteilparameter entsprechend Tabelle 4-3 angepasst werden. Die Verbindung zur jeweiligen Messschaltung erfolgt an den drei Anschlussstellen AE (Arbeits-Elektrode), GE (Gegenelektrode) und RE (Referenzelektrode).

Der Abstand zwischen den einzelnen Elektroden wurde bei der Modellbildung nicht berücksichtigt, da die Elektrodengeometrie die Widerstandswerte **R1_s**, **R2_s** und **R3_s** dominiert. Einzige Ausnahme hiervon waren die Fingerelektroden, die für die ECIS-Messung verwendet wurden. Der Abstand zwischen ihnen ist so gering, dass er durch den zusätzlichen Widerstand **R_ides** modelliert werden musste. Tabelle 4-3 gibt die Bauteilparameter der verwendeten Modelle wieder. Da bei der Sauerstoff- und der ECIS-Messung unterschiedliche Arbeitselektroden zum Einsatz kommen, unterscheiden sich die Parameterwerte dieser Elektroden.

Bauteil	Wert (Sauerstoffmessung)	Wert (ECIS-Messung)
R1_s	2,33 kΩ	184 Ω
R2_s	184 Ω	184 Ω
R3_s	454 Ω	454 Ω
R1_ct	486 kΩ	5,52 kΩ
R2_ct	6,42 kΩ	6,42 kΩ
R3_ct	11 kΩ	11 kΩ
C1_dl	5,74 nF	5,74 nF
C2_dl	423 nF	423 nF
C3_dl	219 nF	424 nF
R_ides	∞ Ω	26 Ω

Tabelle 4-3: Bauteilparameter für das Modell der Messzelle

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Zur Bewertung der Stabilität der Sauerstoffmessschaltung wurde eine indirekte Methode für die Bestimmung der Phasenreserve gewählt, bei der das Überschwingen der Sprungantwort betrachtet wird. Die für die Simulation der Sauerstoffmessung verwendete Messschaltung wird in Abbildung 42 dargestellt. Im Zuge der Simulation wurde eine Sprungfunktion in Höhe von 10 mV am Eingang des Operationsverstärkers U4 mittels des Signalgenerators VG1 angelegt. Die Sprungantworten wurden jeweils an den Messpunkten E_GE und E_O2 betrachtet.

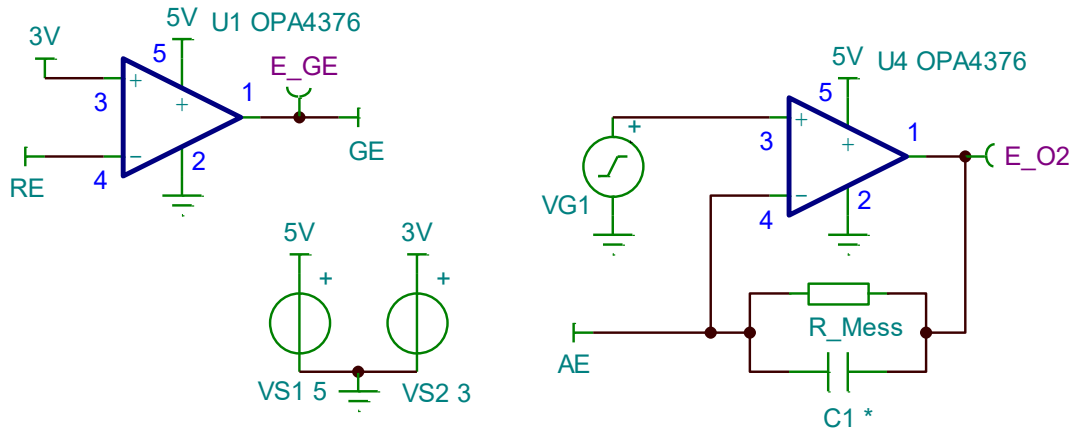


Abbildung 42: Die zur Simulation der Sauerstoffmessung verwendete Schaltung wurde auf Basis der in Abbildung 39 gezeigten Messschaltung erstellt. Das Schaltungsmodell der elektrochemischen Messzelle (siehe Abbildung 42) wird an den entsprechenden drei Anschlussstellen AE, GE und RE mit der Schaltung verbunden. Die Bewertung der Stabilität der Schaltung erfolgt, indem eine Sprungfunktion durch den Generator VG1 erzeugt und die Sprungantwort an den Messstellen E_GE und E_O2 gemessen wird.

Abbildung 43 stellt die simulierte Sprungantwort am Messpunkt E_O2 ohne externe Frequenzkompensation dar (ohne C1). Die gedämpfte Schwingung ist ein Indiz dafür, dass das Übertragungsverhalten als System zweiter oder höherer Ordnung betrachtet werden muss. Die Schwingung deutet zudem auf eine zu geringe Phasenreserve hin.

Zur Vereinfachung wurde die Schaltung als System zweiter Ordnung betrachtet. Das Ziel der Simulation war es, die Kompensationskapazität so zu wählen, dass das Überschwingen knapp unter 10 % liegt. Für diesen Wert ergibt sich unter den getroffenen Annahmen eine ausreichend hohe Phasenreserve von annähernd 60°. Der in Abbildung 44 gezeigte Graph stellt die simulierten Sprungantworten in Abhängigkeit der Kompensationskapazität C1 gegenüber. Die Kompensationskapazität C1 wurde dabei zwischen 1 nF und 2,5 nF variiert. Für die ausgewählte Kapazität C1 = 2,5 nF beträgt das Überschwingen in guter Näherung 7,5 %. An der Messstelle E_GE wurde kein Überschwingen beobachtet. Aus diesem Grund konnte auf eine externe Kompensation des Operationsverstärkers U1 verzichtet werden.

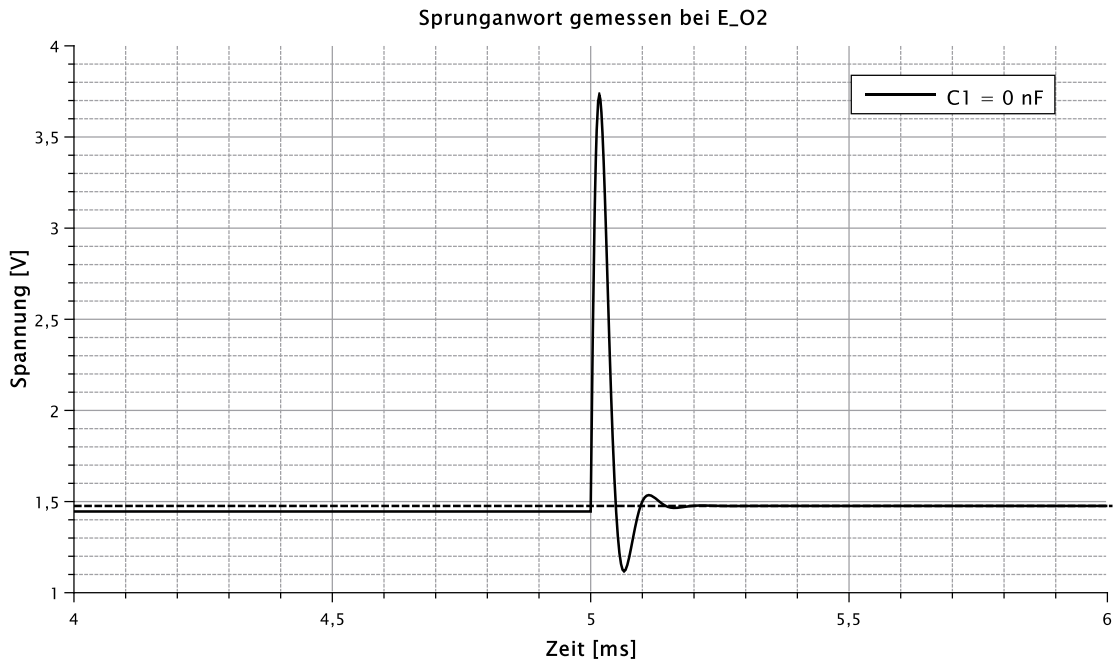


Abbildung 43: Befindet sich keine Kapazität zur Frequenzkompensation im Rückkopplungspfad des Transimpedanzverstärkers U4 (Abbildung 42), zeigt die Sprunganwort – gemessen an der Messstelle E_O2 – eine gedämpfte Oszillation.

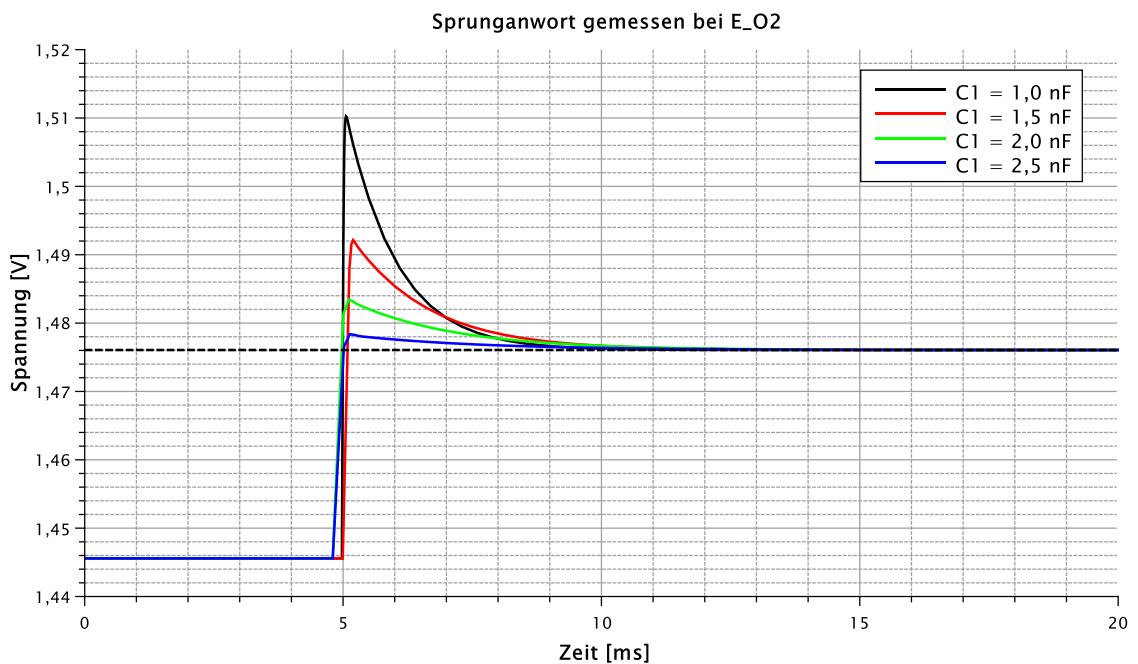


Abbildung 44: Der Graph zeigt eine Gegenüberstellung der Sprunganworten (Messstelle E_O2) für unterschiedliche externe Kapazitäten zur Frequenzkompensation. Durch die geeignete Parametrisierung kann das Überschwingen auf einen akzeptablen Wert (< 10 %) reduziert werden.

Die Analyse der in Abbildung 40 gezeigten ECIS-Messschaltung wurde analog zum oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Sprungfunktion wurde in diesem Fall am nichtinvertierenden Eingang von U2 angelegt.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

4.3.2.3 Mixed-Signal-Schaltung

Im Mixed-Signal-Teil der Schaltung kommen fünf baugleiche AD-Wandler, ein DA-Wandler, ein 32-Kanal-Multiplexer sowie ein integrierter Netzwerkanalysator zum Einsatz.

Die AD-Wandler wurden verwendet, um die analogen Signale der beiden pH-Sensoren und des Sauerstoffsensors zu digitalisieren. Bei den Wandlern handelt es sich um Sigma-Delta-Wandler des Typs AD7194 (Analog Devices). Zwischen analogem Front-End und AD-Wandler wurde ein Aliasing-Filter eingefügt. Durch die hohe Überabtastung des Signals durch den Sigma-Delta-Wandler ist ein einfacher RC-Filter zu diesem Zweck ausreichend. Die Dimensionierung des Filters erfolgte nach Vorgabe des Herstellers.

Jeder AD-Wandler verfügt über 16 Eingänge, die mit dem integrierten Multiplexer ausgewählt werden. Die Wandler besitzen zudem jeweils einen programmierbaren Differenzverstärker. Diese Verstärker wurden so beschalten, dass die Offset-Potentiale bereits vor der Wandlung abgezogen werden. Im Falle der pH-Messungen entspricht das dem Abzug des Referenzelektrodenpotentials (3 V) von der Spannung der Messelektrode (siehe Gleichung (4.1) in Abschnitt 4.1.4). Bei der Sauerstoff-Messung wurde die Messspannung E_{O_2} von der Polarisationsspannung E_{det} der Messelektrode subtrahiert, um das Produkt aus Messstrom und Messwiderstand ($I_{Amp} \cdot R_{Mess}$, siehe Gleichung (4.3)) zu erhalten.

Zur Generation der Polarisationsspannung E_{det} für die Sauerstoffmessung wurde ein AD5664 DA-Wandler der Firma Analog Devices genutzt. Dieser Wandler hat insgesamt vier Kanäle. Einer der übrigen Kanäle wurde zur Einstellung von E_{DC} im Zusammenhang mit der Impedanzmessung verwendet. Ein weiterer Kanal diente zur individuellen Verschiebung des Potentials der Referenzelektrode bezüglich der Schaltungsmasse. Die nötige Referenzspannung von 3 V wurde durch einen ADR423 von Analog Devices bereitgestellt.

Bei der Auswahl des Multiplexers für die Impedanzmessung wurde auf einen geringen Durchgangswiderstand im geschalteten Zustand geachtet. Der ausgewählte Multiplexer ist vom Typ ADG732 (Analog Devices). Er hat einen Durchgangswiderstand von maximal $6\ \Omega$ im aktiven Kanal und eine maximale Abweichung von $0,8\ \Omega$ zwischen den einzelnen Kanälen.

Als Netzwerkanalysator wurde ein AD5933 von Analog Devices verwendet. Die Genauigkeit der Messung konnte mit einer variablen Taktfrequenz verbessert werden. Der hierzu verwendete Taktgenerator wurde von Hefele et al. [240] übernommen. Der AD5933 liefert E_{sin} als Eingangssignal für das Front-End der ECIS-Messung und nimmt das Ausgangssignal E_{out} auf.

4.3.2.4 Digitale Schaltung

Der digitale Teil der Schaltung besteht im Wesentlichen aus dem Mikrocontroller sowie seiner Beschaltung. Als Mikrocontroller kam ein ATmega32U4 der Firma Microchip zum Einsatz. Die Beschaltung erfolgte nach Herstellervorgaben. Für die Kommunikation zwischen Messsystem und Computer wurde das auf dem Mikrocontroller integrierte USB-Interface verwendet.

4.3.2.5 Spannungsversorgung

Die Spannungsversorgung erfolgte über vier baugleiche Linearregler des Typs ADP3303 der Firma Analog Devices und betrug für alle genannten Schaltungsteile 5V. Diese Spannung wurde gewählt, um ein möglichst großes Spannungsfenster für die Messung und die Einstellung von Elektrodenpotentialen zur Verfügung zu stellen. Gleichzeitig ist hiermit die Kompatibilität zur Versorgung über USB gegeben.

In der vorliegenden Messschaltung wurde jedem Schaltungsteil (AFE, ECIS, Mixed-Signal, digital) eine eigene Spannungsquelle zugewiesen, um die Versorgungsspannungen der einzelnen Teile auf einfache Weise zu entkoppeln.

4.3.2.6 Leiterplattenentwurf

Der Entwurf der Leiterplatten samt Platzierung der Bauelemente wurde EMV-gerecht durchgeführt. Methoden und theoretische Grundlagen finden sich hierfür in der einschlägigen Literatur [241].

Die Platine konnte mit einem vierlagigen Leiterplattenaufbau realisiert werden: Eine Lage wurde als vollflächige Masse verwendet. Digitale und analoge Masse zu trennen, wurde bewusst vermieden. Eine weitere Lage wurde für die Verteilung der vier Versorgungsspannungen eingesetzt. Die übrigen zwei Lagen führen die Signal- und Referenzspannungen sowie zusätzliche Masseflächen.

Digitale Leitungen wurden nicht parallel zu analogen Leitungen verlegt, um eine kapazitive Einkopplung in analoge Signalfade zu verhindern. Zudem wurden auch die Gegenströme (Return Current Paths) der digitalen Signale berücksichtigt, um eine saubere Masse als Spannungsbezugspunkt für den Analog- und den Mixed-Signal-Teil der Schaltung zu schaffen. Abbildung 45 zeigt die bestückte Platine des Hauptmoduls.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

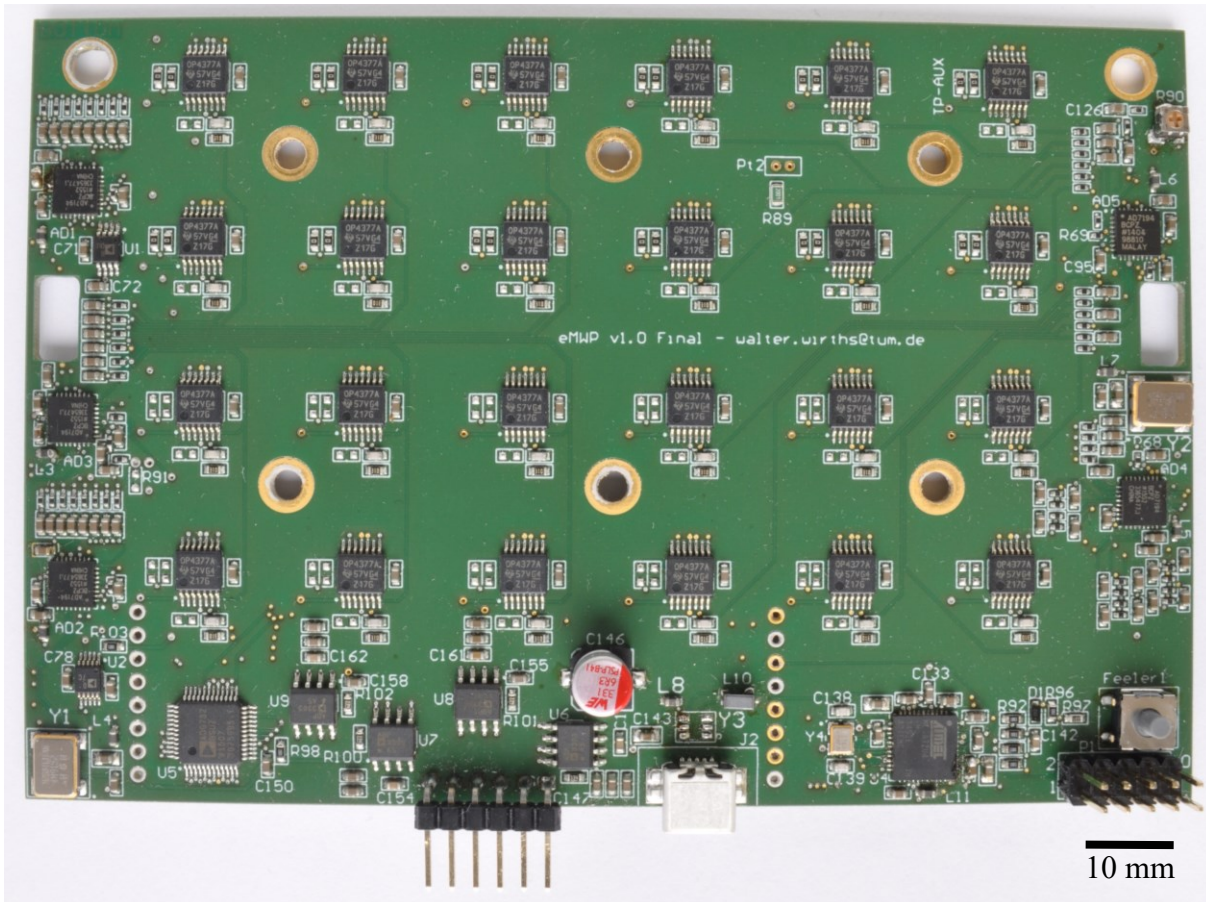


Abbildung 45: Das fertig bestückte Hauptmodul der Messelektronik besteht aus 24 analogen Front-Ends (Mitte), fünf AD-Wandlern (rechts und links), dem Digitalteil mit Mikrocontroller (rechts unten) sowie vier Spannungsreglern (unten Mitte) zur Spannungsversorgung der Module. Das Impedanzmodul kann mittels einer Stiftleiste aufgelötet werden. Der Multiplexer für die ECIS-Elektroden ist auf dem Hauptmodul integriert (links unten neben den Spannungsreglern).

4.3.3 Soft- und Firmware

Die Firmware des Mikrocontrollers ist für die Konfiguration und das Auslesen der AD- und DA-Wandler verantwortlich. Sie steuert zudem die Datenübertragung per USB. Die entwickelte Software sorgt auf Seite des Computers dafür, dass die Daten empfangen, visualisiert und analysiert werden können. Abbildung 46 liefert einen Überblick über die gesamte Software-Architektur des Projekts.

Die Firmware für den Mikrocontroller (MCU) wurde mit einer geeigneten Entwicklungsumgebung (Atmel Studio 7) erstellt. Mittels des integrierten Bootloaders wurde das Aufspielen der Firmware über die USB-Schnittstelle ermöglicht. Hierzu wurde die standardisierte USB-DFU Klasse sowie das frei verfügbare Programm „dfu-programmer“ verwendet.

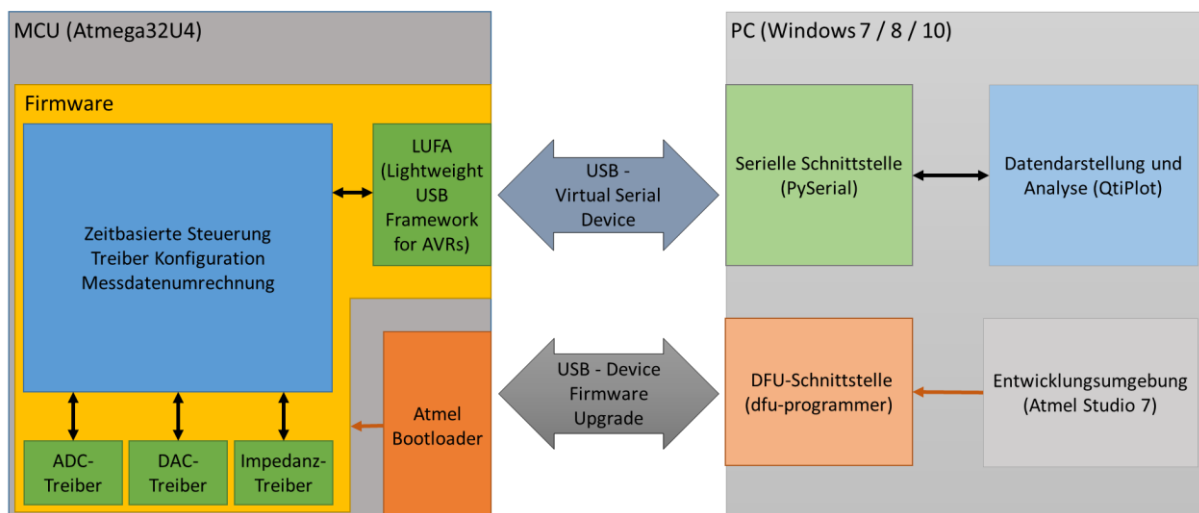


Abbildung 46: Die Software-Architektur veranschaulicht, wie die digitalisierten Messdaten durch die Firmware ausgelesen und über eine virtuelle serielle Schnittstelle an das Programm QtiPlot übertragen werden. Durch die Verwendung des serienmäßig integrierten Bootloaders des Mikrocontrollers kann die Firmware direkt über die USB-Schnittstelle aktualisiert werden.

Für die Ansteuerung der verwendeten integrierten Schaltungen wurden Treiber entwickelt und in die Firmware eingefügt. Die Treiber für den AD-Wandler (AD7194, Analog Devices) [242] sowie den Netzwerkanalysator (AD5933, Analog Devices) [240] wurden aus Vorarbeiten übernommen und modifiziert, sofern erforderlich. Bei der Konfiguration der AD-Wandler wurde darauf geachtet, die Ausgangsdatenrate zugunsten einer starken Dämpfung des digitalen Filters bei 50 Hz zu reduzieren. Die detaillierte Konfiguration aller Komponenten ist im Quellcode der Firmware dokumentiert.

Der Programmablauf wurde eigens für die eMTP entwickelt. Mittels einer zeitgesteuerten Abfrage der Rohdaten wurde sichergestellt, dass die Abtastung zu äquidistanten Zeitpunkten erfolgt. Die Umrechnung der Rohdaten in Spannungs-, Strom- oder Impedanzwerte wurde ebenfalls in der Firmware umgesetzt.

Die integrierte USB-Schnittstelle des Mikrocontrollers wurde zur Übertragung der Messdaten an den Computer verwendet. Die Umsetzung der Datenverbindung erfolgte über das „Lightweight USB Framework for AVR“ (LUFA), das für nichtkommerzielle Projekte kostenfrei verfügbar ist. LUFA implementiert eine virtuelle serielle Schnittstelle. Dadurch kann das Gerät mit Treibern verwendet werden, die bereits in den gängigsten Betriebssystemen (z. B. Linux, MacOS, Windows) integriert sind.

Zur Datendarstellung wurde das Programm „QtiPlot“ verwendet. Es bietet die Vorteile, dass es zahlreiche Funktionen zur Analyse, Darstellung und Auswertung von Messdaten bereitstellt

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

sowie die Ausführung von Python-Scripts unterstützt. Durch die Verwendung von Python konnten die Steuerung der Firmware und der Datentransfer direkt in QtPlot integriert werden. Hierfür wurde ein entsprechendes Python-Plugin erstellt. Für die Kommunikation mit der seriellen Schnittstelle wurde das kostenlose Python-Modul „pySerial“ verwendet.

4.3.4 Sensorsubstrat und Metallisierung

Bei der Herstellung von eMTP wurden zwei verschiedene Substrate verwendet. Im Folgenden werden die beiden Substratarten als Glas- und als Foliensubstrat bezeichnet. Neben dem unterschiedlichen Substratmaterial unterscheiden sich die beiden Varianten auch im Aufbau der Metallisierung und bei der Isolationsschicht.

Die erste Variante wurde komplett am Lehrstuhl für medizinische Elektronik gefertigt. Hierzu wurden Glaswafer verwendet, die nach mehreren Reinigungsschritten in Dünnschichttechnik mit Platin beschichtet wurden. Die Isolationsschicht wurde mit einem fotostrukturierbaren Lack (SU8-3000 der Firma MicroChem) realisiert. Die Wafer wurden anschließend so zugeschnitten, dass die Sensoren für drei Zellkulturkammern auf einem gemeinsamen Substrat sitzen. Abbildung 47 zeigt den fertig prozessierten und zugeschnittenen Wafer.

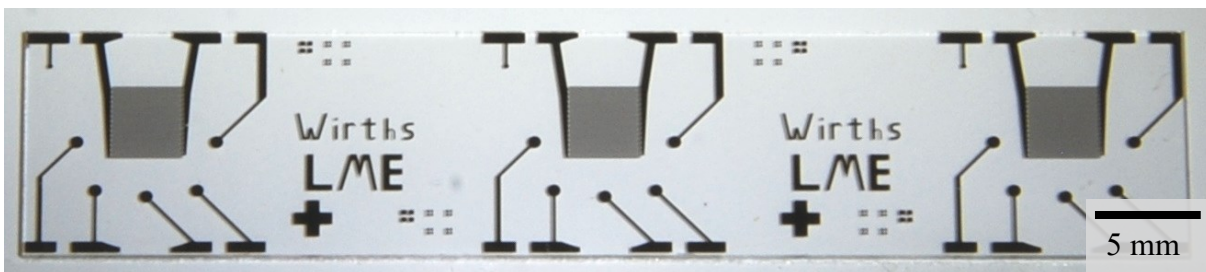


Abbildung 47: Nach dem Zuschnitt des Wafers verbleiben jeweils drei Sensorarrays auf demselben Glassubstrat. Die Platinstrukturen sind deutlich zu erkennen, der darüber liegende SU-8 3000 Lack ist aufgrund seiner Transparenz nicht sichtbar.

Kapitel 4: Entwicklung des Mikrotiterplatten-basierten Mikrophysiometers

Im Detail wurden folgende Prozessschritte durchgeführt:

- Reinigung der Glaswafer in 5 % Deconex-Lösung (Borer Chemie AG), danach jeweils zwei Mal in Methylpyrrolidon, Aceton und Propanol
- Spülen mit destilliertem Wasser und Trockenblasen der Wafer
- Anmischen von Peroxomonoschwefelsäure (Wasserstoffperoxid 25 % und Schwefelsäure 97 % im Verhältnis 1:2)
- Reinigung der Wafer in Peroxomonoschwefelsäure für 10 Minuten
- Spülen mit destilliertem Wasser und Trockenblasen der Wafer
- Trocknen der Wafer für eine Stunde bei 160° C
- Fotostrukturieren der Wafer für Lift-off-Prozess
- Aufspütern von 5-10 nm Titan als Haftvermittler, dann 180-200 nm Platin
- Lift-off in Aceton
- Trocknen der Wafer für eine Stunde bei 160° C
- Aufbringung der Isolationsschicht; Fotostrukturierung des Lacks SU8-3005 (Firma MicroChem) erfolgte nach Herstellervorgaben, mit Ausnahme der Geschwindigkeit beim Spin-Coating, die auf 1500 Umdrehungen pro Minute verringert wurde
- Aushärtung der Isolationsschicht bei 160° C für zwei Stunden (Hardbake)
- Schneiden der Wafer mit einer Wafersäge

Die zweite Variante wurde bei der Firma Dyconex beauftragt. Es handelt sich dabei um einen hybriden Aufbau aus Dünnschicht- und Leiterplattentechnologie. Da der exakte Fertigungsprozess bei Dyconex liegt, kann der Prozess an dieser Stelle nur skizziert werden. Die verwendeten Materialien und Parameter sind jedoch bekannt.

Als Substrat wurde LCP R-F705T (Panasonic) verwendet. Alle Zuleitungen, die nicht im Bereich der Zellkulturkammer liegen, wurden als Kupferleiterbahnen auf der Ober- und Unterseite des Substrats gefertigt. Wie in der Leiterplattenfertigung üblich, wurden die zusammengehörigen Zuleitungen mittels Durchkontaktierungen miteinander verbunden. Auf der Rückseite wurden zusätzliche Kontaktflächen gefertigt, die der elektrischen Kontaktierung der Sensoren dienen. Anschließend wurde das Kupfer mit einem stromlosen Prozess (Reduktiv Palladium Immersion Gold (EPIG)) vergoldet. Die Schichtdicke des Goldes wurde mit einer galvanischen Abscheidung auf 3 bis 5 μm erhöht. Nach diesen Schritten wurde mittels Dünnschichttechnologie im Bereich der Zellkulturkammer sowie dem darum liegenden Übergangsbereich Gold abgeschieden. Die Schichtdicke des so aufgebrauchten Goldes betrug 0,3 bis 0,5 μm . Durch das spezielle Fertigungsverfahren wurde der Bereich der

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Zellkulturkammer mit reinem Gold und frei von unedlen Metallen wie Nickel und Kupfer beschichtet. Als Isolationsschicht wurde für diese Variante der Lötstopplack NPR-80 von Nippon Polytech verwendet. Die Strukturierung erfolgte fotolithografisch. Das Foliensubstrat wurde im letzten Prozessschritt mittels eines Lasers so ausgeschnitten, dass sich sämtliche 24 Sensorarrays auf einer Folie befanden. Abbildung 48 zeigt einen Ausschnitt der fertig produzierten Folie.

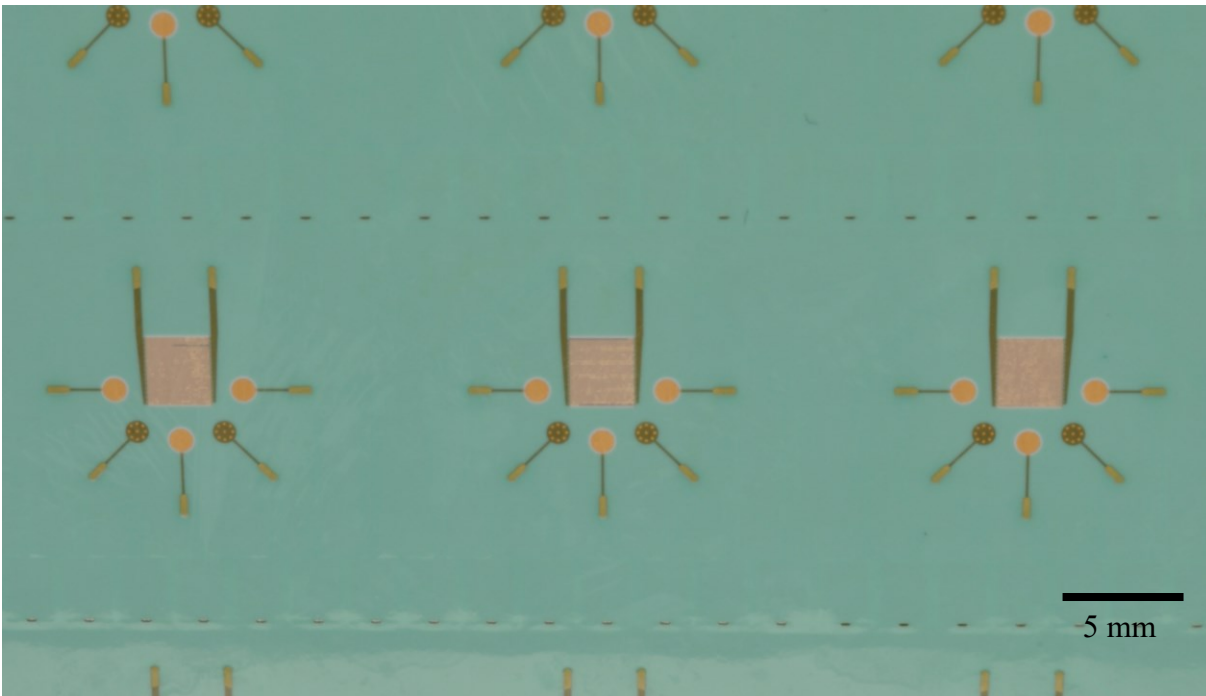


Abbildung 48: Im gezeigten Bildausschnitt sind drei der vierundzwanzig Sensorarrays desselben Foliensubstrates zu sehen. Die goldenen Flächen sind freiliegende Goldstrukturen. Goldgrüne Flächen sind dort zu erkennen, wo das Gold von Lötstopplack überdeckt wurde. Der Rest des ursprünglich weißen Substrates liegt ebenfalls unter dem Lötstopplack und ist dadurch hellgrün.

Technologiebedingt konnten in die Isolationsschicht des Glassubstrats Öffnungen mit einer Strukturgröße von mindestens 20 μm eingebracht werden. Beim Foliensubstrat lag die minimale Strukturgröße bei 50 μm ; aus diesem Grund unterscheiden sich die Layouts der beiden Varianten leicht voneinander.

Abbildung 49 zeigt das Layout der Sensoren auf Glassubstrat. Es besteht aus einer kleinen Elektrode mit einem Durchmesser von 200 μm (1), einer IDEs-Struktur mit Elektrodenbreite und Elektrodenabstand von jeweils 50 μm sowie einer Fläche von 3 x 3 mm (2), drei separaten Mikroelektrodenarrays (3) und zwei großen Elektroden mit einem Durchmesser von 400 μm (4). Zwei der Mikroelektrodenarrays setzen sich aus 25 Elektroden zusammen, das dritte Array besteht aus 13 Elektroden. Alle Mikroelektroden haben einen Durchmesser von 20 μm .

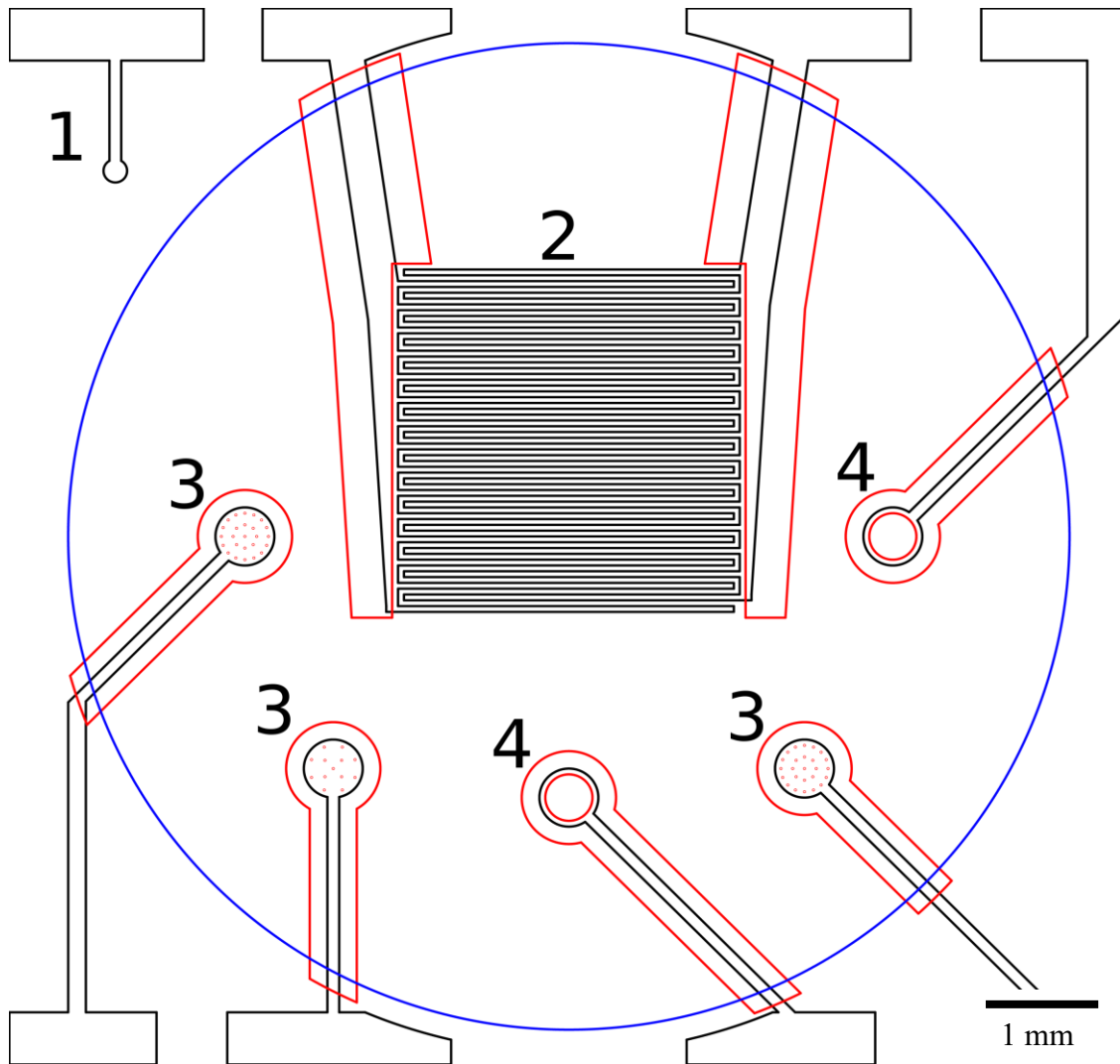


Abbildung 49: Das Layout der Sensoren auf Glassubstrat besteht aus vier verschiedenen Elektrodenarten: 1. Eine kleine Elektrode außerhalb der Zellkulturkammer; 2. Zwei ineinandergreifende Fingerelektroden (IDES); 3. Drei Mikroelektrodenarrays; 4. Zwei großflächige Elektroden; schwarz umrandete Flächen stellen die Platinstrukturen dar. Rot umrandete Flächen stehen für SU-8 3000-bedeckte Bereiche. Der blaue Kreis verläuft an der Stelle, an der das Innere der Zellkulturkammer endet und entspricht der Kontur der Verklebung zwischen Substrat und Kunststoffoberteil der Mikrotiterplatte.

Abbildung 50 stellt in roter Farbe das Layout des Sensorarrays auf Foliensubstrat dar. Zuleitungen und Kontaktflächen, die auf der Rückseite des Substrats gefertigt wurden, sind in blauer Farbe abgebildet. Das Array setzt sich zusammen aus drei großen Elektroden mit einem Durchmesser von je 1 mm, einer IDES-Struktur mit Elektrodenbreite und Elektrodenabstand von jeweils 50 μm sowie einer Fläche von 3x3 mm (2) und zwei Mikroelektrodenarrays, die jeweils aus neun Elektroden mit einem Durchmesser von 140 μm bestehen.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

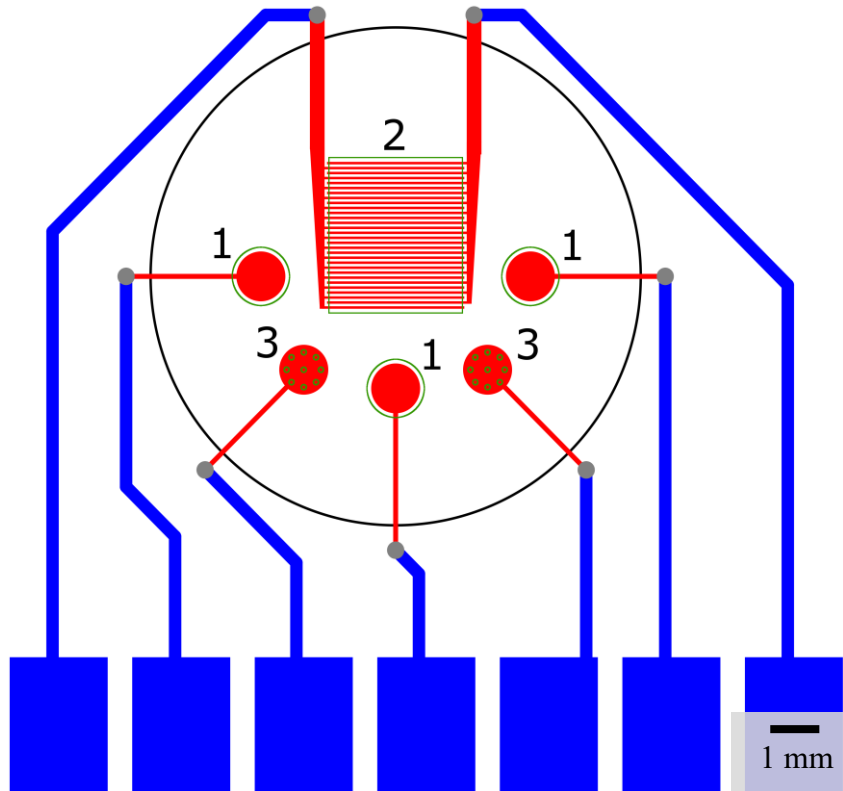


Abbildung 50: Die Darstellung des Sensorlayouts auf dem Foliensubstrat zeigt drei unterschiedliche Elektrodenarten: 1. Drei großflächige Elektroden; 2. Zwei ineinandergreifende Fingerelektroden (IDES); 3. Zwei Mikroelektrodenarrays; Die aufgedampften Goldstrukturen sind rot dargestellt. Die blauen Flächen stellen die in PCB-Technologie gefertigten Zuleitungen auf der Rückseite der Folie dar. Das Innere der grünen Umrandungen kennzeichnet die Bereiche, in denen der Lötstopplack ausgespart wurde. Der schwarze Kreis markiert den Rand der Zellkulturkammer.

4.3.5 Sauerstoffsensoren

Der Sauerstoffsensoren wurde als direkt amperometrischer Sensor realisiert. Das bedeutet, dass die Arbeitselektrode in direktem Kontakt mit dem Messmedium steht. Auf eine zwischenliegende Membran wurde aus Gründen der Miniaturisierung verzichtet. Es muss beachtet werden, dass es hierdurch zur Abnahme der Sensitivität des Sensors kommen kann, da sich Stoffe aus der Messlösung, beispielsweise Proteine, auf der Oberfläche der Edelmetallelektrode ablagern können. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, kann die Elektrode durch gezieltes Anlegen verschiedener Potentiale gereinigt werden. Dieses Vorgehen wurde für Sauerstoffsensoren von Kieninger in [105] bereits ausführlich beschrieben.

Mikroelektroden sind für direkt amperometrische Sauerstoffsensoren von Vorteil, da sie den Einfluss von Konvektion vermindern (vgl. Abschnitt 3.6.2.3). Sie haben jedoch den Nachteil, dass der Elektrodenstrom sehr gering ist und die Elektrodengröße fertigungsbedingten Schwankungen unterliegt.

Um dieses Problem zu lösen, wurden Arrays aus mehreren Mikroelektroden hergestellt. Auf dem Glassubstrat wurden Arrays aus 13 Mikroelektroden mit einem Durchmesser von jeweils 20 μm eingesetzt. Auf dem Foliensubstrat bestanden die Arrays aus 9 Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 140 μm . Abbildung 51 zeigt das Layout der unterschiedlichen Elektrodenarrays.

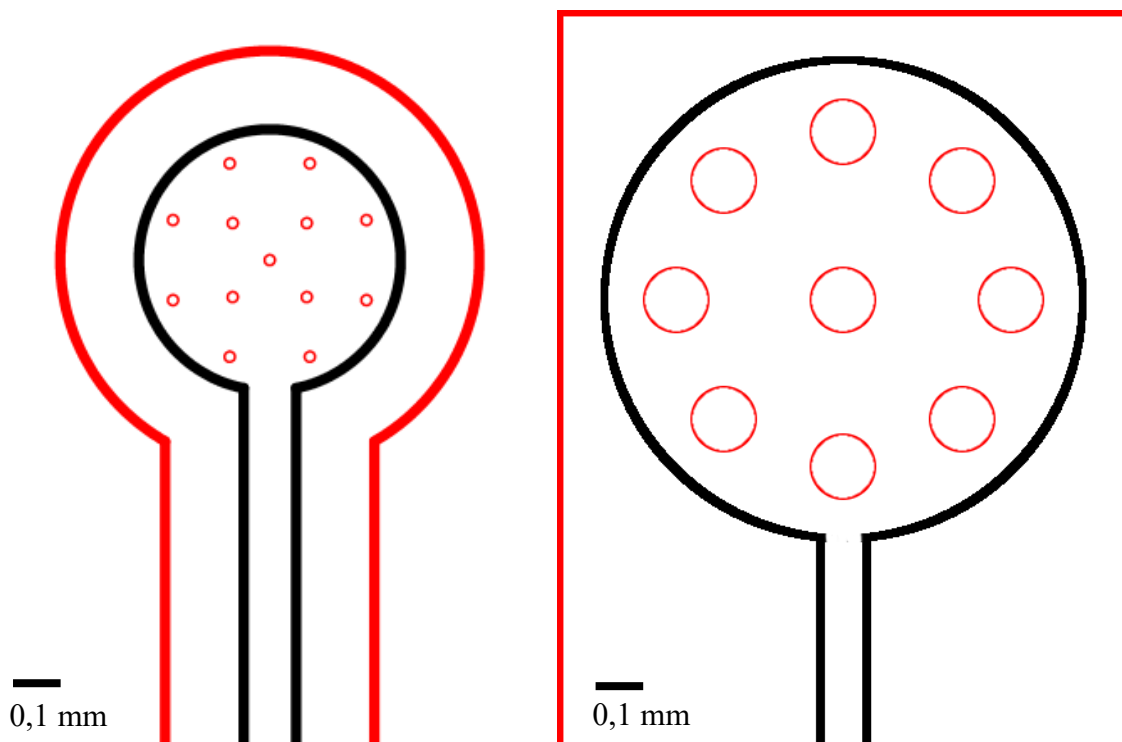


Abbildung 51: Auf der linken Seite ist das Layout des Sauerstoffsensors auf dem Glassubstrat abgebildet. Die rechte Seite zeigt das Layout, das auf dem Foliensubstrat verwendet wurde. Die Konturen der Edelmetallschicht sind schwarz dargestellt. Die Isolationsschicht ist rot gezeichnet. Beim Glassubstrat ist die Isolation nur in unmittelbarer Nähe der Elektroden, beim Foliensubstrat vollflächig aufgebracht. Das Messmedium tritt lediglich an den kreisförmigen Aussparungen der Isolationsschicht mit der Edelmetallelektrode in Kontakt.

Die Elektrodenarrays wurden nach folgender Methode hergestellt: Auf einem Substrat wird eine großflächige Edelmetallelektrode (Gold oder Platin) abgeschieden und anschließend mit einem fotostrukturierbaren Polymer bedeckt. Mit Fotolithografie wurden kreisförmige Öffnungen mit dem gewünschten Durchmesser auf der Elektrode erzeugt. Diese kurzgeschlossenen Mikroelektroden agieren aus elektrochemischer Sicht als eine Mikroelektrode, wenn der Abstand zwischen den einzelnen Öffnungen so groß gewählt wird, dass sich die entstehenden Diffusionsfelder nicht überlappen. In diesem Fall vervielfacht sich bei gleichem Sauerstoffgehalt der Messstrom mit der Anzahl der eingesetzten Elektroden, was zur Verbesserung des SNR führt. Ein weiterer positiver Effekt dabei ist, dass sich Toleranzen

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

bei der Herstellung der 13 Elektroden ausmitteln können und somit zu besser reproduzierbaren Messelektroden führen.

Eine Grundvoraussetzung für die reproduzierbare Herstellung von solchen Mikroelektroden ist eine ausreichende und anhaltende Haftung des fotostrukturierbaren Polymers bzw. der Isolationsschicht auf der Elektrode. Um die Haftung und Isolationseigenschaften der Lacke zu optimieren, wurden drei verschiedene Isolationsschichten verglichen. Getestet wurden die Lacke SU8-2000 und SU8-3000 der Firma MicroChem sowie der Lötstoplack NPR-80 von Nippon Polytech.

Bei Verwendung der beiden SU8-Lacke wurde nicht das gesamte Sensorsubstrat beschichtet, sondern lediglich ein kleiner Bereich um die Elektroden und die jeweiligen Zuleitungen. Dies war nötig, um mechanische Eigenspannungen im Lack und die damit verbundene Bildung von Rissen zu verhindern.

4.3.6 pH-Elektrode

4.3.6.1 Auswahl des Elektrodenmaterials

Iridium- und Rutheniumoxid sind zwei Materialien mit hohem Potential für die Herstellung von miniaturisierten pH-Sensoren. Die galvanische Abscheidung des Iridiumoxids bietet eine labortechnisch gut umsetzbare Möglichkeit, Iridiumoxid auf verschiedenen (leitfähigen) Oberflächen abzuscheiden.

Werden das Substrat sowie die Abscheidungsparameter sorgfältig aufeinander abgestimmt, ist es möglich, einen zuverlässigen pH-Sensor herzustellen [105, 169]. Iridiumoxid kann auf Mikroelektroden im Größenbereich um 25 μm abgeschieden werden [152]. Die resultierenden pH-Elektroden zeigen geringe bis keine Querempfindlichkeiten gegenüber diversen Ionen wie Ca^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Li^+ sowie F^- , Cl^- , I^- , NH_4^+ , NO_3^- [150, 175] sowie einigen schwach redoxaktiven Substanzen [150]. Ihre Ansprechzeit liegt bei einigen Sekunden und ist mit ISFET-Sensoren vergleichbar [167]. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften wurden galvanisch abgeschiedene Iridiumoxidelektroden für diese Arbeit ausgewählt.

4.3.6.2 Optimierung von galvanisch abgeschiedenen Iridiumoxidelektroden

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2.2 angesprochen, können die Eigenschaften von Iridiumoxidelektroden durch die verwendeten Abscheidungsparameter modifiziert werden.

Um pH-Elektroden mit möglichst reproduzierbaren Eigenschaften zu erhalten, wurden die Abscheidungsparameter so gewählt, dass sie zu einer gut haftenden Schicht mit konstanter Schichtdicke führen können.

Um die Anhaftung des Iridiumoxids auf den Substraten Platin und Gold zu verbessern, wurde die von Kieninger beschriebene Methode [105] zur Abscheidung weiterentwickelt. Hierzu wurde das von Yamanaka [158] beschriebene Galvanikbad ohne die Zugabe von Wasserstoffperoxid verwendet. Wasserstoffperoxid ist ein starkes Oxidationsmittel und kann nach Beendigung der Abscheidung weiterhin mit dem Iridiumoxid reagieren.

Angelehnt an die Methode von Kieninger wurde das Potential der Substratelektrode mit einem Potentiostaten (Vertex.100mA der Firma Ivium Technologies) kontrolliert. Hierzu wurde eine Dreielektrodenanordnung eingesetzt. Referenzelektrode war eine Silber/Silberchlorid-Elektrode mit Vycor-Diaphragma (RE-1S der Firma ALS Co., Ltd), die IDES-Strukturen des Sensors wurden als Gegenelektrode verwendet.

Um den Stofftransport an der Elektrode zu verbessern, wurden Arrays aus Mikroelektroden (ähnlich wie bei der Sauerstoffelektrode) eingesetzt. Auf dem Glassubstrat wurden 25 Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 20 μm simultan beschichtet. Bei dem Foliensubstrat wurden 9 Elektroden mit einem Durchmesser von jeweils 140 μm verwendet. Zusätzlich wurde der gesamte Aufbau während der Abscheidung mit einem Rüttler (Teleshake 4 der Firma Variomag) auf niedrigster Stufe geschüttelt, um die Konvektion der Abscheidelösung zu erhöhen. Dies ist ein Unterschied zu der Methode von Kieninger, da dort die Abscheidung in ruhender Lösung erfolgte. Aus diesem Grund und wegen der abweichenden Sensorgeometrie wurden die optimalen Abscheidungsparameter neu bestimmt.

Hieraus ergab sich das verwendete Abscheidungsprotokoll:

1. Abscheidelösung auf Zimmertemperatur aufwärmen lassen
2. Elektroden mit dem Potentiostaten verbinden (Dreielektrodenanordnung) und Rüttler auf kleinste Stufe einstellen
3. Zyklische Voltammetrie zwischen +0,650 V und -0,100 V gegen Ag/AgCl: 15 Zyklen mit 100 mV/s
4. Anlegen eines konstanten Potentials von +0,600 mV gegen Ag/AgCl für 400 Sekunden
5. Abscheidung beenden und Leerlaufspannung der Elektrode für 15 Minuten messen
6. Elektrode 15 Minuten nach Beendigung der Abscheidung aus der Messlösung entfernen

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Die Elektrode muss nach Abschaltung des Abscheidungspotentials für mindestens zehn Minuten in der Lösung verbleiben, da es laut Kieninger [105] in dieser Zeit zu weiteren Abscheidungsprozessen kommt. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da die frisch abgeschiedene Iridiumoxidschicht als geladener elektrochemischer Energiespeicher betrachtet werden kann. Durch die Abgabe dieser Energie wird die Abscheidung für einen kurzen Zeitraum fortgeführt, obwohl keine elektrische Energie durch den Potentiostaten zugeführt wird.

4.3.6.3 Simultane Abscheidung von Iridiumoxid in 24 getrennten Zellkulturkammern

Ein Ziel dieser Arbeit ist die reproduzierbare Herstellung von pH-Sensoren in einer Mikrotiterplatte mit 24 getrennten Kavitäten. Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert wurde, ist eine präzise Kontrolle des Elektrodenpotentials während der Abscheidung für dieses Ziel essenziell. Um 24 Iridiumoxidelektroden in den jeweiligen Kammern simultan abzuscheiden, wäre hierfür ein Aufbau mit 24 Referenzelektroden und 24 Potentiostaten notwendig.

Um den benötigten Aufbau zu vereinfachen, wurde eine alternative Methode zur simultanen Abscheidung auf mehreren Elektroden in getrennten Kavitäten entwickelt. Hierfür wurden alle Arbeitselektroden sowie alle Gegenelektroden jeweils miteinander kurzgeschlossen. Lediglich in einer der 24 Kavitäten befand sich eine Referenzelektrode. Dies wird in Abbildung 52 schematisch dargestellt.

Unter der Annahme, dass die Elektroden der unterschiedlichen Kavitäten weder geometrische noch materielle Unterschiede aufweisen, ist die Funktion des vereinfachten Aufbaus theoretisch gegeben: In jener Kavität, in der sich auch die Referenzelektrode befindet, wird das Potential der Arbeitselektrode durch den Potentiostaten geregelt. Die Stellgröße ist hierbei die Spannung, die aktiv zwischen Arbeits- und Gegenelektrode angelegt wird (vgl. Abschnitt 3.8.3.2). Durch die Kurzschlüsse wird allen Arbeits- und Gegenelektroden der anderen Kavitäten dieselbe Spannungsdifferenz eingeprägt. Somit wird die Stellgröße auf alle Kavitäten übertragen, die Regelgröße jedoch nur in einer Kavität gemessen. Je ähnlicher sich die einzelnen Kavitäten verhalten, umso ähnlicher sind sich die Potentiale der Arbeitselektroden (bezogen auf die Abscheidelösung).

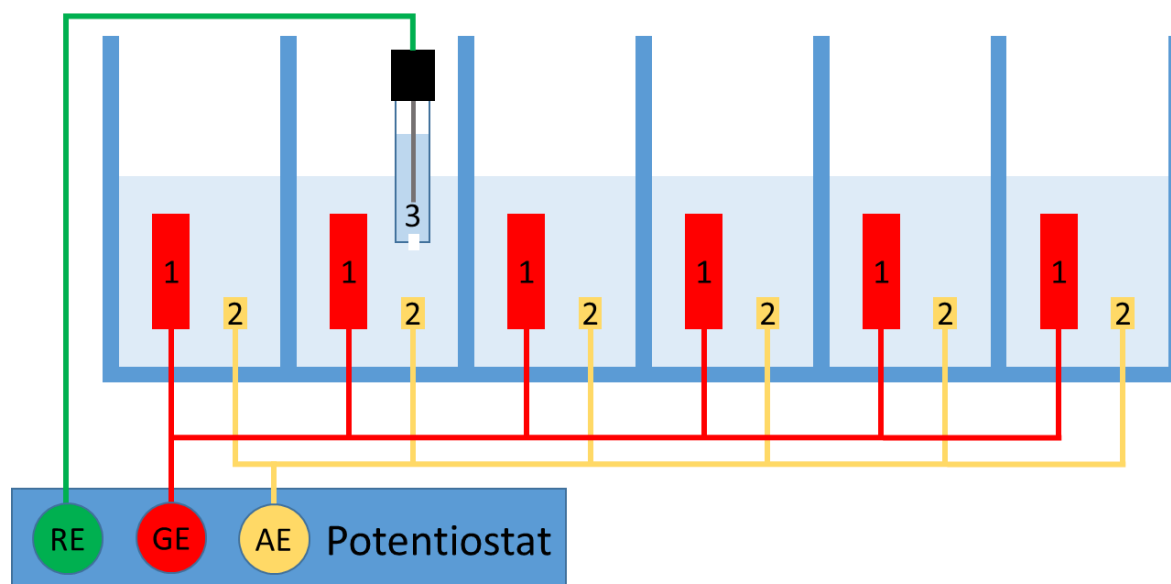


Abbildung 52: Zur simultanen Abscheidung von Iridiumoxid auf verschiedenen Elektroden in unterschiedlichen Zellkulturkammern wurden jeweils die Gegen- (rot) sowie Arbeitselektroden (gelb) kurzgeschlossen und mit dem Potentiostaten verbunden. Eine einzige Referenzelektrode wurde mit dem entsprechenden Anschluss des Potentiostaten verbunden und in eine beliebige Zellkulturkammer eingeführt.

Zur praktischen Durchführung der Abscheidung wurde eine spezielle Adapterplatine zur Kontaktierung der sensorischen Mikrotiterplatten entworfen. Abbildung 53 zeigt den verwendeten Aufbau, der auf einem Rüttler montiert wurde. Die Referenzelektrode wurde mittig zentriert, sodass es trotz der Rüttelbewegung zu keiner Kollision mit der Mikrotiterplatte kam.

Zur Abscheidung wurde die in Abschnitt 4.3.6.2 beschriebene Methode verwendet. Bei den ersten Testreihen kam es jedoch zu unerwarteten Problemen bei der Abscheidung. So wurde beim Glassubstrat ein Teil der Mikroelektroden nicht beschichtet. Im Durchschnitt zeigte etwa die Hälfte der 25 Elektroden die charakteristisch blaue Iridiumoxidschicht. Beim Foliensubstrat wurden ebenfalls manche Mikroelektroden gar nicht und manche Elektroden nur teilweise beschichtet. Elektroden, die lediglich teilweise beschichtet wurden, zeigten stets (halb-)kreisförmige Aussparungen. Durch dieses Indiz und die mikroskopische Untersuchung konnten Luftblasen in beiden Fällen als Ursache identifiziert werden.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

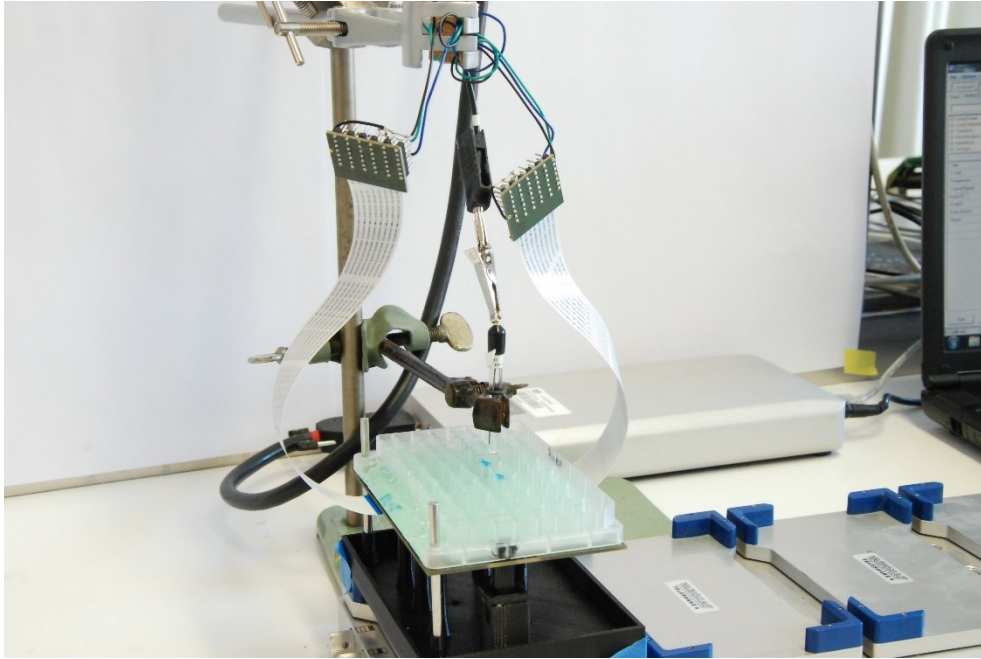


Abbildung 53: Für die simultane Abscheidung des Iridiumoxids wurden die ausgewählten Elektroden der eMTP mittels einer speziellen Vorrichtung elektrisch kontaktiert. Die Vorrichtung wurde auf einem Rüttler montiert, um die Konvektion während der Abscheidung zu verbessern.

Um die Luftblasenbildung auf den Mikroelektroden zu verhindern, wurden zur Herstellung der finalen Sensoren zwei weitere Prozessschritte eingeführt:

1. Sensorsubstrat und Arbeitselektrode wurden vor der Abscheidung 10 Minuten lang mit destilliertem Wasser benetzt
2. Der Abscheidelösung wurde ein Tensid (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Das Mischungsverhältnis betrug 1:1000

Hierdurch konnte die Iridiumoxidabscheidung auf dem Foliensubstrat ohne die oben beschriebenen Probleme durchgeführt werden. Auf dem Glassubstrat verbesserte sich die Quote der beschichteten Mikroelektroden auf 80 Prozent. Durch die Behandlung des Elektroden-Arrays mit Stickstoffplasma konnte eine vollständige Beschichtung aller Elektroden erreicht werden. Der Effekt des Plasmas zeigte sich als zeitlich begrenzt. Aus diesem Grund wurde die Plasmabehandlung nicht für die finalen Sensoren eingesetzt.

Neben dem Mikroelektrodenarray wurde eine der großen Elektroden mit Iridiumoxid beschichtet. Hierzu wurde diese zusätzliche Elektrode mit dem Mikroelektrodenarray kurzgeschlossen. Nachdem die Abscheidung beendet wurde, verblieben die Elektroden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, für 15 Minuten im Galvanikbad. In dieser Zeit wurde der Kurzschluss zwischen den Mikroelektroden und der großen Elektrode getrennt.

Untereinander blieben die Mikroelektroden und die großen Elektroden sowie die Gegenelektroden in den 24 Kammern weiterhin kurzgeschlossen.

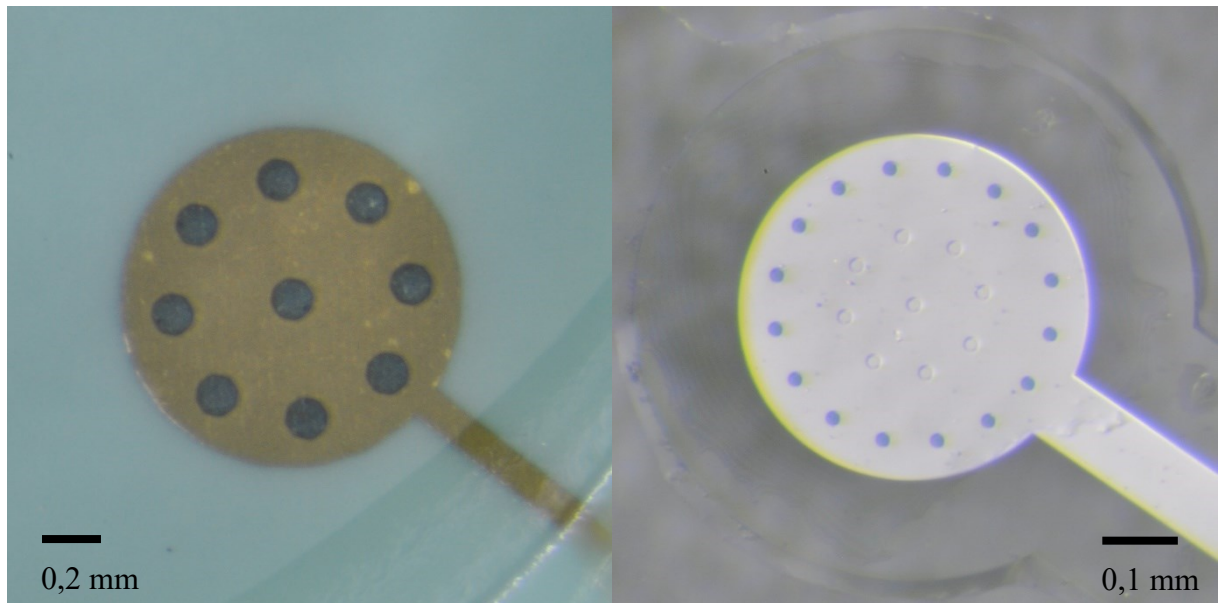


Abbildung 54: Sowohl die Goldelektrode (links) als auch die Platinelektrode (rechts) zeigen nach der Beschichtung mit Iridiumoxid eine deutliche blaue Färbung. Bei den Mikroelektroden mit 20 μm Durchmesser (rechtes Bild) kam es aufgrund winziger Luftblasen häufig zur Abschirmung einzelner Elektroden und dadurch zu einer unvollständigen Beschichtung.

4.3.7 Referenzelektrode

Um den Einfluss von elektromagnetischen Störungen auf die Messung gering zu halten, ist es vorteilhaft, die Referenzelektrode nahe der Messelektroden zu platzieren. Die Referenzelektrode muss aus diesem Grund gut miniaturisierbar sein und darf keine toxischen Effekte auf Zellkulturen haben. Das Potential der Referenzelektrode sollte im Zellkulturmedium stabil sein und weder vom Sauerstoffgehalt noch vom pH-Wert abhängen.

In Zellkulturmedien liegt die Konzentration der Chloridionen üblicherweise bei etwa 0,1 mol/l. Dies macht die Verwendung einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode möglich. Diese Art der Referenzelektrode zeigt ein stabiles Potential und wird häufig eingesetzt. Beim Einsatz in einem Zellkultursystem sind folgende zwei Aspekte zu berücksichtigen:

1. Das Zellkulturmedium ist nicht mit Silberchlorid gesättigt, dadurch wird das Auflösen der Silberchloridschicht im Medium beschleunigt
2. Löst sich Silberchlorid im Medium, können die Silberionen eine toxische Wirkung auf die Zellen haben

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze einer in der Zellkulturkammer integrierbaren Silber/Silberchloridelektrode untersucht. Ziel der Untersuchung war es, die Elektrode mit der geringsten Auswirkung auf die Zellen zu wählen. Diese Elektrode löst sich im Umkehrschluss am langsamsten auf.

Es wurden vier unterschiedliche Arten der Referenzelektrode untersucht: Galvanisch abgeschiedenes Silber mit elektrochemischer Chlorierung, silberchloridhaltige Paste für Siebdruckanwendungen sowie beide Verfahren jeweils mit einer zusätzlichen Hydrogel-Beschichtung.

Die galvanische Versilberung wurde mit einem Halbglanz-Silberbad „ARGUNA ET“ der Firma OMG Galvanotechnik GmbH durchgeführt. Die kathodische Abscheidung erfolgte mit einer Stromdichte von $100 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ über einen Zeitraum von 15 Minuten. Anschließend wurde der Chip gründlich mit destilliertem Wasser gespült, um Rückstände des cyanidhaltigen Galvanikbads zu entfernen. Die Chlorierung erfolgte in 1-molarer Salzsäure mit einer Stromdichte von $100 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Alternativ zur Versilberung wurde eine Silber/Silberchlorid-haltige Paste (DuPont 5874 der Firma DuPont) händisch mit einem Druckluftdispenser auf die Edelmetallelektrode aufgebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gesamte Elektrodenfläche bedeckt war. Substrat und Paste wurden dann in einem Ofen drei Stunden lang bei einer Temperatur zwischen 60°C und 80°C getrocknet.

Für die Erzeugung der Hydrogelschicht wurde pHEMA (Sigma Aldrich) verwendet. Hierzu wurde eine Lösung nach folgendem Rezept angefertigt [243]:

1. Zugabe von 2,1 g Ethanol (99,9 %) zu 2,1 g $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, rühren, bis die Lösung homogen ist
2. Zugabe von 1,4 g pHEMA unter permanentem Schütteln
3. Rühren für zwei Stunden

Alternativ wurde Hydromed™ D4 (AdvanSource Biomaterials Corp.) nach folgendem Rezept verarbeitet [243]:

1. Zugabe von 3,5 g Ethanol (99,9 %) zu 0,75 g $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, rühren, bis die Lösung homogen ist
2. Zugabe von 0,75 g HydroMed™ D4 unter permanentem Schütteln
3. Rühren für drei Stunden

Die pastöse Lösung wurde händisch mit einem Druckluftdispenser so aufgebracht, dass die gesamte Referenzelektrode bedeckt wurde. Danach wurde die Referenzelektrode für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, um das Ethanol aus dem Gel verdunsten zu lassen.

4.3.8 Impedimetrischer Sensor für ECIS

Ziel der Messungen dieser Arbeit war es, die Interferenz zwischen unterschiedlichen Sensoren zu untersuchen. Kleine Elektroden haben bei gleichem Elektrodenpotential einen kleineren Elektrodenstrom (auch wenn die Stromdichte durchaus höher sein kann). Aus diesem Grund tragen kleinere Elektroden weniger stark zu Sensorinterferenzen bei als große Elektroden. Um das Worst-Case-Szenario zu betrachten, wurde eine große IDES-Fläche als ECIS-Sensor ausgewählt. Die Geometrie der verwendeten IDES-Struktur wird im Detail in Abbildung 55 gezeigt. Das gleiche Layout wurde sowohl beim Glas- als auch beim Foliensubstrat verwendet.

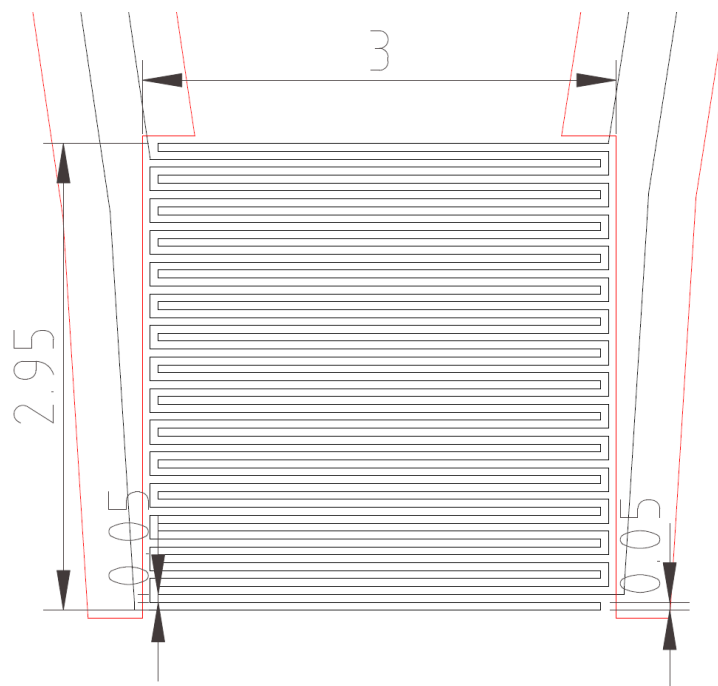


Abbildung 55: Das Layout des ECIS-Sensors besteht aus zwei fingerförmig ineinandergreifenden Elektroden (schwarze Linien). Die Zuleitungen zu den Fingern wurden mit der jeweils verwendeten Isolationsschicht bedeckt (rote Linien). Die Einheit aller Bemaßungen ist Millimeter.

Die bei ECIS für die Anhaftung eingesetzte Elektrodengeometrie ist entscheidend für die spätere Interpretation der Ergebnisse. Große Elektroden und IDES stellen einen Mittelwert über das Verhalten aller Zellen auf der Elektrode dar. Liegt die Dimension der Messelektrode im

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Bereich der Zellgröße, ist die gemessene Änderung der Impedanz allein von einigen wenigen Zellen abhängig. Wie bereits in Abschnitt 3.5.3.1 erläutert, kann je nach Anwendung entweder die eine oder die andere Geometrie vorteilhafter sein.

4.3.9 Sensorintegration in eine Mikrotiterplatte

4.3.9.1 Integrationskonzept

Eine elektrochemische Messung in wässriger Lösung stellt stets eine Herausforderung an die Isolation der Elektronik dar. Die Elektroden selbst müssen in Kontakt zum Medium stehen. Zuleitungen und Verbindungsstellen zwischen Elektroden und der Messelektronik müssen vor demselben Medium geschützt werden. Dies wurde bereits im Detail in Abschnitt 3.7 erläutert.

Die Integration der Sensoren in die eMTP wurde unter Berücksichtigung dieser Herausforderungen wie folgt umgesetzt:

Zur Realisierung der Zellkulturkammern und der Fluidik für den Austausch des Zellkulturmediums wurde auf Vorarbeiten [21, 69, 109] aus dem Bereich des IMR-Systems zurückgegriffen. Für das IMR wurde bereits eine sensorische Mikrotiterplatte entwickelt (siehe Abschnitt 3.5.6.5). Hierdurch ist ein Kunststoffartikel mit 24 Zellkulturkammern verfügbar, in den gleichzeitig die Mikrofluidik für den Austausch des Mediums integriert ist. Im IMR-System wird an die Unterseite dieses Kunststoffartikels eine Glasplatte mit fotochemischen Sensoren angeklebt. In der aktuellen Arbeit wird diese Glasplatte durch ein Substrat mit integrierten elektrochemischen Sensoren ersetzt.

Die Metallisierungen auf dem Substrat wurden so ausgelegt, dass im Bereich der Zellkulturkammer ausschließlich Edelmetalle eingesetzt werden. Außerhalb der Zellkulturkammer wurden die elektrischen Leitungen mit Technologien und Materialien aufgebaut, die bei der Leiterplattenfertigung üblich sind.

Um die elektrochemischen Sensoren mit dem Messsystem verbinden zu können, wurden Kontaktflächen auf der Rückseite der eMTP realisiert. Hierdurch ist es möglich, die 144 benötigten Kontaktstellen gleichmäßig über die gesamte Fläche der Mikrotiterplatte zu verteilen, um so die Kontaktierung zu verbessern.

4.3.9.2 Realisierung der elektrischen Kontakte

Auf dem Foliensubstrat sind die Kontaktpads, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben wurde, bereits auf der Rückseite integriert und die Folie kann direkt mit dem Kunststoffartikel verklebt

werden. Abbildung 56a zeigt die Kontaktpads auf der Rückseite der Folie, Abbildung 56b die Sensoren auf der Vorderseite.

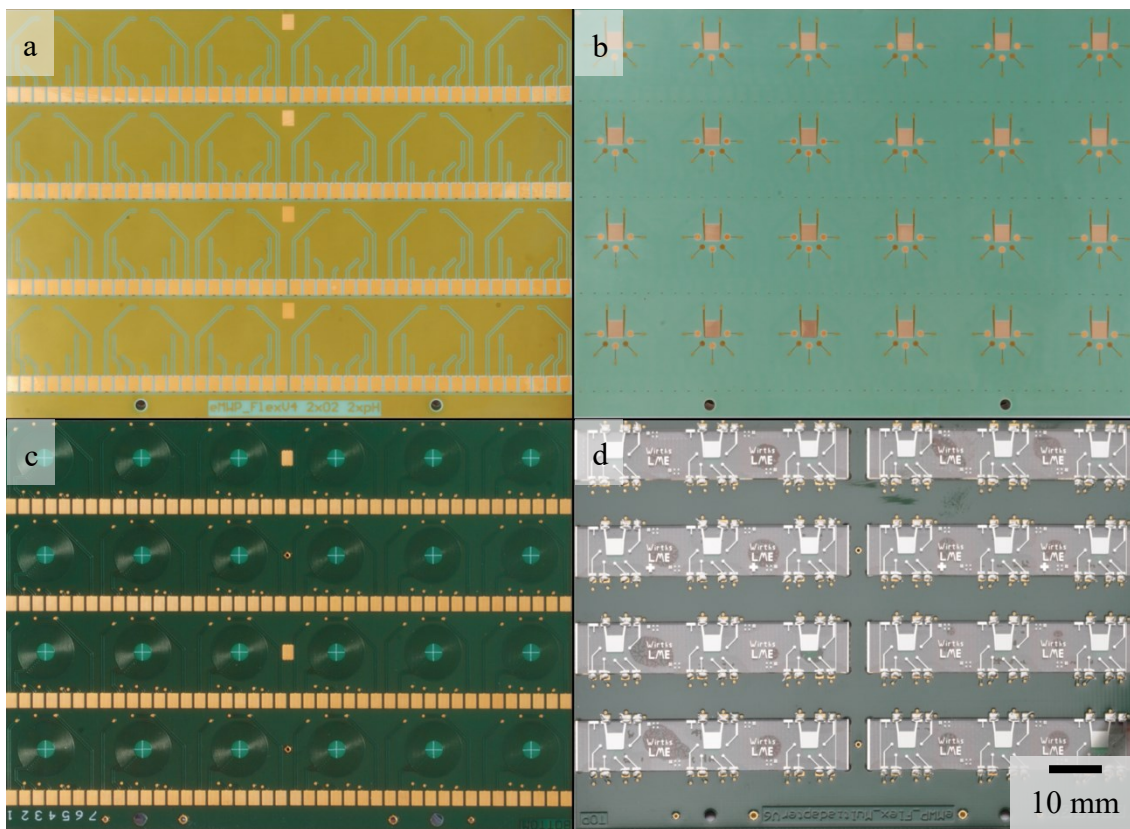


Abbildung 56: Die Sensoren auf dem Foliensubstrat (b) wurden durch Aufdampfen auf einer flexiblen Leiterplatte hergestellt. Die Zuleitungen und Kontaktpads konnten so direkt auf dieser Leiterplatte integriert werden (a). Die Sensoren auf dem Glassubstrat wurden in eine starre Leiterplatte eingelegt, um die Kontaktierung zu ermöglichen (d), auf der neben Zuleitungen und Kontaktpads auch eine Heizstruktur integriert wurde (c).

Für das Glassubstrat wurde eine spezielle Trägerplatine entwickelt, die das Glassubstrat fassen kann und die nötigen elektrischen Leitungen und Kontaktflächen bereitstellt. Die Kontakte für den Anschluss der Messelektronik befinden sich auf der Rückseite der in Abbildung 56c gezeigten Trägerplatine. Auf der Platine wurden zusätzlich Heizelemente realisiert, mit denen die Glassubstrate beheizt werden können. Als Trägerplatine wurde eine normale zweilagige Leiterplatte mit einer Höhe von 1 mm verwendet. In diese Platte wurde eine Tiefenfräsung von 0,5 mm eingebracht, was der Höhe des Glassubstrats entspricht. Beim Leiterplattenlayout wurde darauf geachtet, die Größe der Kupferflächen auf Ober- und Unterseite der Platine möglichst gleich zu gestalten. Dies ist nötig, um die Durchbiegung der Leiterplatte gering zu halten.

Die geschnittenen Glassubstrate wurden in die Trägerplatine eingelegt und mit einem Tropfen Acrylatkleber befestigt. In Abbildung 56d ist die Trägerplatine samt der eingelegten

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Glassubstrate zu sehen. Der elektrische Kontakt zwischen den Metallisierungen des Glassubstrats und den Leiterbahnen der Trägerplatte wurde mit leitfähigem Epoxid-Kleber (Polytec EC 101 der Firma Polytec PT GmbH) hergestellt. Hierzu wurden die zwei Komponenten des Klebers nach Herstellervorgaben vermischt, in eine Einwegspritze (1 mL) gefüllt und händisch auf die 144 Kontaktstellen aufgebracht. Die Aushärtung des Klebers erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde in einem Ofen bei 95-100° C. Abbildung 57 zeigt einen Ausschnitt der Trägerplatte nach Aufbringen und Aushärten des leitfähigen Klebers.

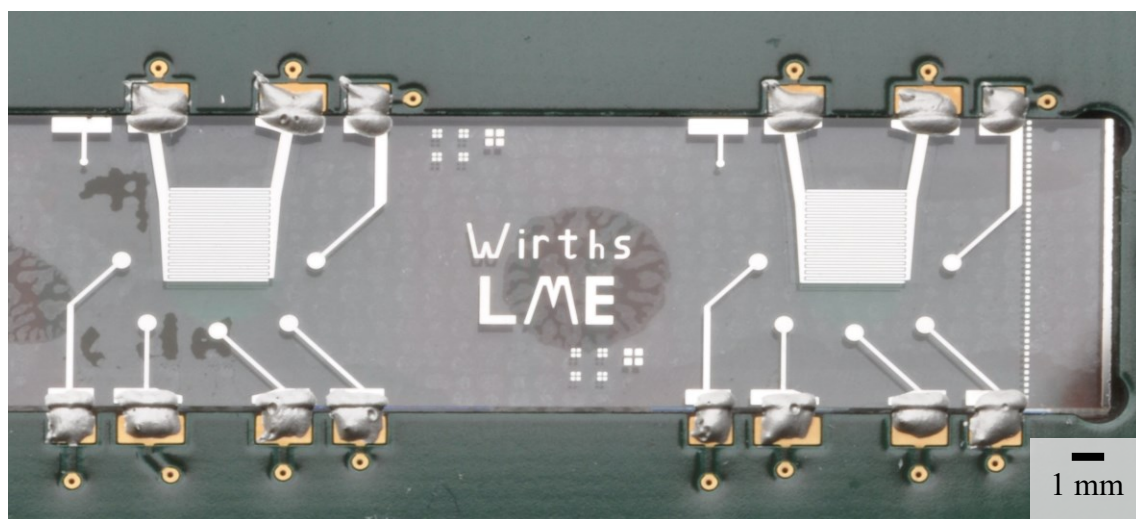


Abbildung 57: Der elektrische Kontakt zwischen der Metallisierung auf dem Glassubstrat und den Zuleitungen auf der Leiterplatte wurde mit leitfähigem Epoxid-Kleber hergestellt.

4.3.9.3 Verklebung von Sensorsubstrat und Mikrotiterplatte

Der Verklebungsprozess ist für die Zuverlässigkeit der eMTP von sehr hoher Bedeutung. Probleme bei der Verklebung können leicht zum Ausfall einzelner Sensoren, des gesamten Sensorarrays oder der ganzen Platte führen.

Aufgrund der Bedeutung und Fehleranfälligkeit der Verklebung wurde zum Aufbringen des Klebers ein maschineller Prozess eingesetzt. Die verwendeten Kunststoffteile wurden von der Firma Erwin Quarder Systemtechnik GmbH zur Verfügung gestellt. Die Verklebung führte die Firma cellasys GmbH mit einem UV-härtenden Kleber durch. Dabei wurde der Kleber mit einem Dosierroboter in die dafür vorgesehene Vertiefung des Kunststoffteils gegeben. Abbildung 58 zeigt den durchlaufenen Pfad.

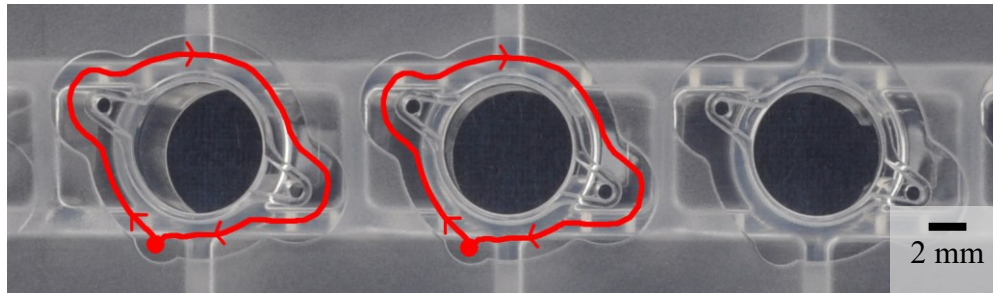


Abbildung 58: Der Kleber wurde in die dafür vorgesehene Nut gegeben, indem die Dosierspitze unter konstanter Abgabe von Klebstoff der roten Linie folgte. Zur Vermeidung von Fehlstellen beginnt und endet die Fahrt in der Ausbuchtung, die mit einem roten Punkt markiert wurde.

Sensorsubstrat und Kunststoffteil wurden mittels einer für diesen Zweck konstruierten Vorrichtung zentriert und zusammengeführt. Der Kleber wurde dann mit einer UV-Lampe gehärtet. Danach wurde die entstandene eMTP aus der Vorrichtung entnommen und es wurde visuell kontrolliert, dass die Sensoren und die Zu- bzw. Abläufe der Mikrofluidik frei von Kleber waren.

4.3.10 Kontakt zwischen Elektronik und eMTP

4.3.10.1 Kontaktierungskonzept

Die Problemanalyse in Abschnitt 4.2.1.2 zeigt, dass die bisher verwendeten Kontaktierungen (Federkontakte, Goldkontaktstreifen, Zebrakontakte) durch Kontakt mit dem Messmedium beschädigt werden und ausfallen. Bislang wurde die Strategie verfolgt, die Kontakte so zu gestalten, dass sie im normalen Betrieb eine gute Reproduzierbarkeit aufweisen und im Fehlerfall leicht austauschbar sind.

In dieser Arbeit wird eine Alternative präsentiert, die ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit des Kontaktwiderstands aufweist, im Fehlerfall jedoch nicht getauscht werden muss. Stattdessen soll es dem Anwender mit gewöhnlichen Labormitteln leicht möglich sein, die Funktion der Kontaktierung wiederherzustellen. Dadurch werden die Benutzerfreundlichkeit gesteigert und die Instandhaltungskosten gesenkt.

Sind die Kontakte nicht offen zugänglich oder sehr eng aneinanderlegend, können Probleme der Kontaktierung leicht unbemerkt bleiben und vor dem Totalausfall die Messwerte stören. Solche Störungen können nur von einem erfahrenen Benutzer mit ausreichendem Verständnis der Ausfallmechanismen erkannt werden. Aus diesem Grund müssen die Kontakte offen liegen und so gestaltet sein, dass eine visuelle Kontrolle vor und nach jedem Experiment einfach durchführbar ist. So wird das Risiko für Kontaktierungsprobleme minimiert.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Die eMTP muss mit einem ausreichend hohen Druck an die Kontakte der Messelektronik gepresst werden. Gibt es sehr viele Kontaktstellen, summieren sich die Federkräfte der Kontakte und können dazu führen, dass sich die eMTP oder die Platine der Messelektronik verformt. Aus diesem Grund ist eine mechanische Vorrichtung nötig, welche die Verformungen der Platine verhindert und einen Anpressmechanismus bereitstellt, der ein leichtes Einsetzen der eMTP ermöglicht.

4.3.10.2 Auswahl und Position der Federkontakte

Zur Verwirklichung des oben genannten Konzepts wurden Federkontakte eingesetzt, da sie toleranter gegenüber Unebenheiten sind als Zebra- und Goldkontaktstreifen. Dies ist vor allem wegen der Größe der eMTP sinnvoll.

Zwei unterschiedliche Arten von Federkontakten wurden zu diesem Zweck in einer Bachelorarbeit [244] von Zubak untersucht. Die erste Art waren SMD-bestückbare Federkontaktstifte (Typ 815-22-001-30-001101 der Firma Mill-Max). Sie bestehen aus einem beweglichen Zylinder in einer Führung, der durch eine Feder vorgespannt ist. Der Zylinder wird zum Schließen des Kontakts an eine entsprechende Kontaktfläche gepresst. Zylinder, Feder und Führung sind mit einer 0,5 µm starken Goldschicht galvanisiert. Die zweite Art sind Federkontakte (Typ 331031321515 der Firma Würth Elektronik), die aus einem zusammenhängenden Berylliumkupferblech gebogen wurden. Auch diese Kontakte wurden vergoldet, wobei die Schichtdicke unbekannt ist.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die einfach aufgebauten Federkontakte der Firma Würth Elektronik robuster gegenüber elektrochemischer Korrosion sind [244]. Sie wurden aus diesem Grund für die Platine der Messelektronik eingesetzt. Abbildung 59 zeigt die mit Federkontakten bestückte Oberseite des Hauptmoduls der Messelektronik.

Zur Kontaktierung zwischen eMTP und Messelektronik wurden 144 Kontakte verwendet. Es wurde pro Zellkulturkammer ein zusätzlicher Kontakt vorgesehen, der für zukünftige Anwendung eine Erweiterung auf 168 Kontakte ermöglicht.

Die Position der Federkontakte wurde in erster Linie durch das Kunststoffteil der eMTP bestimmt. Wie in Abbildung 56 erkennbar ist, sind die Kontaktflächen der eMTP so platziert, dass sie nicht unter der Zellkulturkammer, sondern stets in kunststoffgefüllten Bereichen liegen. Dies war nötig, da sich das dünne Foliensubstrat ansonsten durch den Druck der Federkontakte verformen könnte. Eine zuverlässige Kontaktierung wäre in diesem Fall nicht sichergestellt.

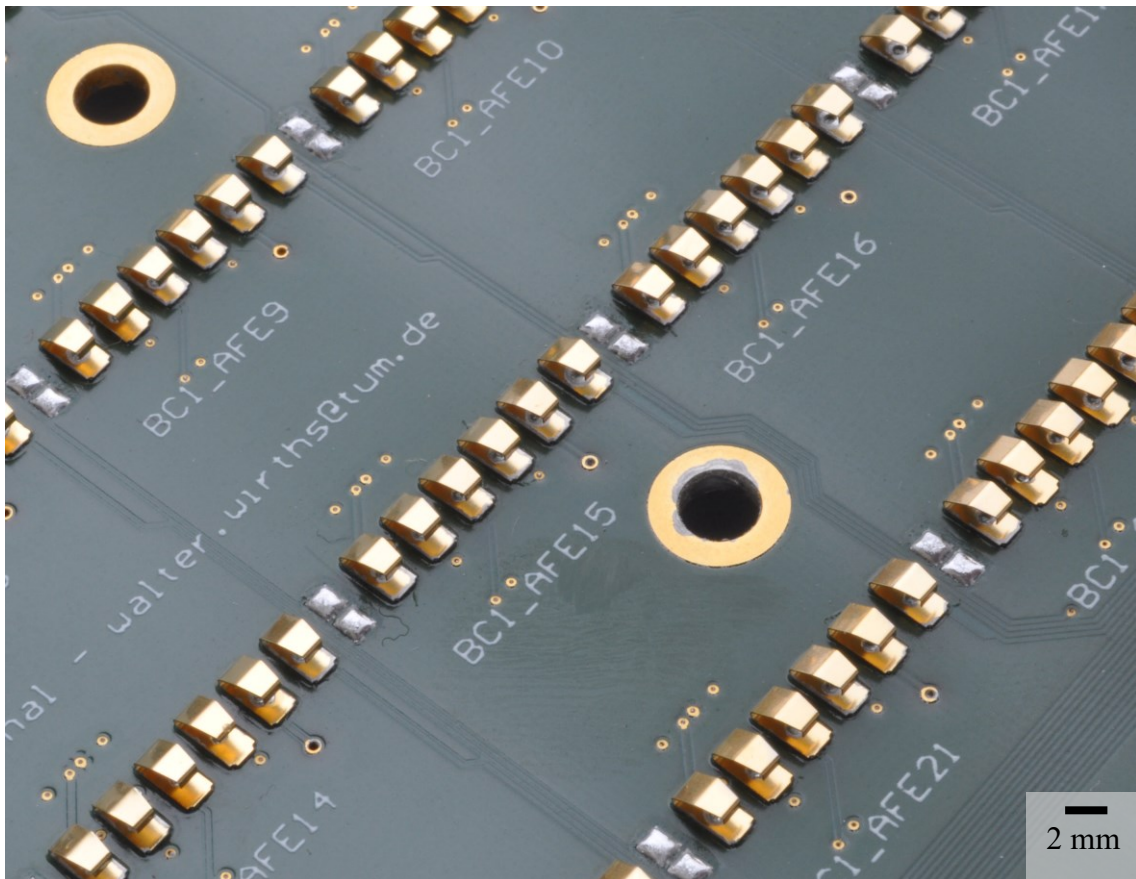


Abbildung 59: Die Nahaufnahme zeigt die Federkontakte, die sich auf der Rückseite des Hauptmoduls der Messelektronik (vgl. Abbildung 45) befinden. Sie sind für die elektrische Verbindung zu den Kontaktpads der eMTP verantwortlich. Die Bohrung in der Mitte des Bildes dient der Aufnahme eines Führungsbolzens, auf dem die Anpressfedern gelagert werden. Das Hauptmodul wird mit sechs Anpressfedern gegen die eMTP gedrückt, um die nötige Anpresskraft zwischen Kontaktfeder und Pad sicherzustellen.

Nach Vorgaben des Herstellers der verwendeten Federkontakte soll eine Kraft von 1,7 N pro Kontakt aufgebracht werden, um die Kontaktierung zu gewährleisten. Bei 144 Kontaktstellen ergibt sich rechnerisch eine Gesamtkraft von 244,8 N.

Um das Durchbiegen der Platine der Messelektronik zu verhindern, wird die Anpresskraft der Federkontakte von sechs Stützpunkten aufgenommen. Jeder der sechs Stützpunkte liegt, wie in Abbildung 60 dargestellt, im Schwerpunkt der Federkräfte der 28 benachbarten Kontakte. Die Stützpunkte sind federnd gelagert, so dass ein Ausgleich von Unebenheiten des Hauptmoduls oder der eMTP ermöglicht wird.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

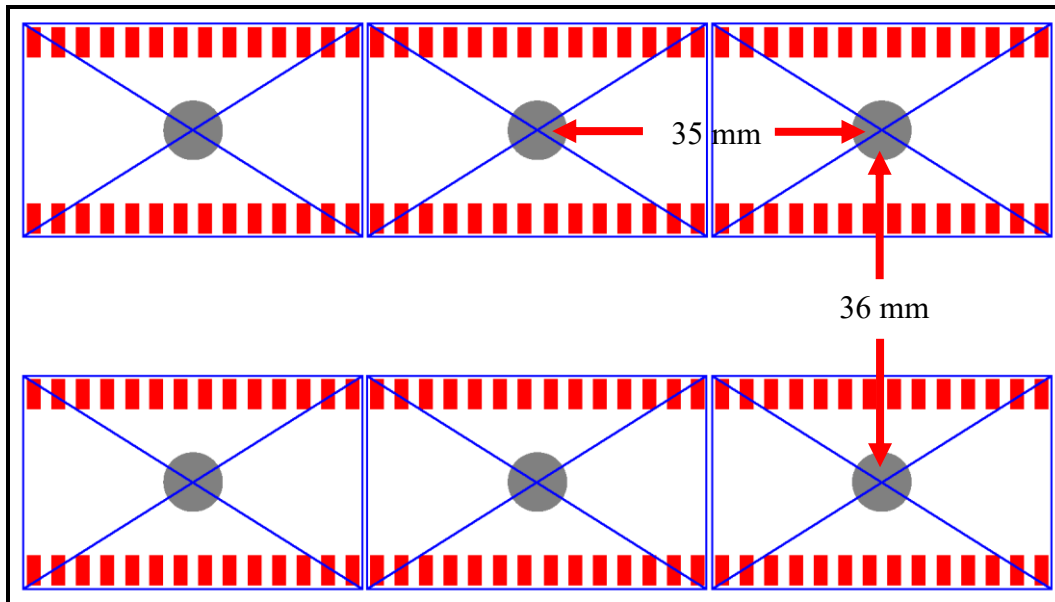


Abbildung 60: Die sechs Stützpunkte des Hauptmoduls liegen im Kraftschwerpunkt der ihnen zugeordneten Federkontakte, um die Durchbiegung des Moduls beim Anpressen an die eMTP zu verhindern. An jedem dieser Stützpunkte drückt eine Feder gegen das Hauptmodul und gleicht damit die Kräfte der Federkontakte aus.

4.3.10.3 Mechanische Vorrichtung zur Kontaktierung

Um den elektrischen Kontakt zwischen eMTP und Messelektronik sicherzustellen, müssen diese mit einer Kraft von 244,8 N aneinandergespreßt werden. Zu diesem Zweck wurde eine erste Vorrichtung entwickelt und für die durchgeführten Versuche (siehe Kapitel 5) verwendet. Die Erkenntnisse aus diesen Experimenten resultierten in der Entwicklung einer verbesserten zweiten Vorrichtung.

Die erste Vorrichtung besteht aus einer 3D-gedruckten Platte, auf deren Oberfläche acht Hohlzylinder und zwei Aufnahmen verankert sind. Abbildung 61a zeigt die Vorrichtung mit angebrachter eMTP. Sechs der Hohlzylinder dienen zur Führung des Hauptmoduls sowie als Lagerpunkt für sechs Druckfedern. In die zwei übrigen Hohlzylinder wurden Metallstangen zur Führung der eMTP eingesetzt. Die entsprechenden Löcher waren im Kunststoffteil bereits vorhanden. Sechs Metallstangen wurden an den hierfür vorgesehenen Bohrungen des Hauptmoduls befestigt. Auf diese Metallstangen wurden Druckfedern (Art. Nr. 5609, bezogen von Federnshop-Bayern) aufgesetzt (siehe Abbildung 61b). Das Hauptmodul wurde mit den Federn derart in die Vorrichtung eingesetzt, dass die sechs Metallstangen in die vorgesehenen Hohlzylinder gleiten. In die zwei Aufnahmen der Vorrichtung wurden Push-Push-Verschlüsse (Typ 42-005664 der Firma PB Fastener) eingesetzt (siehe Abbildung 61c). Ein passender Haken wurde eigens konstruiert und im 3D-Druck hergestellt. Zwei dieser Haken wurden mit 2K-Epoxyd-Klebstoff (Uhu Plus Schnellfest der Firma Uhu GmbH) jeweils rechts und links in

das Kunststoffteil der eMTP eingeklebt (siehe Abbildung 61d). Um das Kippen der eMTP zu verhindern, wurden die Haken auf der Längsachse platziert, die mittig zwischen den beiden oberen und den beiden unteren Reihen der Kontaktflächen verläuft. Da der Haken eine ausreichende Breite von acht Millimetern und die eMTP eine hohe Steifigkeit besitzt, ist diese Zwei-Punkt-Lagerung der eMTP für die Kontaktierung ausreichend. Der Aufbau ist mit der eingesetzten eMTP insgesamt 65 mm hoch.

Zum Einsetzen einer eMTP in die Vorrichtung muss sie entsprechend positioniert und anschließend mit ausreichend hoher Kraft heruntergedrückt werden, bis beide Haken einrasten. Für die Entnahme wird sie heruntergedrückt, bis die Haken gelöst werden. Der Benutzer muss hierfür hohe Kraft aufwenden, was vor allem dann problematisch ist, wenn sich die Vorrichtung bereits im Brutschrank befindet. Rasten die Haken nicht korrekt ein, kann die eMTP durch den Druck der Federn zurückschnellen und nach oben geschleudert werden. Hierdurch kann Messmedium aus der Platte befördert werden und auf den Messaufbau gelangen.

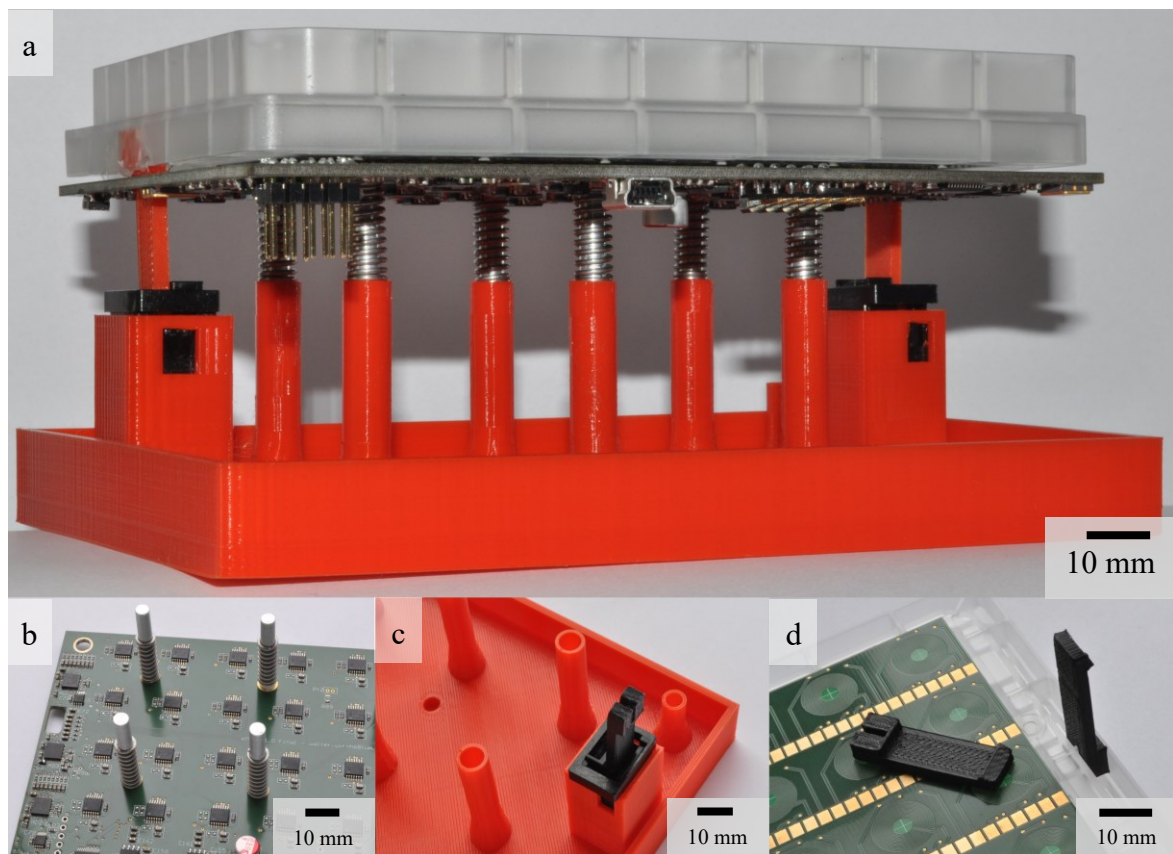


Abbildung 61: Die erste Vorrichtung zur Kontaktierung (a) basiert auf Haken, die in das Kunststoffteil der eMTP geklebt werden können (d). Diese Haken rasten in eine integrierte Druckverriegelung (c) ein und können über erneuten Druck wieder gelöst werden. Im eingerasteten Zustand sinken die auf der Platine befestigten Bolzen (b) in die dafür vorgesehenen Führungen ein und die Federn werden gespannt. Dadurch werden die Kontaktfedern auf der Rückseite des Hauptmoduls an die Kontaktpads der eMTP gepresst.

4.3 Realisierung des Gesamtsystems

Diese Probleme wurden durch die zweite Vorrichtung gelöst. Statt der Druckverriegelung wurden Schnellspannverschlüsse (Typ 97-30-160-12 der Firma Southco) eingesetzt. Durch die Hebelwirkung kann die benötigte Spannkraft wesentlich leichter aufgebracht werden. Die Druckfedern wurden durch Kugelspannschrauben (Typ GN 615.3-M8-KN der Firma Otto Ganter GmbH) ersetzt, um den Federweg zu verkürzen und eine einfache Justierung der Druckverteilung zu ermöglichen. In Abbildung 37 wurde bereits die Gesamtansicht der Vorrichtung dargestellt.

Abbildung 62 zeigt eine Schnittansicht der Vorrichtung mit eingelegter eMTP, die durch die zwei Schnellspannverschlüsse gegen die Federkontakte der Messelektronik gedrückt wird. Das Hauptmodul wird in diesem Fall an den Stützpunkten mit Metallstangen gegengehalten. Die Metallstangen liegen auf den Kugelspannschrauben auf. Hierdurch wirken sich Unebenheiten innerhalb des Arbeitsbereichs der Kugelspannschrauben lediglich geringfügig auf die Druckverteilung aus. Durch Ein- und Ausdrehen dieser Schrauben kann eine Grundeinstellung der Druckverteilung vorgenommen werden, um Fertigungstoleranzen der Vorrichtung auszugleichen.

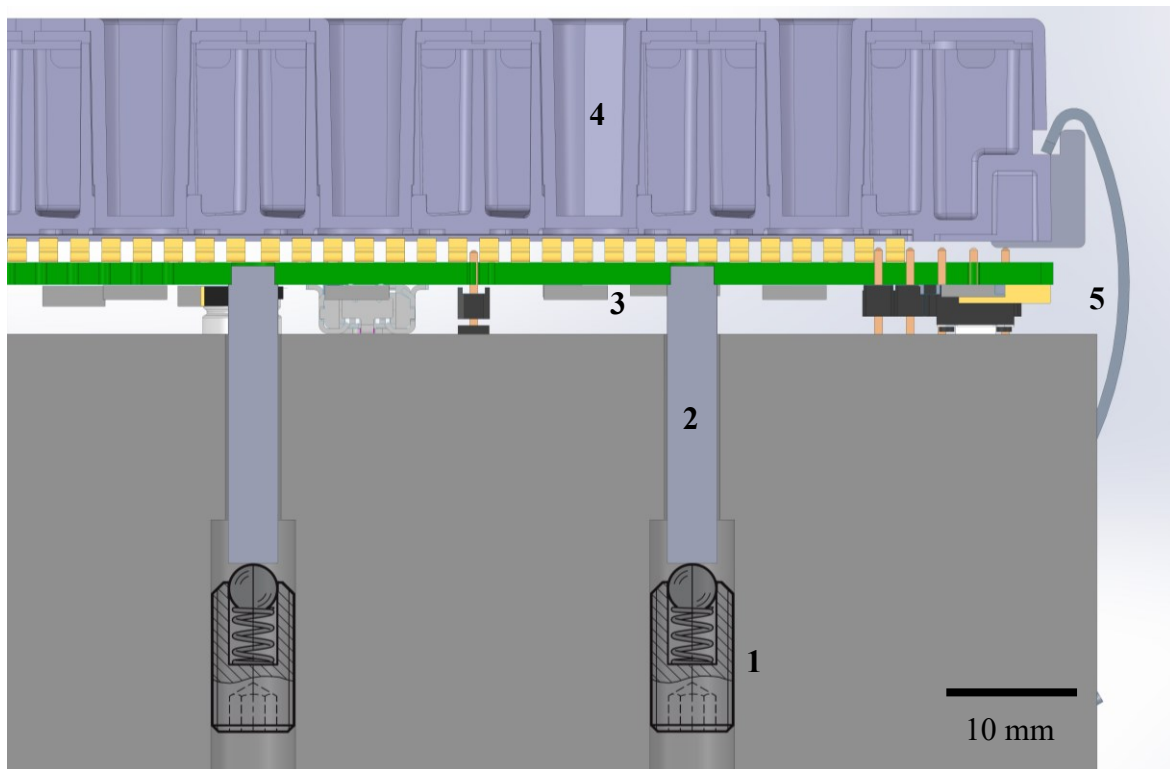


Abbildung 62: In der überarbeiteten Version der Kontaktier Vorrichtung drücken Kugelspannschrauben (1) die Bolzen (2) gegen das Hauptmodul (3) der Messelektronik. Hierdurch wird der für den elektrischen Kontakt nötige Anpressdruck für die Federkontakte aufgebracht. Die eMTP (4) wird mit einem Schnellspannverschluss (5) eingespannt und anschließend fixiert.

In die Bodenplatte der neuen Vorrichtungen wurden vier Bohrungen für Gewindestifte eingebracht. Mit ihnen ist es möglich, die eMTP parallel zum Pipettierkopf des Roboters auszurichten. Damit kann sichergestellt werden, dass die Pipettierspitzen in jede Kavität gleich tief eintauchen. Die korrekte Tiefe beim Pipettieren ist ein wichtiger Faktor bei der Vermeidung von Luftblasen.

Die Höhe der neuen Vorrichtung beträgt 65 mm und ist somit unverändert zur vorherigen. Das Konzept der neuen Vorrichtung hätte eine Reduktion der Höhe auf bis zu 40 mm erlaubt. Hierzu hätte jedoch die Platine der Messelektronik leicht modifiziert und neu aufgebaut werden müssen. Aus Gründen der Nachhaltigkeit wurde hierauf verzichtet.

Beim Entwurf des Mikrophysiometers wurde darauf geachtet, dass die Komponenten keine wesentlich größere Grundfläche haben als die standardisierte Abmessung einer 24-Kavitäten-Mikrotiterplatte. Dies war mit den serienmäßig verfügbaren Schnellspannvorrichtungen nicht möglich. So steht der Spannarm bei der zweiten Vorrichtung auf jeder Seite etwa drei Millimeter über. Ein Prototyp der zweiten Vorrichtung wurde mittels 3D-Druck gefertigt. Abbildung 63 zeigt den Gesamtaufbau des Messsystems, in dem dieser Prototyp verwendet wurde.

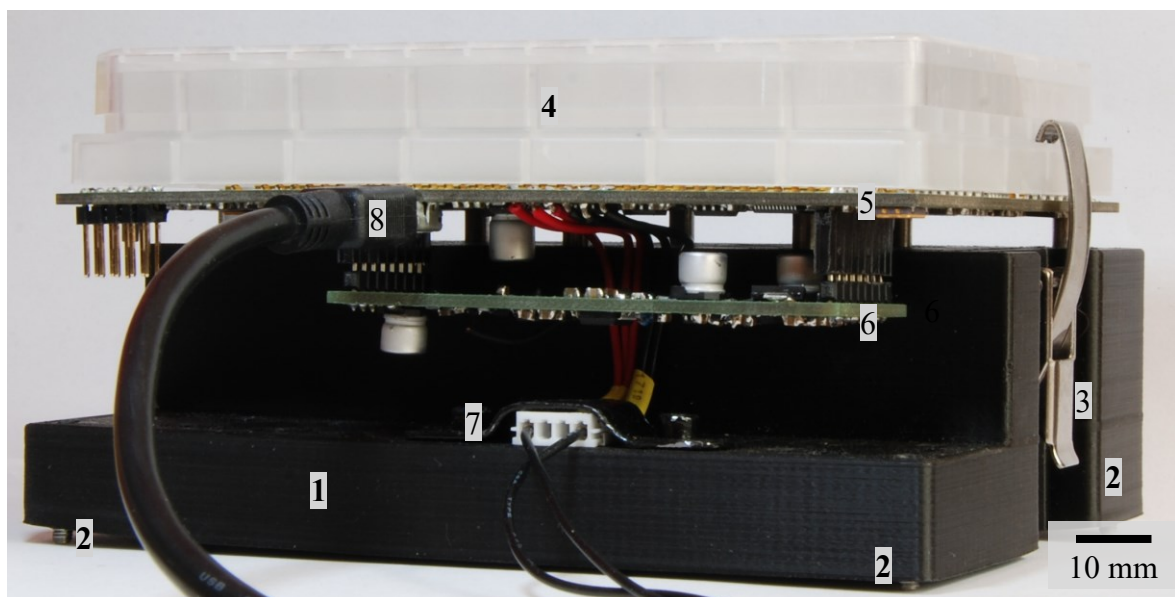


Abbildung 63: Das komplett aufgebaute Messsystem besteht aus der Vorrichtung zur Kontaktierung (1), die mit Gewindestiften (2) parallel zum Pipettierkopf des Roboters ausgerichtet werden kann. Auf der Vorrichtung (1) sind zwei Schnellspannverschlüsse (3) befestigt, mit denen die eMTP (4) nach unten gedrückt und eingespannt wird. Das Hauptmodul (5) der Messelektronik wird mit Kugelspannschrauben an die eMTP (4) gepresst. Das Impedanzmodul (6) ist über Stiftleisten mit dem Hauptmodul (5) verlötet. Die Stromversorgung erfolgt über einen Board-to-Board-Stecker (7). Für die Datenübertragung wird ein Standard USB-Kabel mit Mini-USB-Stecker (8) verwendet.

5 AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG VON VERSUCHEN

5.1 Untersuchung der Isolationsschicht

Zur Untersuchung der Isolationsschicht wurden spezielle Sensorsubstrate angefertigt, bei denen im Sensorbereich die gesamte Fläche der Metallisierung mit der Isolationsschicht bedeckt war. Ansonsten unterscheidet sich das Herstellungsverfahren nicht von den in Abschnitt 4.3.4 genannten Methoden. Eine schematische Darstellung der Messung findet sich in Abbildung 64a.

Auf dem Sensorsubstrat wurde mit einem 3D-Drucker im Schmelzschichtungsverfahren eine Kavität aufgedruckt. Verwendet wurde hierfür ein Polyurethan (NinjaFlex 85a, Farbe: Fire der Firma Fenner Drives, Inc.), da es eine gute Haftung auf den eingesetzten Substraten aufweist.

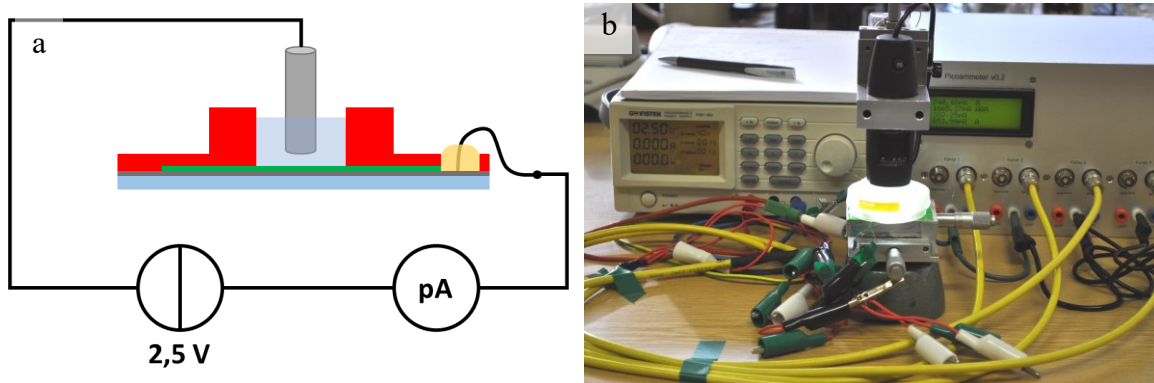


Abbildung 64: (a) Zur Untersuchung der Isolationsschicht wird die Metallisierung (grau) auf dem Substrat (blau) komplett mit der Isolationsschicht (grün) überdeckt. Eine Kammer aus Polyurethan (rot) befindet sich auf dem Substrat und wird mit PBS (hellblau) gefüllt. Zwischen der Metallisierung und der Gegenelektrode (grauer Zylinder) wird eine Spannung von 2,5 V angelegt. Der resultierende Stromfluss wird von einem Picoamperemeter gemessen. (b) Der reale Messaufbau zur Untersuchung der Isolationsschicht besteht aus der Spannungsquelle (links), dem Picoamperemeter (rechts) und einem digitalen USB-Mikroskop (Mitte) zur optischen Kontrolle der Probe.

Außerhalb der Kavität wurde ein dünner Kupferdraht mit einem niederschmelzenden Lötzinn (Typ CR11 der Firma Edsyn GmbH) an die dort freiliegende Metallisierung gelötet. Die Lötstelle wurde mit einem Epoxid-Kleber (ET301-2 der Firma Epoxy Technology) vergossen, um diese gegen Feuchtigkeit zu schützen.

Als Gegenelektrode wurde eine Platinelektrode mit einer Fläche von 4 mm² verwendet. Zwischen der abgedeckten Elektrode und der Gegenelektrode wurde mit einem üblichen Labornetzteil eine Spannung von 2,5 V angelegt. Der fließende Strom wurde mit einem Picoamperemeter aufgezeichnet, das zu diesem Zweck entwickelt wurde [242]. Abbildung 64b zeigt die praktische Umsetzung des Messaufbaus.

Über die integrierte USB-Schnittstelle des Strommessgeräts wurden die Messdaten an einen Computer übertragen und auf diesem gespeichert. Die abgedeckten Leiterbahnen wurden zusätzlich mit einem digitalen Mikroskop beobachtet. Da das Messgerät über vier getrennte Messkanäle verfügt, konnten pro Experiment bis zu vier Isolationsschichten gleichzeitig getestet werden.

5.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

Um die Fähigkeit des Mikrophysiometers zu evaluieren und den gelösten Sauerstoffgehalt reproduzierbar und hochauflösend zu messen, sind Referenzmedien nötig, die einen definierten Sauerstoffgehalt haben.

Da es schwierig ist, ein Referenzmedium mit einem definierten Sauerstoffgehalt herzustellen, erweist sich das Testen der Sauerstoffsensoren als besonders kompliziert. Der größte Störfaktor ist der Austausch von Sauerstoff zwischen Messmedium und Umgebungsluft. Vor allem bei kleinen Probevolumina und bedingt durch das Pipettieren des Mediums wird dieser Effekt verstärkt.

Auch die chemische Entfernung von gelöstem Sauerstoff aus der Messlösung, beispielsweise mittels Natriumsulfit, kann problematisch sein. Da ein direkt amperometrischer Sensor (vgl. Abschnitt 3.6.2.2) nicht von einer Membran geschützt wird, können diese reduzierend wirkenden Substanzen elektrochemisch an der Arbeitselektrode umgesetzt werden und das Messergebnis verfälschen.

Aus diesen Gründen wurden die Messungen in einer gasdichten Messkammer durchgeführt, in der die Sauerstoffkonzentration geregelt werden konnte (siehe Abbildung 65a und b). Die Kammer besteht aus miteinander verschraubten Plexiglasplatten, einer Schleuse und zwei gasdichten Handschuhen. In ihr befinden sich ein Sensorarray zur Erfassung von Temperatur, Luftfeuchte und Sauerstoffgehalt sowie Ventilatoren zur Durchmischung der eingeleiteten Gase. Ein Mikrocomputer (Arduino Uno R3 der Firma Arduino S.r.l.) wertet die Sensordaten aus und steuert Ventile zum Einleiten von Stickstoff oder Sauerstoff. Die Gase werden in der

5.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

Kammer durch destilliertes Wasser geleitet, um sie mit Wasser zu sättigen und eine hohe Luftfeuchte sicherzustellen. Dies ist nötig, da das trockene Gas ansonsten zu einer schnellen Verdunstung des Messmediums führen würde.

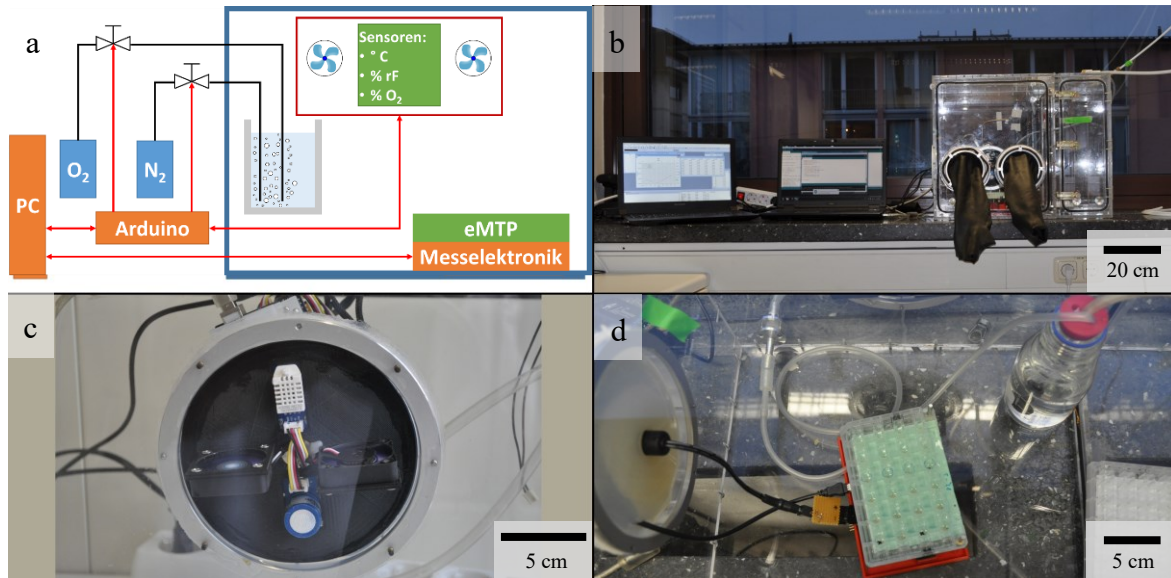


Abbildung 65: (a) Die schematische Darstellung des Testaufbaus für die Sauerstoffmessung zeigt, wie der Sauerstoffgehalt innerhalb der Messkammer mit einem Arduino gesteuert wird. Hierzu werden die Sensoren in der Messkammer ausgelesen und abhängig von diesen Messwerten die Schaltzeiten von zwei Ventilen bestimmt, die wahlweise Sauerstoff oder Stickstoff in die Messkammer leiten. Ventilatoren in der Messkammer sorgen für eine gute Durchmischung der eingeleiteten Gase. (b) Der reale Messaufbau besteht aus der Messkammer und einem Notebook, das die Messungen an der eMTP steuert. Ein weiteres Notebook wurde mit dem Arduino verbunden, um den Sauerstoffgehalt in der Messkammer kontinuierlich aufzuzeichnen. (c) Die Detailansicht der Sensoren, die in der Messkammer verbaut wurden, zeigt den Temperatur- und Luftfeuchtesensor (oben) und den Sauerstoffsensor (unten). Rechts und links sind jeweils Ventilatoren befestigt. (d) Im inneren der Messkammer befinden sich das Messsystem und die eMTP. Die Gase werden durch eine Waschflasche geleitet und so befeuchtet.

Die Regelung der Gaszufuhr wurde in einer Bachelorarbeit [245] entwickelt. Das verwendete Sensorarray wird in Abbildung 65c gezeigt. Es besteht aus einem Sauerstoffsensor (Typ 101020002 der Firma Seedstudio) sowie einem kombinierten Temperatur-Luftfeuchtesensor (Typ AM2302 der Firma Seedstudio). Alle Kabeldurchführungen wurden sorgfältig mit Silikon abgedichtet. Kleinere Undichtigkeiten an den Stoßkanten des Plexiglastastens verhindern jedoch, dass sich ein Überdruck aufbauen kann. Die Messung selbst wurde mit der entwickelten Messelektronik und der ersten Version der Vorrichtung zur Kontaktierung durchgeführt. Abbildung 65d zeigt die Kammer mit der eingebauten eMTP und einer Waschflasche zur Befeuchtung der eingeleiteten Gase.

Kapitel 5: Aufbau und Durchführung von Versuchen

Die Kavitäten der eMTP wurden mit 300 μL PBS befüllt. Das geringe Volumen wurde gewählt, um den Transfer des Sauerstoffs zwischen Messmedium und Gasphase zu beschleunigen. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (20-25° C) durchgeführt.

Sensoren auf beiden Substratvarianten (Glas und Folie) wurden in diesem Aufbau auf Sensitivität und Streuung getestet. Zu diesem Zweck wurde der Volumenanteil an Sauerstoff in der Kammer schrittweise um 5 % pro Stunde erhöht. Die Messung wurde bei 5 Vol.-% Sauerstoff gestartet und bei 30 Vol.-% beendet. Die Herstellung der eMTPs erfolgte nach der in Abschnitt 4.3 beschriebenen Methoden. Die Polarisationsspannung wurde bei diesen Versuchen zu 0,7 V gewählt.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Hydrogelmembran über der Arbeits- und Referenzelektrode untersucht. Hierfür wurde eine eMTP mit Foliensubstrat wie folgt modifiziert: Die Referenzelektroden wurden mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 bedeckt. Zusätzlich wurden die Arbeitselektroden auf der rechten Seite der Platte (Kavität Nr. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24) ebenfalls mit Hydromed™ D4 bedeckt. Die Arbeitselektroden der linken Seite wurden nicht modifiziert. Im Versuch wurde die Sauerstoffkonzentration zu Beginn stufenweise erhöht, danach stufenweise verringert. Die Dauer jeder Stufe betrug eine Stunde. Nach 6,5 Stunden wurde in jede Kavität 150 μL destilliertes Wasser gegeben, um die vorangegangene Verdunstung des Messmediums zu kompensieren. Der Verlauf der eingestellten Sauerstoffkonzentrationen während der Messung wird in Tabelle 5-1 wiedergegeben. Bei dem Versuch wurde eine Polarisationsspannung von 0,5 V an die Arbeitselektrode angelegt.

Zeit [h]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sauerstoff [Vol.-%]	5	10	15	20	25	30	25	20	15	12,5	10	7,5	5	2,5	0,5

Tabelle 5-1: Die Tabelle stellt die zeitliche Abfolge der Sauerstoffkonzentrationen dar, die in der Messkammer zur Untersuchung des Einflusses des Hydrogels Hydromed™ D4 eingestellt wurde.

5.3 Messung des pH-Wertes

Die Fähigkeit des Mikrophysiometers, relative Änderungen des pH-Wertes hochauflösend zu messen, wurde mit den im Weiteren beschriebenen Experimenten untersucht. Zu diesem Zweck wurden eigens hergestellte Referenzpuffer mit variierendem pH-Wert verwendet.

Zur Herstellung dieser Puffer wurde PBS mit 1-molarer Schwefelsäure titriert, bis sich der gewünschte pH-Wert einstellte. Als Referenz wurde ein kalibriertes Labor pH-Meter mit zwei Nachkommastellen verwendet. Titration und Ablesen des pH-Meters erfolgten unter permanentem Rühren der Messlösung. Auf diese Art wurden pH-Puffer mit den Werten pH 7,05-7,10-7,15-7,20 hergestellt. Der Ausgangs-pH-Wert der PBS-Lösung lag zwischen pH 7,28 und pH 7,36.

Um eine Aussage über die Messung von relativen pH-Änderungen treffen zu können, müssen die Referenzmedien in der Kavität ausgetauscht werden. Nur dann, wenn das alte Medium restlos durch das neue ersetzt wird, ist sichergestellt, dass der reale pH-Wert am Sensor dem des neuen Mediums entspricht. Die Verwendung des Drei-Kammer-Systems ist hierfür nicht geeignet, da diese Fluidik das Vermischen von neuer und alter Pufferlösung begünstigt, anstatt sie auszutauschen [24].

Stattdessen wurde ein Pipettierroboter (Precision PRC384 der Firma Biotek) mit 200 µl Pipetten (Typ 986-261 der Firma Molecular BioProduks, Inc) verwendet, um das Medium direkt aus der Hauptkammer abzusaugen und den neuen pH-Puffer direkt in dieselbe Hauptkammer zu pipettieren. Der verwendete Roboter wurde mit vier Pipetten bestückt, so dass jeweils eine Spalte der eMTP gleichzeitig pipettiert werden konnte. Um die eMTP optimal zum Pipettierkopf auszurichten, wurde eine spezielle Plattform entworfen. Auf dieser Plattform konnten die erste Version der Vorrichtung aus Abschnitt 4.3.10.3 sowie der Roboter selbst montiert und zueinander ausgerichtet werden. Der Roboter wurde mit Gummipuffern von der Vorrichtung entkoppelt, um die Übertragung von mechanischen Schwingungen auf die eMTP zu reduzieren. Der gesamte Aufbau wird in Abbildung 66 gezeigt.

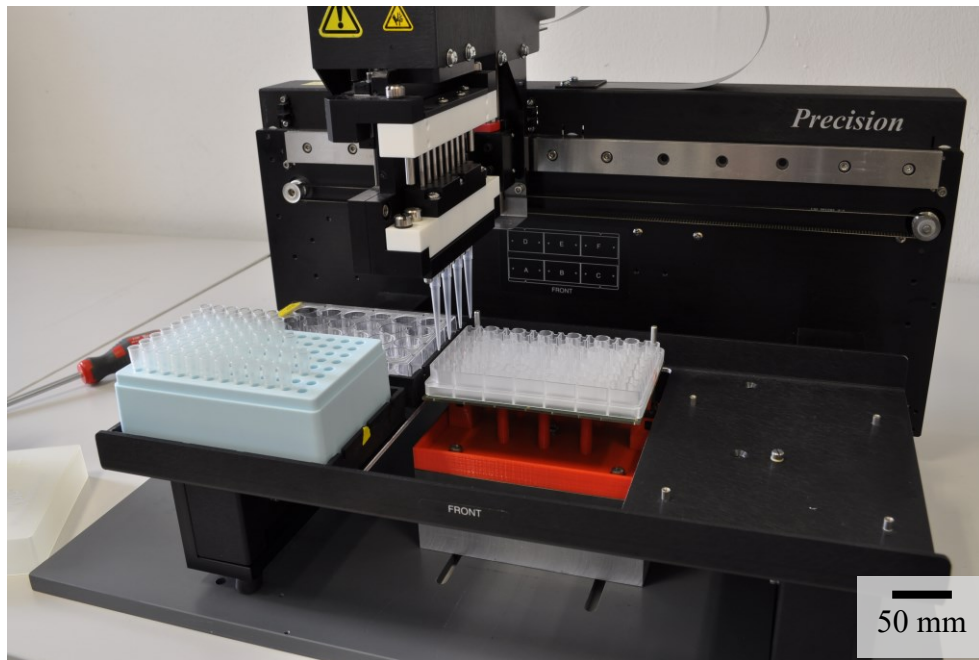


Abbildung 66: Das Messsystem wurde so konstruiert, dass es mit dem eMTP in einen Pipettierroboter integriert werden kann. Um eine Kompatibilität zu den 24-fach-Platten zu erreichen wurden nur vier der acht Kanäle des Roboters mit Pipettenspitzen bestückt.

In alle 24 Kavitäten der Platte wurden anfangs jeweils 100 μl des ersten pH-Puffers gegeben. Während der Messung wurde das Medium durch den Roboter spaltenweise abgesaugt und durch neuen Puffer ersetzt. Die sechs Spalten der eMTP wurden dabei nach folgendem Schema bearbeitet:

1. 100 μl Puffer aus den Kavitäten der Spalte 1 absaugen
2. 100 μl aus Spalte 2 absaugen
3. 200 μl in den Abfallbehälter abgeben
4. 200 μl frische Pufferlösung aus Vorratsbehälter absaugen
5. 100 μl Puffer in die Kavitäten der Spalte 1 dispensieren
6. 100 μl Puffer in die Kavitäten der Spalte 2 dispensieren
7. Schritte 1 bis 6 für die Spalte 3 und 4 wiederholen
8. Schritte 1 bis 6 für die Spalte 5 und 6 wiederholen

Der gesamte Vorgang (Schritt 1 bis 8) wurde für jeden neuen Puffer dreimal wiederholt, um eventuell verbliebene Reste des alten Puffers durch Spülen mit dem neuen Puffer zu entfernen. Nach dem Spülen wurde der Roboter für fünf Minuten angehalten und anschließend zum nächsten Puffer gewechselt.

Die Messung wurde während des gesamten Versuchs kontinuierlich mit der entwickelten Messelektronik durchgeführt. Für die Versuche wurden eMTP mit Foliensubstrat eingesetzt

5.4 Biokompatibilität der Referenzelektrode

und mit Iridiumoxid beschichtet (siehe Abschnitt 4.3.6). Sensoren auf Glassubstrat wurden aufgrund der bereits beschriebenen Probleme bei der Abscheidung des Iridiumoxids nicht verwendet.

5.4 Biokompatibilität der Referenzelektrode

Die Biokompatibilität der Referenzelektrode wurde untersucht, um mögliche negative Effekte dieser Elektrode auf die Zellen zu erkennen. Konkret handelt es sich deswegen um die Untersuchung der Zytokompatibilität. Das Ziel der Versuche war es jedoch nicht, eine umfassende Analyse der toxischen Effekte verschiedener Referenzelektroden auf Zellen zu liefern, sondern die am besten geeignete Referenzelektrode für die Zellkulturversuche (siehe Abschnitt 5.8) auszuwählen.

Für die Experimente wurden Referenzelektroden nach den in Abschnitt 4.3.7 beschriebenen Methoden auf einem Glassubstrat hergestellt. Für die beiden mit Hydrogel beschichteten Varianten wurde pHEMA verwendet. Die Substrate wurden auf eine Größe von 10 x 10 mm zugeschnitten und mit einem biokompatiblen Silikonkautschuk-Kleber (Typ 692-542 der Firma RS Components) in eine sechsfache Mikrotiterplatte eingeklebt. Der Kleber wurde mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Zwei Kavitäten jeder Platte wurden als Negativkontrolle leer gelassen.

Die Mikrotiterplatten wurden nach dem Trocknen 1 h unter UV-Licht sterilisiert. Anschließend wurden Zellen der Linie L-929 (bezogen von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² in die sechs Kammern eingesät. Als Zellkulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum verwendet. Die Platten wurden sechs Tage lang bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank inkubiert, danach erfolgte die Auswertung des Experiments. Hierzu wurden die Zellen unter einem Mikroskop betrachtet.

5.5 Impedanzmessung

Zur Messung der Zelladhäsion (ECIS) wird die Impedanz an der IDEs-Struktur des Sensorarrays gemessen. Um die Funktion der Sensoren und des Messsystems zu evaluieren, wurden Testlösungen mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten verwendet.

Zur Herstellung der Messlösungen wurde KCl in destilliertem Wasser gelöst, bis sich die gewünschte Leitfähigkeit der Lösung eingestellt hatte. Die Leitfähigkeit wurde mit einem

kalibrierten Messgerät (oxi 340i der Firma Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG) kontrolliert. Auf diese Art wurden vier Messlösungen LF1 bis LF4 hergestellt. Die gemessene Leitfähigkeit sowie der errechnete spezifische Widerstand der Lösungen werden in Tabelle 5-2 angegeben.

Bezeichnung	Leitfähigkeit σ [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	Spezifischer Widerstand ρ [Ωcm]
LF1	508	1969
LF2	1004	996
LF3	1498	668
LF4	1993	502

Tabelle 5-2: Übersicht über die hergestellten Messlösungen zur Leitfähigkeitsmessung

Die Messung wurde mit einer eMTP durchgeführt, wobei Sensoren auf Foliensubstrat zum Einsatz kamen. Die Messlösungen wurden auch in diesem Experiment mit einem Pipettierroboter (Precision PRC384 der Firma Biotek) in die eMTP gegeben. Zur Kontaktierung wurde die neue Vorrichtung verwendet (vgl. Abschnitt 4.3.10.3 und Abbildung 63). Hierdurch konnten die originalen Aufnahmen des Pipettierroboters ohne zusätzliche Modifikationen verwendet werden.

Die Abfolge beim Pipettieren der Messlösungen wurde im Vergleich zu Abschnitt 5.3 modifiziert. In alle 24 Kavitäten der Platte wurden anfangs jeweils 100 μl der Messlösung LF1 gegeben. Danach führte der Roboter folgende Pipettiervorgänge aus:

1. 100 μl Lösung aus den Kavitäten der Spalte 1 absaugen
2. 100 μl in den Abfallbehälter abgeben
3. Schritte 1 und 2 für die Spalten 2 bis 6 wiederholen
4. 100 μl Lösung aus Vorratsbehälter (LF1 bis LF4 oder destilliertes Wasser) absaugen
5. 100 μl Lösung in die Kavitäten der Spalte 1 dispensieren
6. Schritte 4 und 5 für die Spalten 2 bis 6 wiederholen

Um die Messlösung zu wechseln, wurden die Schritte 1 bis 6 zunächst dreimal mit destilliertem Wasser und anschließend zweimal mit der neuen Messlösung durchgeführt. Danach wurde der Roboter für zehn Minuten angehalten. Anschließend wurde der Vorgang mit der nächsten Messlösung durchgeführt. Die Messlösungen wurden in folgender Reihenfolge zugegeben: LF1, LF2, LF3, LF4, LF3, LF2, LF1, LF4.

5.6 Messung des Stromverbrauchs

Während des gesamten Experiments wurde die Impedanz kontinuierlich mit der entwickelten Elektronik gemessen. Auch die pH- und die Sauerstoff-Messelektronik blieben während des gesamten Experiments aktiv. Die Messwerte dieser beiden Sensoren wurden nicht evaluiert.

5.6 Messung des Stromverbrauchs

Die Messung des Stromverbrauchs erfolgte mit einem Multimeter (VA18B der Firma V&A Instrument), das zwischen der 6 V-Spannungsquelle und dem Hauptmodul der Messelektronik in Reihe geschaltet und im Messbereich Milliampere mit einer Nachkommastelle betrieben wurde.

Während der Messung wurde eine mit PBS befüllte eMTP in das System eingesetzt und alle Module der Messelektronik aktiviert. Bei einer weiteren Messung wurde das Impedanzmodul deaktiviert, um den Stromverbrauch der übrigen Module isoliert zu bestimmen.

5.7 Untersuchung der Sensorinterferenzen bei multiparametrischer Messung

Im Abschnitt 4.1.2 des Theorieteils wurde bereits gezeigt, dass vor allem amperometrische Sensoren zu Sensorinterferenzen beitragen können. Im Folgenden sollen Interferenzen untersucht werden, die durch die amperometrischen Sensoren der eMTP (Impedanzmessung und Sauerstoffsensoren) entstehen können.

Die beiden Sensoren wurden separat untersucht, da sie grundlegend unterschiedliche Interferenzmechanismen besitzen. Bei der Impedanzmessung wird die Messzelle von einem reinen Wechselstrom ohne Gleichanteil durchströmt. Aus diesem Grund ist die Störung des Gleichanteils des Potentials der übrigen Sensoren unwahrscheinlich. Bei der AD-Wandlung dieser Sensoren kann es durch die Abtastung des zeitkontinuierlichen Systems zu einem Problem kommen, wenn das Messsignal von einem Wechselanteil überlagert wird. Aliasing-Effekte können bei Nichteinhaltung des Nyquist-Shannon-Abtasttheorem auftreten und so einen Messfehler verursachen.

Die amperometrische Messung des Sauerstoffs bewirkt einen Gleichstrom, der die übrigen Sensoren durch den iR -Fehler direkt beeinflussen kann. Wird der amperometrische Sensor mit einem Messprotokoll betrieben, das wechselnde Potentiale zur Polarisierung der Arbeitselektrode vorsieht (vgl. Abschnitt 3.6.2.4), kann es durch die Umladung der

Doppelschichtkapazität zu noch höheren Stromspitzen kommen. Aus diesem Grund muss die Umpolarisierung der Arbeitselektrode als kritischer Vorgang untersucht werden.

Zur Durchführung der Versuche wurde die Firmware der Messelektronik derart modifiziert, dass entweder die Impedanzmessung oder die Sauerstoffmessung periodisch an- und abgeschaltet wurde. Die Schaltvorgänge erfolgten im Abstand von 200 Sekunden, was 20 Messpunkten entspricht. Die übrigen Parameter wurden ohne weitere Modifikationen aufgezeichnet und bei der Auswertung des Experiments auf Auffälligkeiten untersucht.

Ein Multiplexer verbindet das Impedanzmodul sequenziell mit den 24 Arbeitselektroden. Durch das Umschalten des Multiplexers auf einen ungenutzten Kanal wurde die Impedanzmessung temporär unterbrochen.

Bei der Sauerstoffmessung wurde die Arbeitselektrode im normalen Messbetrieb mit einem Potential von -0,5 V, bezogen auf die Silberchlorid-Referenzelektrode, polarisiert. Zur Unterbrechung der Sauerstoffmessung wurde die Polarisationsspannung auf 0 V erhöht.

Die Versuche wurden jeweils mit neuen eMTP durchgeführt, die mit einer 50 mmol Kaliumchlorid-Lösung befüllt und wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, hergestellt wurden. Für die Untersuchung des Sauerstoffsensors wurden beide Varianten der eMTP eingesetzt, da sich die Größe der Elektroden hier deutlich unterscheidet. Für die Impedanzmessung wurde die eMTP mit Folienboden verwendet. Vor jeder Messung wurde mit der unveränderten Version der Firmware geprüft, ob die Sensoren plausible Werte liefern. Sensoren, bei denen dies nicht der Fall war, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

5.8 Zellkulturversuche

Mit den Zellkulturversuchen wurde die Eignung der eMTP zur Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate, des zellulären Sauerstoffverbrauchs und der Zell-zu-Substrat-Haftung untersucht. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob durch die hohe Sensitivität des Systems auch sehr geringe metabolische Raten zuverlässig gemessen werden können und ob dadurch eine Verkürzung des Pipettierzyklus ermöglicht wird.

Zur Durchführung der Versuche wurde eine eMTP auf Folienbasis eingesetzt. Die Herstellung der eMTP mit der Sensorik erfolgte nach den Beschreibungen in Abschnitt 4.3. Die Referenzelektroden wurden mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 bedeckt. Die pH-Sensoren auf der linken (Kavität Nr.: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21 bzw. Spalte 1, 2, 3) und rechten

5.8 Zellkulturversuche

(Kavität Nr.: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24 bzw. Spalte 4, 5, 6) Seite der eMTP wurden wie folgt unterschiedlich behandelt:

Auf der linken Seite wurde Iridiumoxid auf einem der Mikroelektrodenarrays und auf einer großen Kreiselektrode abgeschieden (vgl. Abbildung 50). Die große Kreiselektrode wurde nach der Abscheidung mit Hydromed™ D4 bedeckt, auf der rechten Seite wurde sie lediglich mit Iridiumoxid beschichtet. Die Goldoberflächen der Mikroelektroden blieben auf der rechten Seite ohne Beschichtung. Die Mikroelektrodenarrays werden im Folgenden als **pH-Sensor** und die großen Kreiselektroden als **Referenzsensor** bezeichnet.

L929 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 6×10^5 Zellen pro Kavität in jede der 24 Kavitäten ausgesät und 24 Stunden lang vorinkubiert. Nach der Entnahme der eMTP aus dem Inkubator wurde sie mit dem Deckel und den integrierten Verdrängungskörpern (vgl. Abschnitt 3.5.6.5 und Abbildung 23) verschlossen und in das Testsystem eingelegt. Durch den Verdrängungskörper kann die Hauptkammer nicht mehr direkt mit Medium befüllt werden. Aus diesem Grund erfolgte der Austausch des Zellkulturmediums, indem frisches Medium zuerst in die linke Nebenkammer pipettiert und anschließend altes Medium aus der rechten Nebenkammer abgesaugt wurde (vgl. Abschnitt 3.5.6.5).

Ein Pipettierroboter (Precision PRC384 der Firma Biotek) mit 200 µl Pipetten (Typ 986-261 der Firma Molecular BioProdukt, Inc) wurde verwendet, um das Zellkulturmedium periodisch auszutauschen. Hierzu nahm der Pipettierroboter 100 µl Medium aus einem Vorratsbehälter auf und befüllte damit die linke Nebenkammer der eMTP. Danach wurden 100 µl des alten Mediums aus der rechten Nebenkammer abgesaugt und in ein Abfallgefäß gegeben. Der Roboter wurde mit vier Pipettenspitzen bestückt und konnte so vier Kavitäten (dies entspricht einer Spalte) der Platte simultan bearbeiten.

In den Vorratsbehältern wurden zwei Arten von Medium bereitgestellt. Medium A basiert als normales Messmedium auf Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zugabe von 5 % fetalem Kälberserum und 50 µg/ml Gentamicin, jedoch ohne den pH-Puffer Natriumhydrogencarbonat. Medium B wird zum Abtöten der Zellen am Ende des Versuchs eingesetzt und besteht aus Medium A mit Zugabe von 0,2 % Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich). Beide Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen angemischt und in autoklavierte Vorratsbehälter abgefüllt. Diese wurden mit Alufolie verschlossen, um Verdunsten und Kontamination des Mediums zu verhindern. Das Testsystem wurde in einem auf 37 °C beheizten Inkubator ohne CO₂-Begasung betrieben.

Kapitel 5: Aufbau und Durchführung von Versuchen

Insgesamt wurde das Experiment in fünf Phasen unterteilt. In den Phasen 1 bis 4 wurde ausschließlich das für die Zellen unschädliche Medium A verwendet. Die Phasen werden im Folgenden detailliert beschrieben:

Phase 1: Zu Beginn des Experiments wurde das gepufferte Zellkulturmedium, das zur Vorinkubation verwendet wurde, durch das ungepufferte Messmedium (Medium A) ersetzt. Wie bereits beschrieben, wurde das Medium siebenmal mit dem Pipettierroboter ausgetauscht. Die Pausen zwischen den Pipettiervorgängen dauerten 240 Sekunden. Gleichzeitig diente diese Phase dazu, die eMTP auf die Temperatur des Inkubators aufzuwärmen. Insgesamt dauerte die erste Phase circa 45 Minuten.

Phase 2: In dieser Phase beginnt die eigentliche Messung. Der Pipettierroboter wurde wie in der ersten Phase betrieben, sodass das Medium weiterhin alle 240 Sekunden ausgetauscht wurde. Die Dauer der Phase betrug circa 45 Minuten.

Phase 3: Das Intervall des Mediaustausches wurde in der dritten Phase von 240 Sekunden auf 120 Sekunden reduziert. Diese Phase wurde für circa 60 Minuten fortgeführt.

Phase 4: Das Intervall von 120 Sekunden wurde in dieser Phase beibehalten. Die rechte Seite (Spalten 4, 5 und 6) wurde dabei vom Mediaustausch ausgeschlossen. Diese Phase dauerte 45 Minuten.

Phase 5: Das Pipettierintervall von 120 Sekunden wurde weiterhin beibehalten. Der Mediaustausch wurde nun wieder bei allen sechs Spalten vorgenommen. Nach 10 Minuten wurde statt des bisher verwendeten Mediums A das zytotoxische Medium B eingesetzt. Medium B wurde für alle weiteren Pipettiervorgänge verwendet. Nach 20 Minuten wurde der Pipettierroboter für 10 Minuten gestoppt, um anschließend weitere 20 Minuten lang Medium B in alle Zellkulturkammern zu pipettieren.

Nach Abschluss der 5. Phase wurden die Messung gestoppt und der Versuch beendet.

6 VERSUCHSERGEBNISSE

6.1 Untersuchung der Isolationsschicht

6.1.1 Vorversuche

Neben den in Abschnitt 5.1 beschriebenen Versuchen wurden zahlreiche Vorversuche mit SU-8 2000 und SU-8 3000 ohne die Vorbehandlung des Wafers mit Peroxomonoschwefelsäure durchgeführt. Dabei konnte vor allem bei SU-8 2000 beobachtet werden, dass der Kontakt mit wässrigem Medium zu einem raschen Ablösen der Isolationsschicht vom Wafer führt. SU-8 3000 zeigte zwar bessere Hafteigenschaften, doch die gemessenen Leckströme waren nicht reproduzierbar. Erst die Vorbehandlung des Wafers mit Peroxomonoschwefelsäure ermöglichte die Herstellung einer reproduzierbaren Isolationsschicht in Kombination mit SU-8 3000.

6.1.2 Isolation mit SU-8 3000

Durch das in Abschnitt 4.3.4 beschriebene Verfahren wurde eine ausreichend gute Haftung von SU-8 3000 auf Substrat und Metallisierung gewährleistet. Erst durch die verbesserte Haftung der Isolationsschicht wurden reproduzierbare Messungen des Leckstroms durch die Isolationsschicht ermöglicht.

Abbildung 67 zeigt den Verlauf des Leckstroms über einen Zeitraum von zehn Tagen. Während dieser Messung wurde das Verdunsten des Elektrolyten durch regelmäßiges Zugeben von destilliertem Wasser ausgeglichen.

Die Messung zeigt, dass der Leckstrom anfangs sehr gering ist und stetig steigt, je länger die Isolation mit dem Elektrolyten in Kontakt steht. Eine klare Abhängigkeit zwischen der Fläche der abgedeckten Metallisierung und dem Leckstrom ist gegeben. Das Verdunsten sowie das Zugeben von destilliertem Wasser spiegeln sich in einem steigenden bzw. fallenden Leckstrom wider. Bei der Zugabe von destilliertem Wasser fällt der Leckstrom langsam über einen Zeitraum von etwa 20 Stunden ab. Dies zeigt, dass nicht die Änderung der Leitfähigkeit der Messlösung ausschlaggebend ist, sondern dass es zu einer Veränderung in der Isolationsschicht kommt.

Ein ähnliches Verhalten sämtlicher Messelektroden deutet darauf hin, dass der Leckstrom gleichmäßig und definiert durch die Isolationsschicht fließt. Es gibt keine Anzeichen für einen punktuellen Durchschlag. Wiederholungsversuche mit getrocknetem Substrat zeigen, dass der Effekt teilweise reversibel ist.

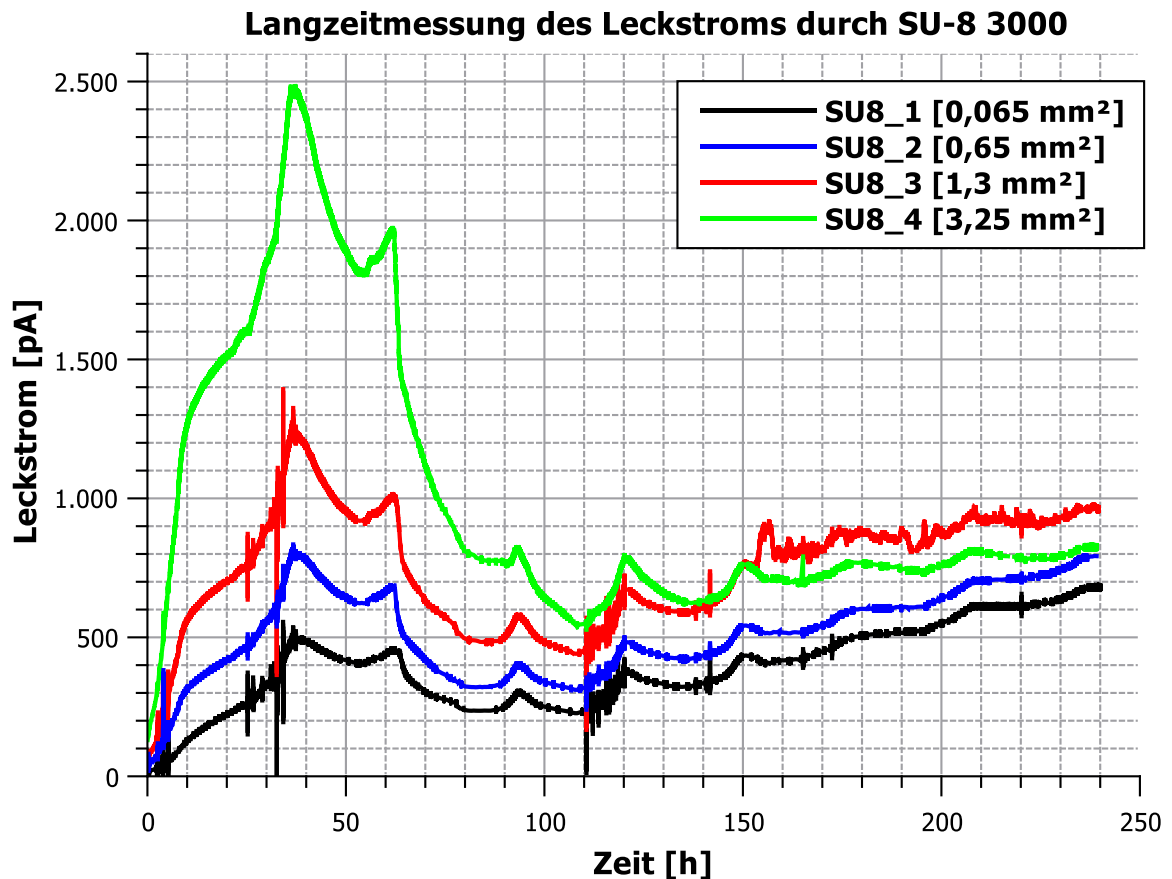


Abbildung 67: Die Höhe des gemessenen Leckstroms korreliert mit der Fläche der Metallisierung. Bedingt durch die Verdunstung des Elektrolyten erreicht der Messstrom nach etwa 30 Stunden seinen Höchstwert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Verdunstung durch Zugabe von destilliertem Wasser kompensiert.

Die ersten 25 Stunden des Experiments werden in Abbildung 68 im Detail gezeigt. Der Anstieg des Leckstroms verlangsamt sich nach acht Stunden und erreicht während dieser Zeit kein Plateau.

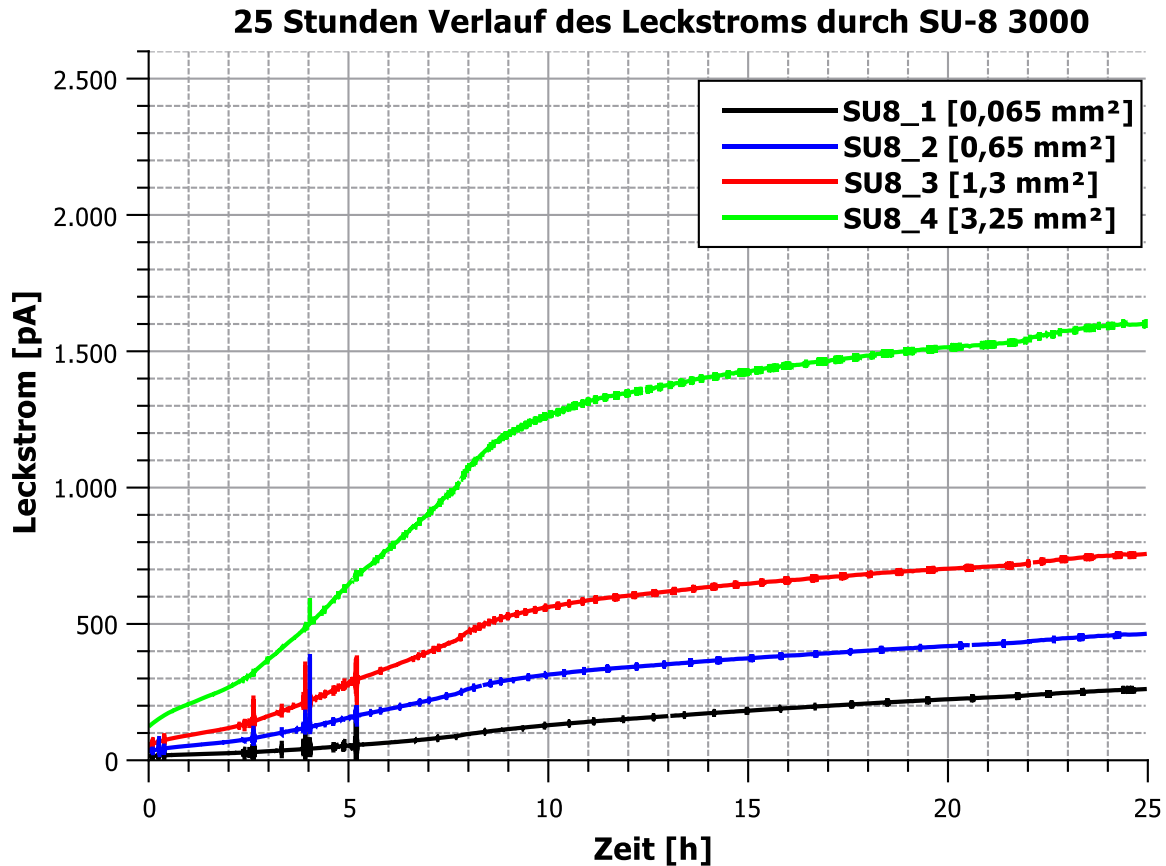


Abbildung 68: In den ersten zehn Stunden steigt der gemessene Strom durch die Isolierung schneller an als in den darauffolgenden 15 Stunden. Dieser Effekt ist bei den breiteren Strukturen ausgeprägter als bei den schmaleren. Der Leckstrom nimmt mit der Fläche der Metallisierung zu. Der Zusammenhang ist linear, wenn die kleinste Struktur (SU8_1) nicht berücksichtigt wird.

Der spezifische Widerstand lässt sich wie folgt berechnen:

$$\rho = R \frac{A}{l} = \frac{U}{I} \frac{A}{l} \quad (6.1)$$

U bezeichnet die angelegte Spannung, I den gemessenen Strom, A die Fläche der Metallisierung und l die Schichtdicke des SU-8 3000 Lacks.

Unter Annahme, dass $U = 2,5 \text{ V}$ und $l = 8 \text{ }\mu\text{m}$, werden in Tabelle 6-1 für den Zeitpunkt $t = 10 \text{ h}$ die spezifischen Widerstände der vier vermessenen Proben angegeben.

Probe	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
SU8_1	17×10^9
SU8_2	67×10^9
SU8_3	74×10^9
SU8_4	79×10^9

Tabelle 6-1: Spezifischer Widerstand der SU8 Proben nach zehnstündiger Exposition

6.1.3 Isolation mit NPR-80

Die Langzeitmessung mit Proben des NPR-80 Lötstop-Lacks wird in Abbildung 69 dargestellt. Innerhalb der ersten zwei Tage ist der Verlauf der drei Proben ähnlich. Lediglich die absolute Größe des Leckstroms variiert zwischen den Proben. Dies wird in Abbildung 70 für die ersten 25 Stunden im Detail dargestellt.

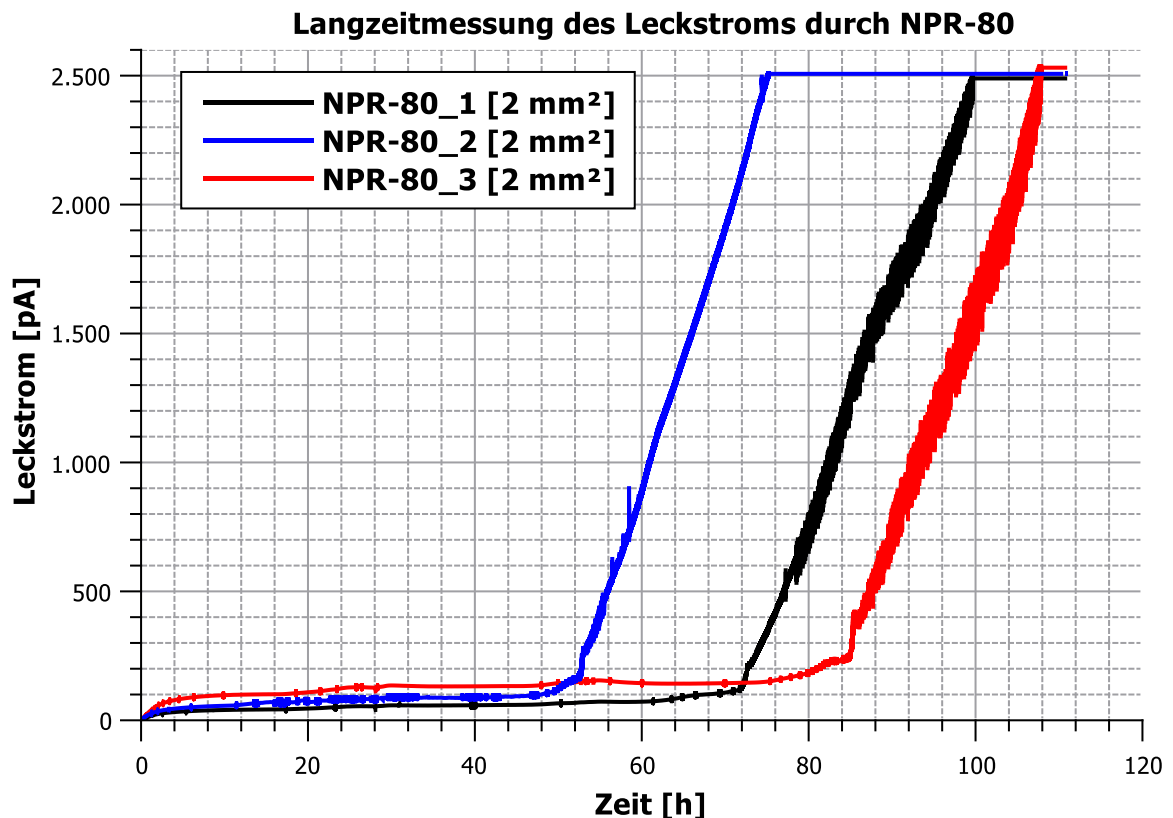


Abbildung 69: NPR-80 hat im Vergleich zu SU-8 3000 anfangs einen wesentlich geringeren Leckstrom. Im weiteren Verlauf der Messung kommt es zu einer zufällig einsetzenden Erhöhung des gemessenen Stroms. Der Leckstrom erhöht sich dabei mit einer konstanten Steigung, bis das Ende des Messbereichs des Picoamperemeters erreicht ist.

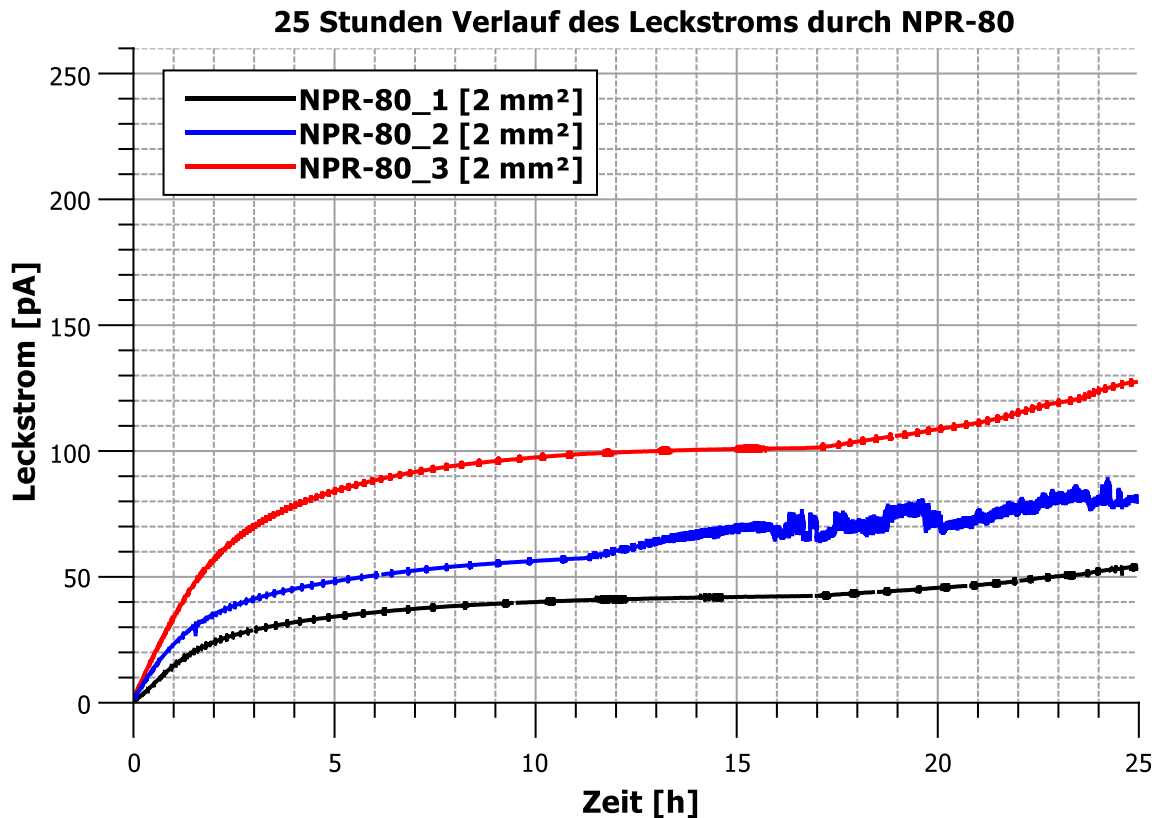


Abbildung 70: Die abgebildeten Kurven stellen den Verlauf des Leckstroms der vermessenen Probe dar. Qualitativ zeigen die Kurven den gleichen Verlauf. Die Höhe des gemessenen Stromes unterscheidet sich zwischen den drei Proben jedoch wesentlich, obwohl die Geometrie der Metallisierungen die gleiche ist.

Nach den ersten Tagen kommt es zu einer spontan einsetzenden Erhöhung des Leckstroms. Der Zeitpunkt des Einsetzens korreliert mit keinem der im Experiment erfassten Parameter. Obwohl alle Proben dieselbe Geometrie haben und mit denselben Parametern gefertigt wurden, weicht der Zeitpunkt, ab dem es zum Anstieg kommt, um bis zu 36 Stunden ab. Danach steigt die Stromstärke über die nächsten 20 Stunden kontinuierlich an, bis die obere Grenze des Messbereichs des Picoamperemeters erreicht wird. Bei Trocknung und erneuter Messung ist der Effekt nicht reversibel und der erhöhte Stromfluss stellt sich binnen einer Stunde voll ein.

Für die Charakterisierung der isolierenden Eigenschaften von NPR-80 wurde auch hier der spezifische Widerstand zum Zeitpunkt $t = 10$ h bestimmt. Hierfür wurde die Formel (6.1) verwendet. Die gemessene Schichtdicke l des Lacks beträgt dabei $25 \mu\text{m}$ und die angelegte Spannung $U = 2,5$ V. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 6-2.

Vergleicht man beide Isolationsmaterialien nach zehnstündiger Exposition, hat NPR-80 einen um mindestens 2,5-fach höheren spezifischen Widerstand als SU-8 3000. Die starken Schwankungen des spezifischen Widerstands beim NPR-80 trotz gleicher Geometrie sind durch

lokale Unregelmäßigkeiten der Schichtdicke zu erklären. Beim SU-8 3000 wurde eine gleichmäßige Schichtdicke durch das Aufbringen mittels Spin Coating über den ganzen Wafer sichergestellt. Bei Lötstopp-Lacken, wie dem eingesetzten NPR-80, kommen unpräzisere Verfahren, wie Siebdruck oder Spray Coating, zum Einsatz.

Probe	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
NPR-80_1	500×10^9
NPR-80_2	364×10^9
NPR-80_3	204×10^9

Tabelle 6-2: Spezifischer Widerstand der NPR-80 Proben nach zehn Stunden

6.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

6.2.1 Definition von Sensitivität und Streuung

Zur Bestimmung der Sensitivität wird der Mittelwert der gemessenen Ströme über den eingestellten Sauerstoffgehalt aufgetragen. Die Steigung der linearen Regressionsgerade wird als Sensitivität **S** definiert. Als Streuungsmaß σ wird die Standardabweichung verwendet.

Die erreichbare Genauigkeit **G** der Sensoren wird wie folgt definiert:

$$G = \frac{\sigma}{S} \quad (6.2)$$

Von der Auswertung der Experimente werden jeweils zwei Sensoren ausgeschlossen, die eine ungewöhnlich hohe Abweichung vom erwarteten Verhalten zeigen. Dies ist nötig, um die Verfälschung der Ergebnisse durch fehlerhafte Sensoren zu verhindern. Dadurch ergibt sich der Stichprobenumfang $n = 22$ sowohl für das Glassubstrat als auch für das Foliensubstrat.

6.2.2 Vergleich zwischen den Sauerstoffsensoren auf Glas- und Foliensubstrat

Die Sensoren auf Glas- und Foliensubstrat unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht wie dem Elektrodenmaterial, der Anzahl an Elektroden sowie dem Elektrodendurchmesser. Deswegen sind die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Sensorarten nicht ausschließlich auf die Wahl des Substrates zurückzuführen. Die Wahl des Substrates soll im folgenden Abschnitt vorrangig zur Benennung und Unterscheidung der beiden Sensorarten dienen.

6.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

Abbildung 71 stellt die Auswertung für das Glassubstrat dar. Die Sensitivität der Sensoren liegt im Mittel bei 1,0 nA pro Vol.-% Sauerstoff und die Standardabweichung zwischen 1,7 nA und 7,8 nA. Bei 25 Vol.-% Sauerstoff beträgt die Standardabweichung 6,6 nA.

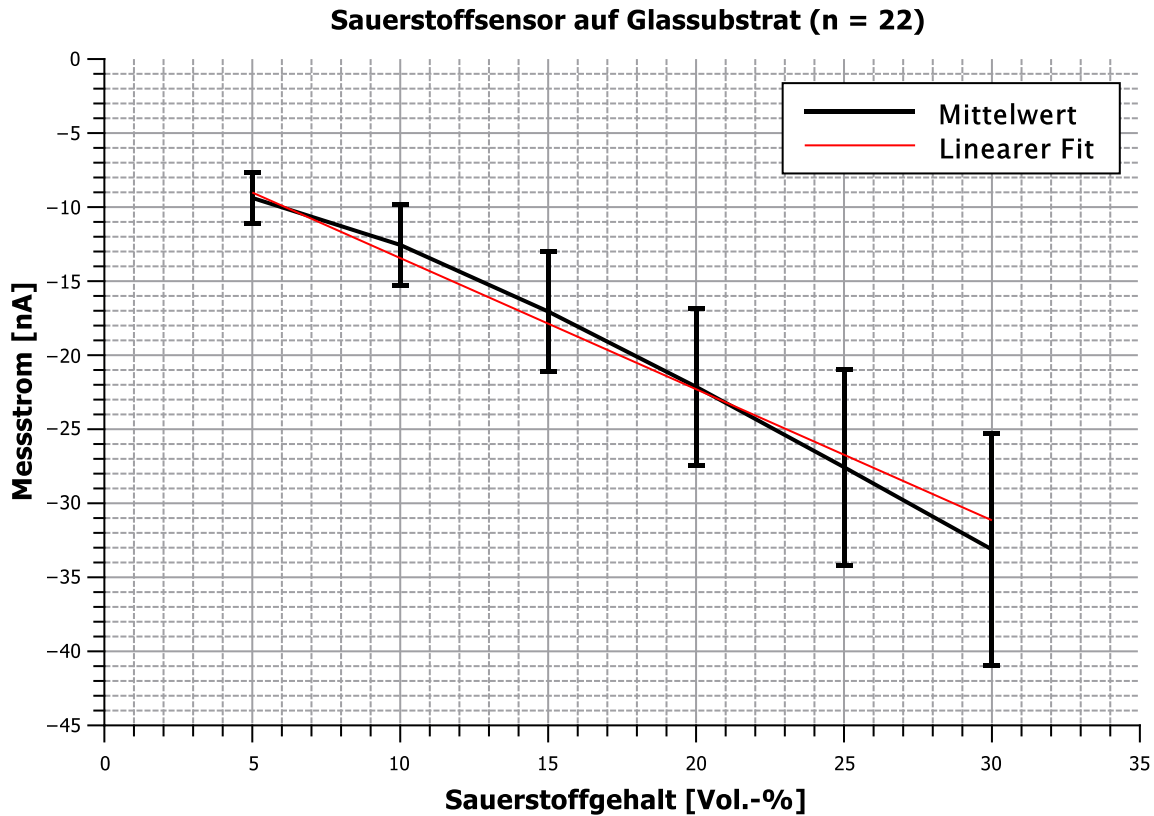


Abbildung 71: Bei der Messung des Sauerstoffgehalts mit Sensoren auf Glassubstrat ist eine hohe Streuung zwischen den 22 ausgewerteten Sensoren zu erkennen. Vor allem im Bereich niedriger Sauerstoffkonzentrationen weichen die Sensoren vom linearen Verhalten ab.

Die Sensitivität der Sensoren auf Foliensubstrat ist in Abbildung 72 aufgetragen und liegt im Mittel bei 8,0 nA pro Vol.-% Sauerstoff mit einer Standardabweichung zwischen 4 nA und 21 nA. Bei 25 Vol.-% Sauerstoff beträgt die Standardabweichung 12,2 nA.

Bei einem Sauerstoffgehalt von 25 Vol.-% errechnet sich die erreichbare Genauigkeit beim Glassubstrat zu 6,6 Vol.-% und bei dem Foliensubstrat zu 1,5 Vol.-%. Der Sauerstoffsensor auf Foliensubstrat ist in diesem Bereich also um Faktor 4 genauer als der Sensor auf Glassubstrat. Tabelle 6-3 fasst diese Ergebnisse zusammen.

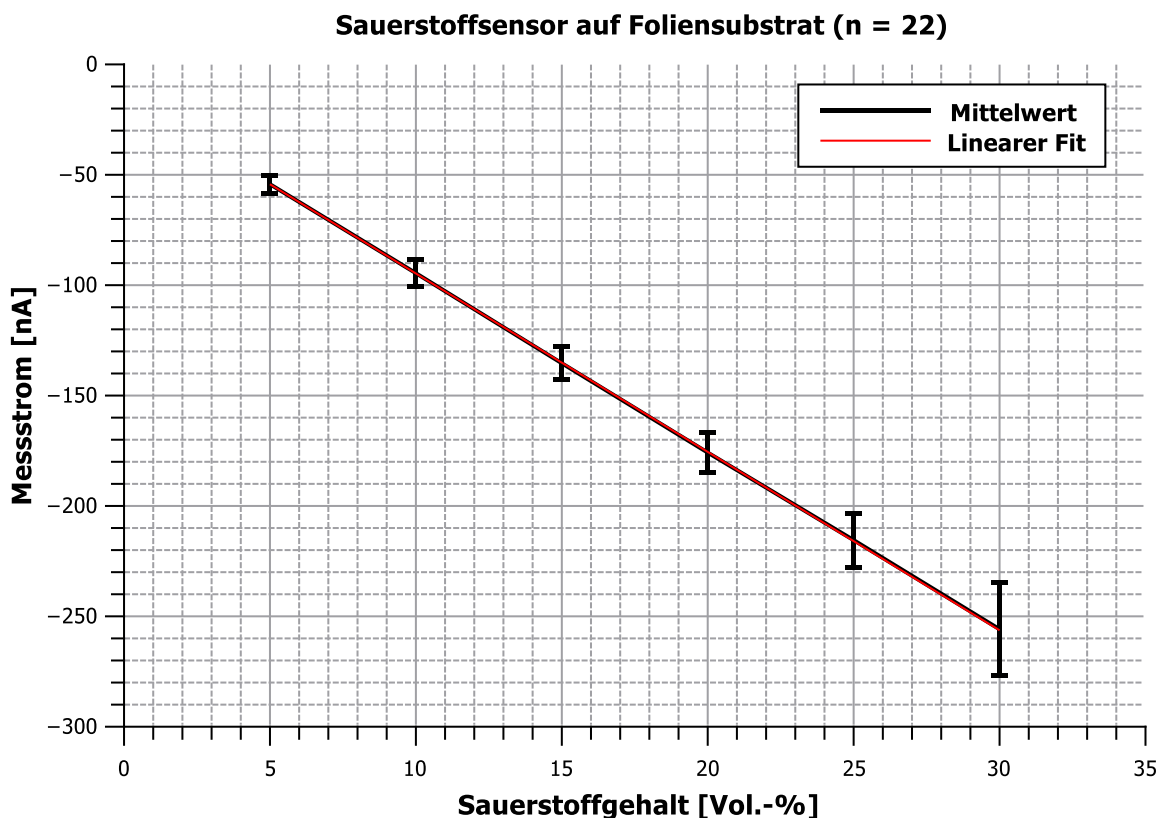


Abbildung 72: Die Sauerstoffsensoren auf dem Foliensubstrat zeigen eine geringe Streuung und verhalten sich über den gesamten Messbereich linear.

Substrat	S [nA/Vol.-%]	σ [nA] (bei 25 Vol.-% O ₂)	G [Vol.-%]
Glas	1,0	6,6	6,6
Folie	8,0	12,2	1,5

Tabelle 6-3: Vergleich von Sensitivität S, Streuungsmaß σ und Genauigkeit G (nach den Definitionen aus Abschnitt 6.2.1) für Sauerstoffsensoren auf Glas- und Foliensubstrat

Die Rohdaten der Messungen zeigen, dass im Fall der Sensoren auf Glassubstrat häufig Unstetigkeiten bzw. Sprünge im Messstrom erkennbar sind. Dies wird in Abbildung 73 anhand von drei exemplarisch ausgewählten Sensoren gezeigt. Die Sprünge treten ohne zeitlichen Zusammenhang an unterschiedlichen Sensoren auf. Ähnliche Effekte wurden in mehreren Messreihen beobachtet. Der Strom kann sich dabei verringern oder erhöhen. Im Gegensatz dazu treten bei den Foliensubstraten keine vergleichbaren Sprünge auf.

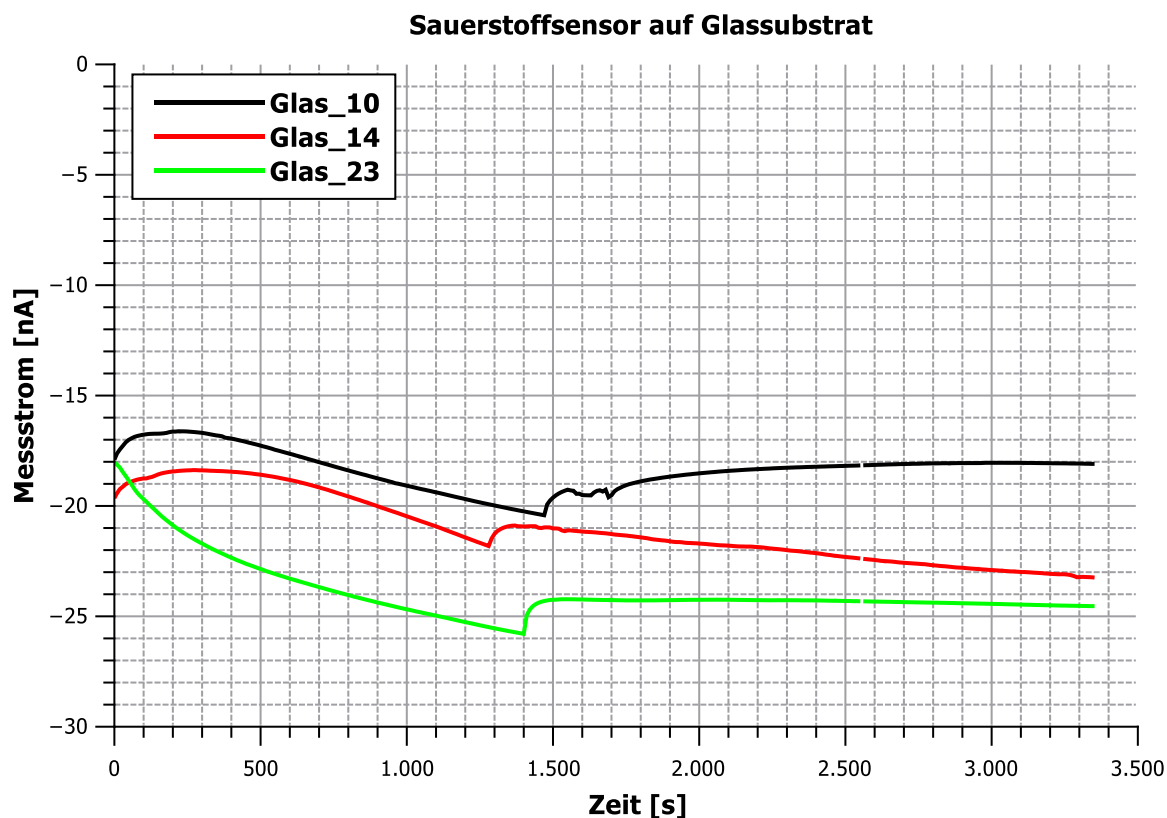


Abbildung 73: Bei der Analyse der Rohdaten der Sensoren auf Glassubstrat sind wiederkehrende Sprünge in den Stromverläufen zu beobachten. Die Sprünge entsprechen im Mittel einem Dreizehntel des Sensorstromes.

Eine genauere Analyse aller Messdaten zeigt, dass die Höhe der Sprünge im Mittel $\frac{1}{13}$ des Sensorstromes entspricht, der für die gemessene Sauerstoffkonzentration zu erwarten ist. Jeder Sauerstoffsensor ist ein Sensorarray bestehend aus 13 Mikroelektroden. Somit ist der Sprung im Messstrom mit der Aktivierung oder Deaktivierung einzelner Mikroelektroden zu erklären. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich Luftblasen für dieses Phänomen verantwortlich, da sie bereits bei der Abscheidung von Iridiumoxid auf dem Mikroelektrodenarray aufgetreten sind. Ob es sich um Luftblasen handelt, die während der Messung entstehen oder ob sich die Luftblasen bereits zu Beginn der Messung auf dem Sensor befinden, kann nicht abschließend geklärt werden.

6.2.3 Einfluss des Hydrogels Hydromed™ D4

Um den Einfluss des Hydrogels auf die Sauerstoffmessung zu untersuchen, wurde der Sauerstoffgehalt im Versuch zunächst stufenweise erhöht und danach stufenweise verringert. Für die Auswertung werden diese beiden Versuchsabschnitte separat betrachtet. Die Rohdaten

zum ersten Teil der Messung zeigen in Abbildung 74, wie sich der negative Messstrom bei steigendem Sauerstoffgehalt erhöht. Abbildung 75 zeigt die Messwerte des zweiten Teilabschnitts. Die Unstetigkeit des Messstromes nach circa 30 Minuten ist auf die Zugabe von destilliertem Wasser zurückzuführen. Ein Sensor aus der Gruppe der unbeschichteten Sensoren wird bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da er ein fehlerhaftes Verhalten zeigt.

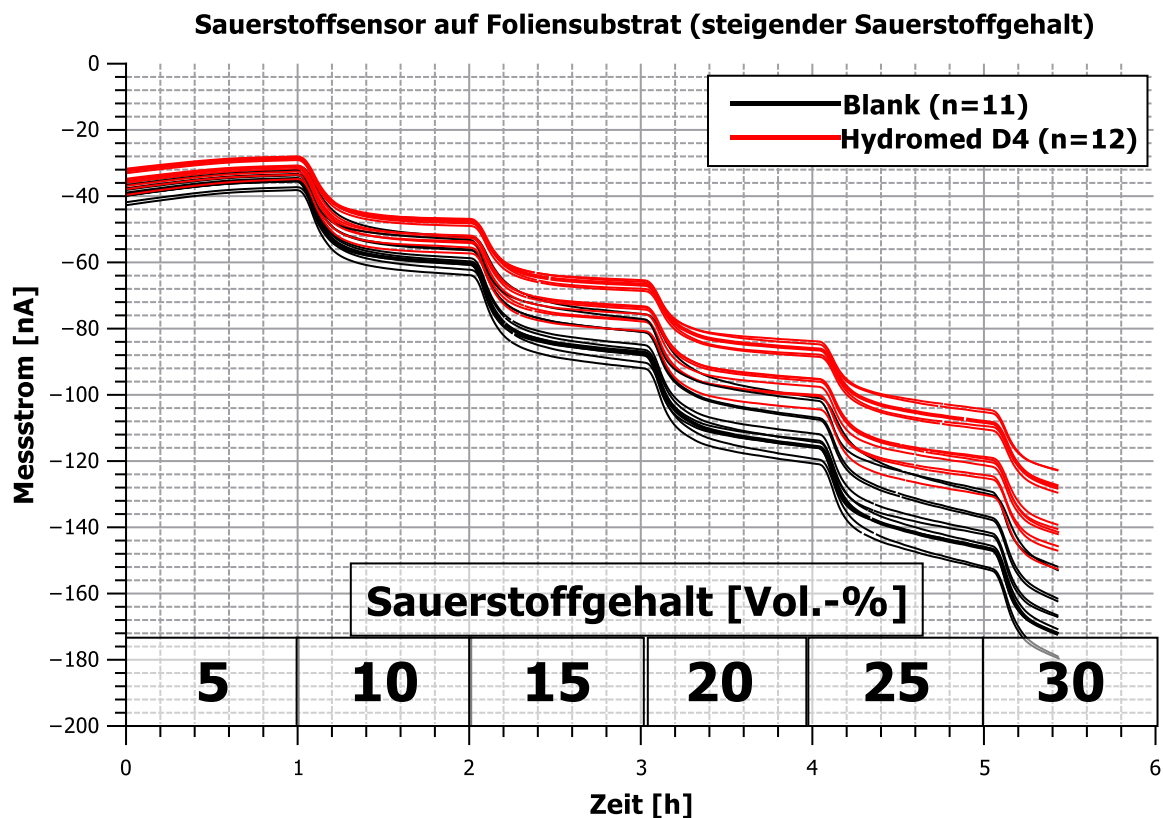


Abbildung 74: Die Strommessung der Sauerstoffsensoren auf Foliensubstrat zeigen bei steigendem Sauerstoffgehalt einen stufenartigen Anstieg des Stromes ohne erkennbare Ausreißer. Die mit Hydromed™ D4 beschichteten Elektroden (rot) liefern einen betragsmäßig kleineren Strom als die unbeschichteten Elektroden (schwarz).

Aus beiden Teilen des Versuchs ist zu erkennen, dass das Hydrogel einen Einfluss auf die Höhe des Sensorstroms hat. Die Reaktionszeit des Stroms nach der Sauerstoffänderung in der Kammer wird durch das Hydrogel nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass der Gasaustausch zwischen Messmedium und Gasphase sowie die Diffusion des Sauerstoffes im Messmedium die Zeitkonstante dominieren. Ob das Hydrogel die Ansprechzeit des Sauerstoffsensors verändert, kann mit diesem experimentellen Aufbau nicht bestimmt werden.

6.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

Analog zum Vorgehen in Abschnitt 6.2.1 werden der Messstrom gegen den Sauerstoffgehalt aufgetragen und die Standardabweichung berechnet. Abbildung 76 vergleicht den blanken Sensor mit dem mit Hydromed™ D4 beschichteten Sensor. Für diese Auswertung werden die Messdaten des zweiten Teilversuchs (fallender Sauerstoffgehalt) verwendet.

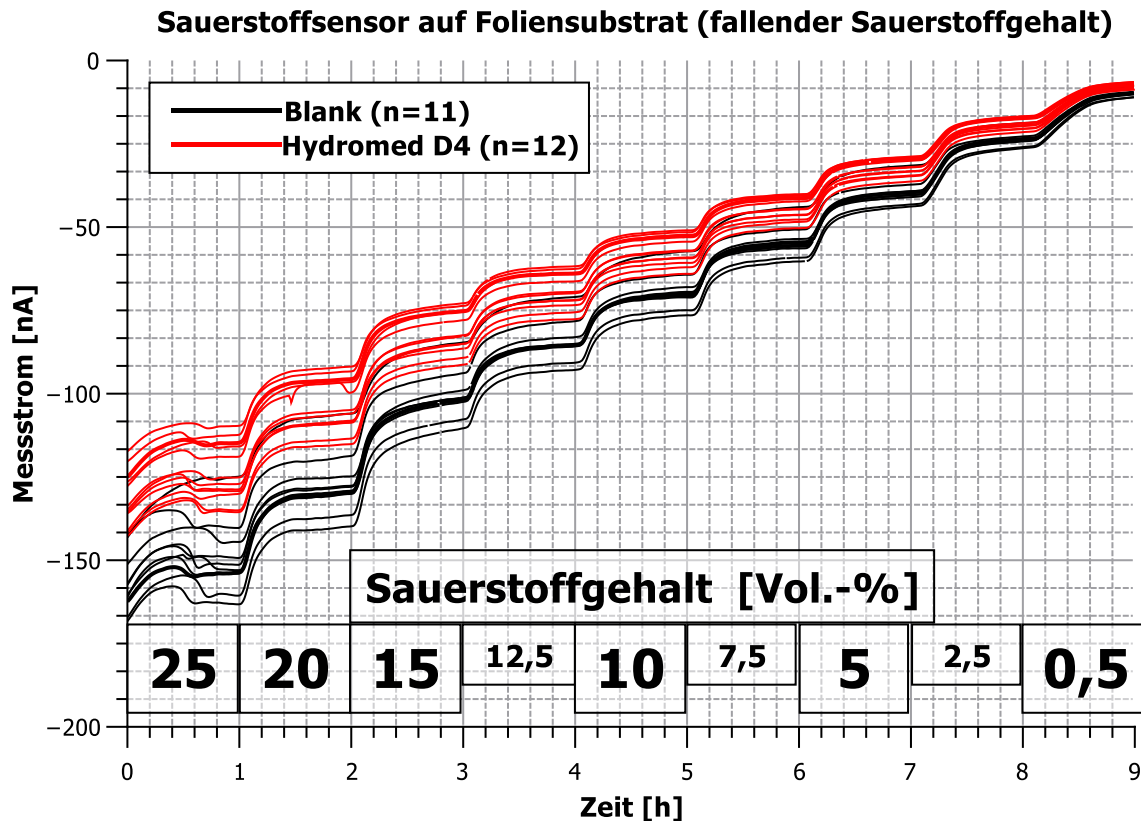


Abbildung 75: Bei abnehmender Sauerstoffkonzentration fällt der Messstrom stufenartig ab. Die Instabilitäten nach circa 30 Minuten sind durch die Zugabe des destillierten Wassers zu erklären. Die mit Hydromed™ D4 beschichteten Sensoren (rot) zeigen – wie im Versuch mit steigender Sauerstoffkonzentration – niedrigere Ströme als die unbeschichteten Sensoren (schwarz).

Abbildung 77 zeigt den Unterschied zwischen den beiden Teilversuchen am blanken und Abbildung 78 am beschichteten Sensor. Im zweiten Teilversuch (abfallender Sauerstoffgehalt) ist der Stromfluss beim selben Sauerstoffgehalt tendenziell höher. Sowohl die Zugabe des destillierten Wassers als auch Veränderungen des Sensors über die Zeit kommen als mögliche Ursachen für dieses Verhalten in Frage.

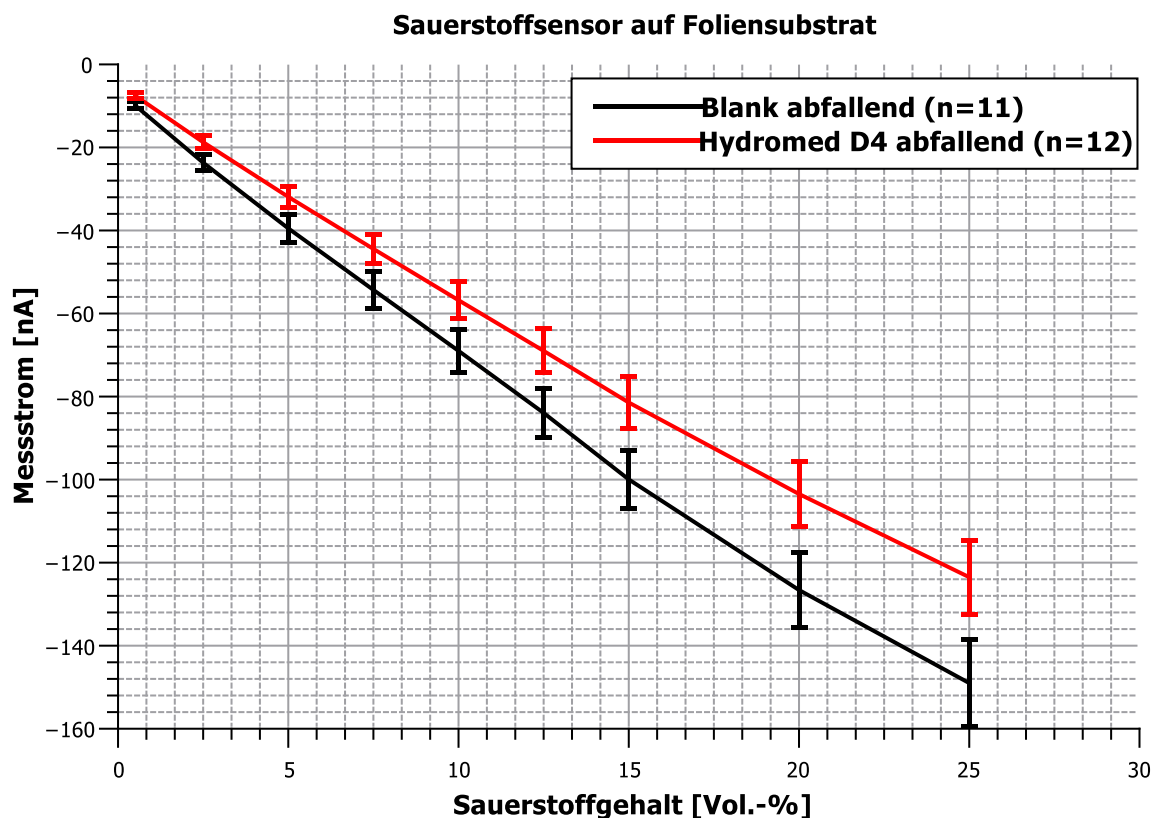


Abbildung 76: Der Messstrom durch den Sauerstoffsensoren unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob die Messelektrode mit Hydromed™ D4 bedeckt wurde (rot) oder nicht (schwarz). Die Standardabweichungen der beiden Gruppen verhalten sich ähnlich. Die Auswertung basiert auf den Rohdaten des zweiten Teilversuchs.

Die mittlere Sensitivität, die Standardabweichung sowie die nach Formel (6.2) berechnete Genauigkeit wird in Tabelle 6-4 für beide Sensorvarianten zusammengefasst. Die Sensitivität des beschichteten Sensors ist etwas geringer als die des blanken Sensors.

Beschichtung	Teilversuch	S [nA/Vol.-%]	σ [nA] (bei 25 Vol.-% O ₂)	G [Vol.-%]
Blank	abfallend	6,1	10,5	1,7
Hydromed™ D4	abfallend	5,0	8,9	1,78
Blank	aufsteigend	5,2	7,9	1,5
Hydromed™ D4	aufsteigend	4,2	8,5	2,0

Tabelle 6-4: Vergleich von Sensitivität S, Streuungsmaß σ und Genauigkeit G (nach den Definitionen aus Abschnitt 6.2.1) für beschichtete und blanke Sauerstoffsensoren

6.2 Messung des gelösten Sauerstoffs

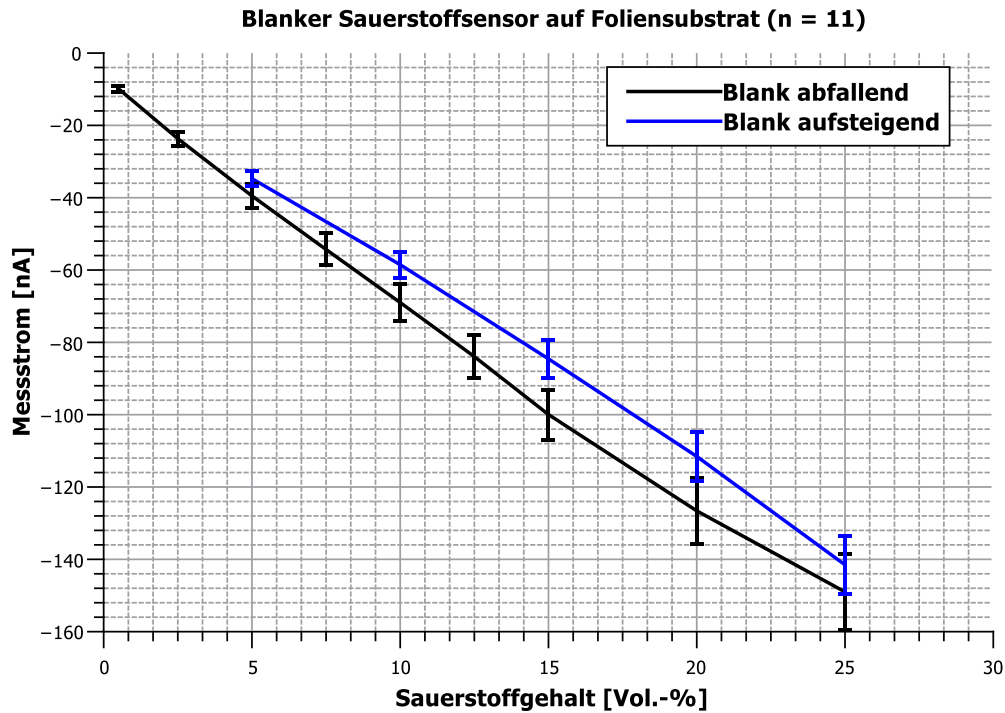


Abbildung 77: Der Graph zeigt den Vergleich zwischen dem ersten und dem zweiten Teilversuch für die unbeschichteten Sensoren. Im ersten Teilversuch (steigender Sauerstoffgehalt, blau) fließt bei gleichem Sauerstoffgehalt ein etwas geringerer Strom als beim zweiten Teilversuch (fallender Sauerstoffgehalt, schwarz).

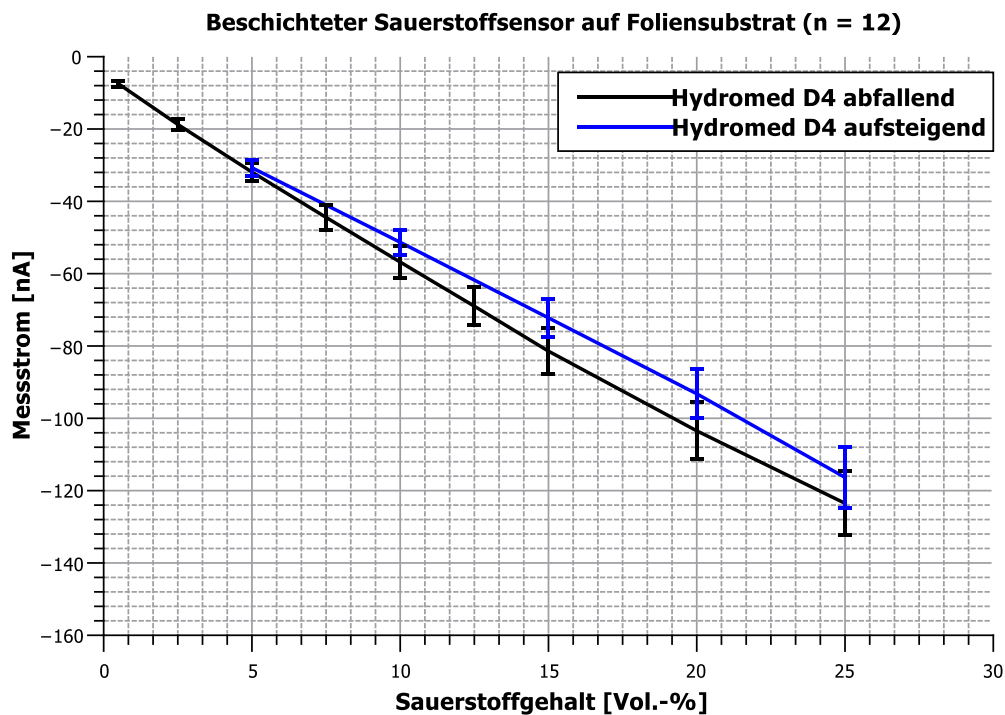


Abbildung 78: Auch die mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 beschichteten Sensoren zeigen bei gleichem Sauerstoffgehalt einen Anstieg des Stroms vom ersten Teilversuch (steigender Sauerstoffgehalt, blau) zum zweiten (fallender Sauerstoffgehalt, schwarz).

6.3 Messung des pH-Wertes

Das durchgeführte Experiment besteht aus vier Durchläufen. In jedem dieser Durchläufe werden vier Pufferlösungen (pH 7,05 – pH 7,10 – pH 7,15 – pH 7,20) sequenziell in die Messkammer gegeben. Abschnitt 5.3 beschreibt diesen Prozess im Detail.

Die Rohdaten zweier Durchläufe werden in Abbildung 79 exemplarisch für die Kavitäten Nr. 4 und Nr. 20 gezeigt. Auffallend sind die Spannungsausschläge während des Wechsels der Pufferlösungen. Die Höhe der Ausschläge beträgt 1-2 mV. Die Ursache liegt in der Temperaturabhängigkeit von potentiometrischen Sensoren. Da die neu eingefüllte Messlösung etwa 2 bis 3 Grad kälter ist und sich erst in der eMTP auf die Messtemperatur aufwärmt, kommt es zu Temperaturschwankungen, die beim potentiometrischen pH-Sensor zu den beobachteten Potentialschwankungen führen.

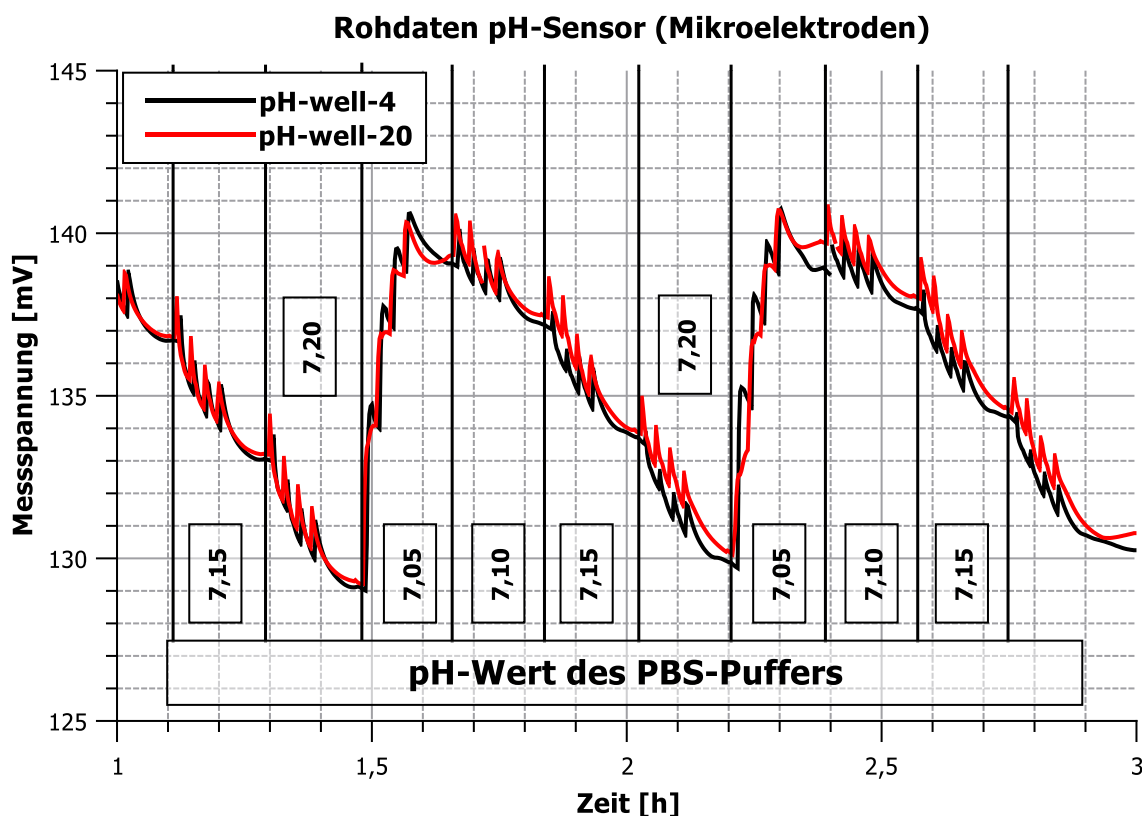


Abbildung 79: Die Rohdaten der pH-Messung zeigen, dass der Spannungsverlauf des Sensors mit dem pH-Wert des PBS-Puffers korreliert. Jeder Austausch des Messmediums durch den Pipettierroboter erzeugt einen Spannungssprung zwischen 1 und 2 mV.

Die Messdaten der pH-Sensoren Nr. 6, Nr. 17, Nr. 18 und Nr. 24 werden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie ganz oder teilweise durch Kleberreste bedeckt waren und dadurch ausgefallen sind.

6.3 Messung des pH-Wertes

Bei den folgenden Auswertungen werden, die mit Iridiumoxid beschichteten Mikroelektrodenarrays und die größeren Einzelelektroden, separat behandelt. Zuerst werden die Rohdaten bereinigt, indem die Zeitpunkte der Pufferwechsels aus den Messdaten entfernt werden. Das Resultat für die Mikroelektroden wird in Abbildung 80 gezeigt. Die absoluten Potentialniveaus der einzelnen Sensoren liegen bis zu 55 mV auseinander. Bei einer absoluten Messung kann dies einen Fehler von bis zu einer pH-Stufe bedeuten. Für die Messung von Ansäuerungsraten ist jedoch die relative pH-Änderung von Bedeutung. Eine gute Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Sensoren ist dann gegeben, wenn die Sensitivität der Sensoren möglichst gleich ist.

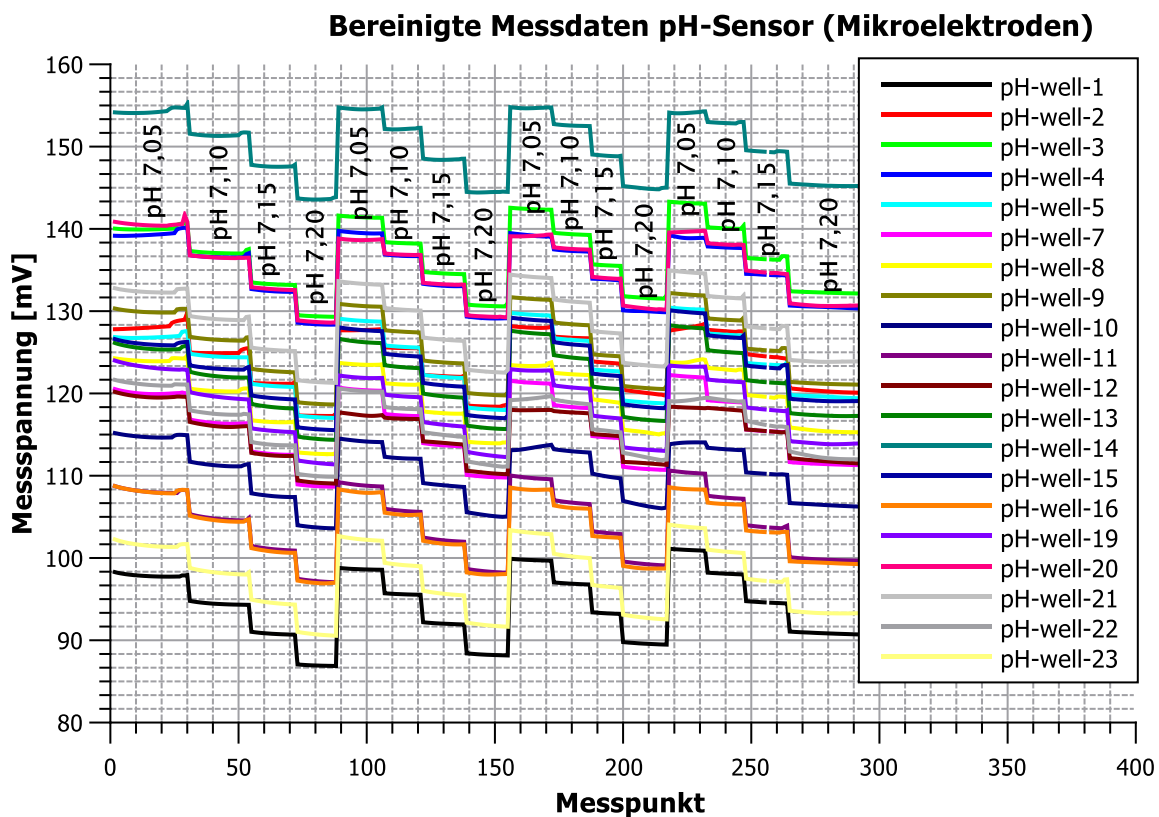


Abbildung 80: Für die bessere Gegenüberstellung des pH-sensitiven Verhaltens der untersuchten Messelektroden dient eine bereinigte Darstellung der Messdaten, aus der alle Artefakte entfernt wurden.

Um die Sensitivität jedes einzelnen pH-Sensors zu bestimmen, werden Zeitpunkte gewählt, die in der Mitte jedes Spannungsplateaus nach dem Pufferwechsel liegen und dem entsprechenden pH-Wert sowie dem Durchlauf zugeordnet werden.

Die Sensitivität jedes Sensors wird durch lineare Regression für jeden Durchlauf separat bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 81 aufgetragen. Die Auswertung des Graphen zeigt, dass die Sensoren in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. Die erste Gruppe besteht

aus den Sensoren der Spalten 1, 3, 5 und hat eine annähernd gleichbleibende Sensitivität. Die zweite Gruppe besteht aus den Sensoren der Spalten 2, 4, 6. Die Sensitivität dieser Sensoren nimmt mit der Zahl der Durchläufe tendenziell ab und unterscheidet sich von Sensor zu Sensor.

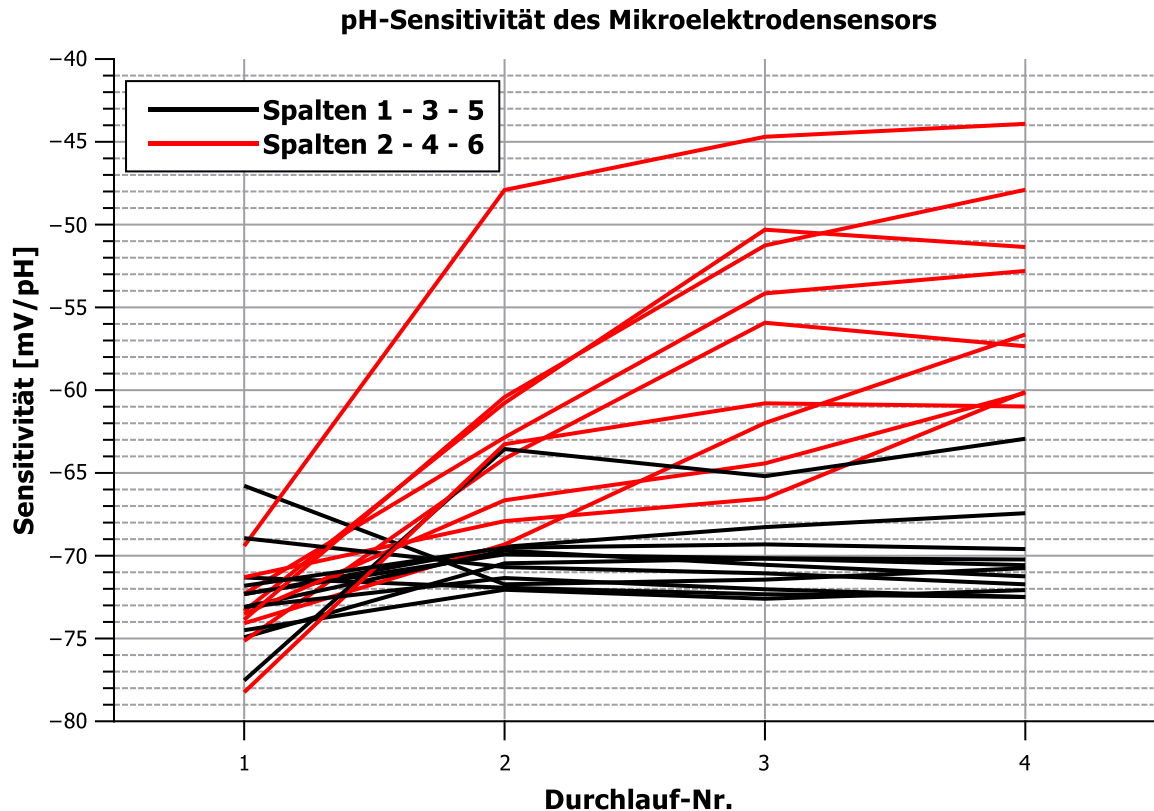


Abbildung 81: Die Bestimmung der Sensitivität der pH-Sensoren zeigt ein positionsabhängiges Phänomen. Während die Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) eine sehr konstante Sensitivität zeigten, verringerte sich die Sensitivität der Sensoren in den Spalten 2, 4 und 6 mit jedem Durchlauf.

Die statistische Auswertung dieser Daten wird in Abbildung 82 gezeigt und bestätigt das beschriebene Phänomen. Die Standardabweichung der ersten Gruppe liegt zwischen 2,1 und 3,1 mV. Die Standardabweichung der zweiten Gruppe ist mit Werten von 2,4 bis 7,3 mV wesentlich höher.

Die statistische Auswertung der größeren Einzelelektrode wird in Abbildung 83 dargestellt. Die Standardabweichung der ersten Gruppe liegt zwischen 3,4 und 7,3 mV, die der zweiten Gruppe zwischen 2,8 und 7,0 mV.

Die Ursache für dieses Phänomen konnte nachträglich in einer Fehlfunktion des Pipettierroboters gefunden werden: Bei den geradzahligen Reihen 2, 4, 6 wurde durch den Roboter immer etwas mehr Medium in die Kavität gegeben als nachträglich abgesaugt wurde. Dadurch wurde der pH-Puffer in diesen Reihen nicht komplett ausgetauscht.

6.3 Messung des pH-Wertes

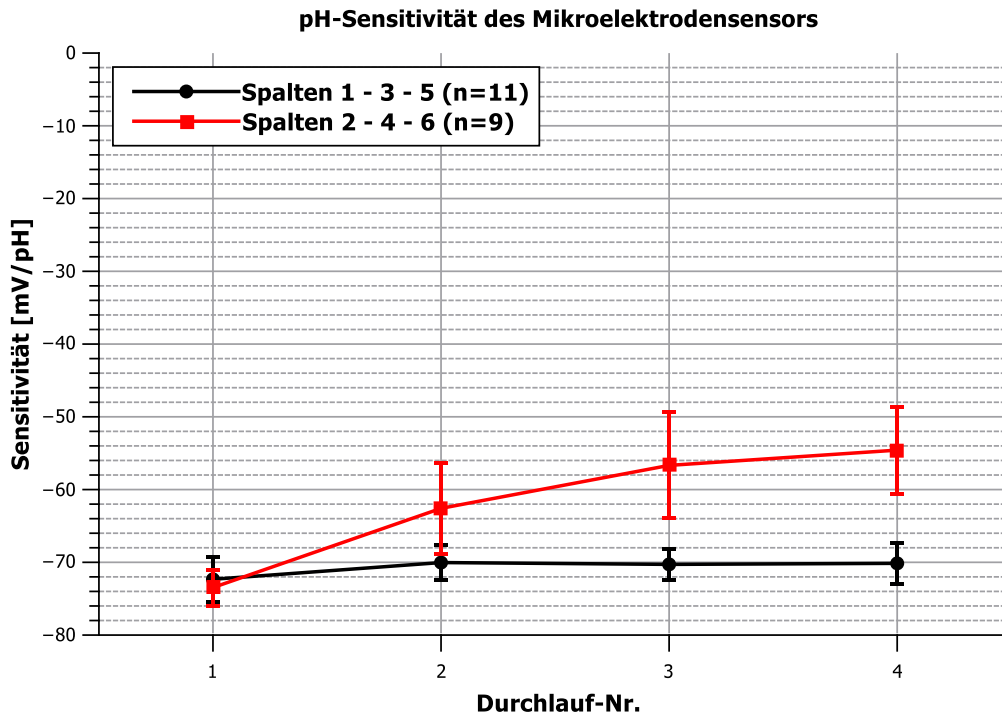


Abbildung 82: Während sich im ersten Durchlauf alle Sensoren ähnlich verhalten, verändern die Sensoren aus den Spalten 2, 4 und 6 (rot) ihre Sensitivität in den folgenden Durchläufen. Gleichzeitig nimmt die Standardabweichung der Sensitivität zu, während die Sensoren der Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) eine weitgehend konstante Sensitivität und Standardabweichung haben.

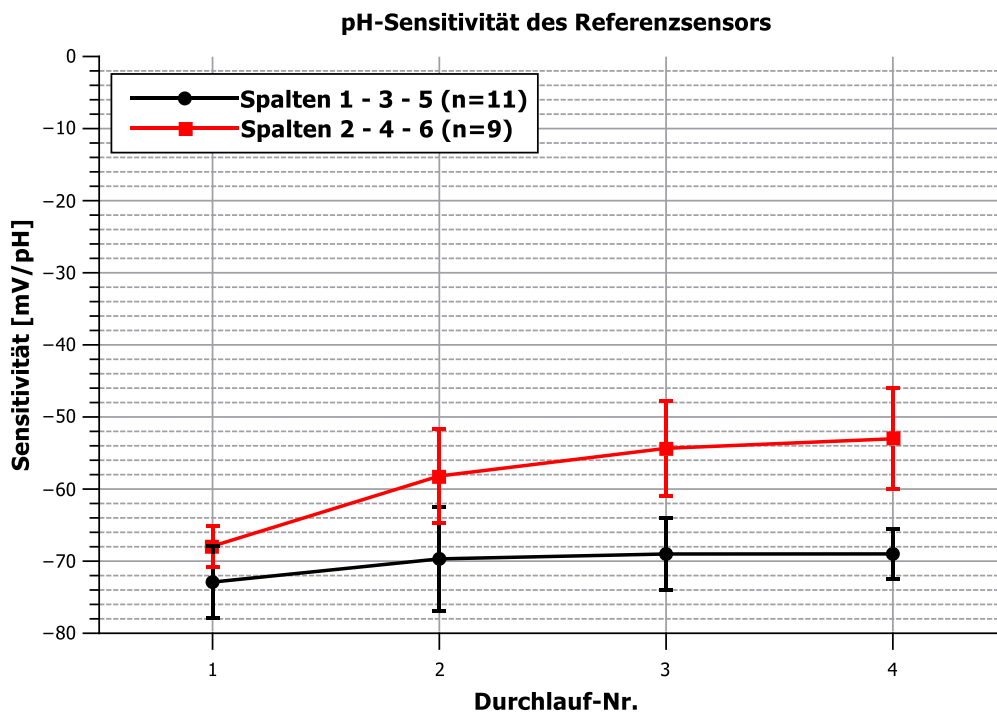


Abbildung 83: Die Sensitivität der Referenzsensoren in den Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) ist über die vier Durchläufe konstanter als bei den Referenzsensoren aus den Spalten 2, 4 und 6 (rot). Bei den Referenzsensoren sind, unabhängig von der Position des Sensors, stärkere Standardabweichungen zu beobachten.

6.4 Zytokompatibilität der Referenzelektrode

Die galvanische Beschichtung mit Silber resultiert in starken zytotoxischen Effekten auf der gesamten Zellkulturfläche, wenn das als toxisch identifizierte Silberbad nicht restlos von den Glas-Chips gespült wird. In diesem Fall ist es irrelevant, ob es sich um eine chlorierte oder mit pHEMA bedeckte Silberelektrode handelt.

Versilberte und anschließend chlorierte Elektroden zeigen bei korrekter Reinigung in unmittelbarer Nähe der Elektrode eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Wird die Elektrode zusätzlich mit dem Hydrogel pHEMA beschichtet, sind bei mikroskopischer Begutachtung wesentlich vitalere Zellen in der Nähe der Elektrode zu erkennen. Abbildung 84 zeigt den direkten Vergleich der beiden Varianten. Das Hydrogel selbst wird nicht von den Zellen überwachsen.

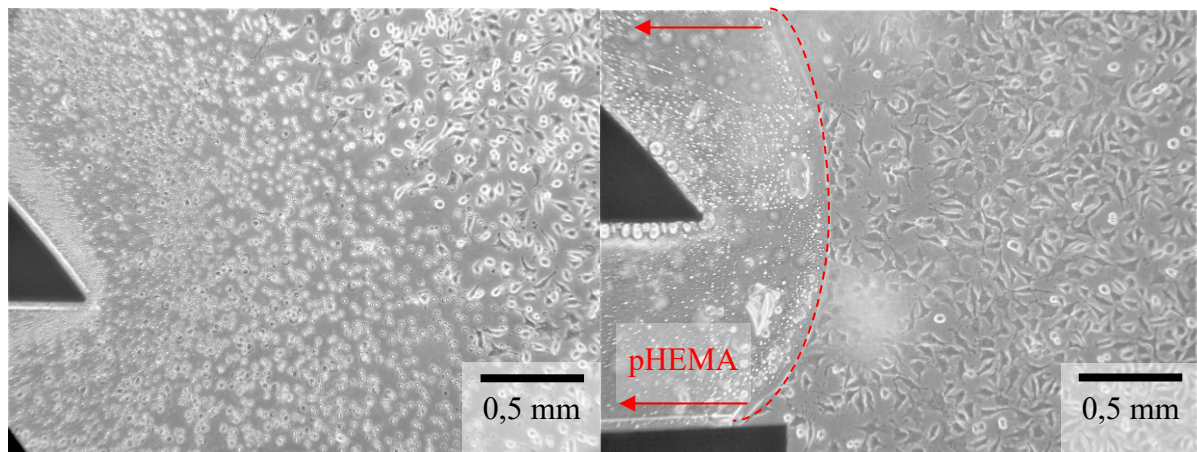


Abbildung 84: Elektrochemisch abgeschiedenes Silber mit anschließender Chlorierung wirkt sich negativ auf die Zellen in der Nähe der Elektrode aus (linkes Bild). Zellen, die sich näher als 1 mm an der Elektrode befinden, sind bereits abgestorben. Die restlichen Zellen auf dem Bild sind ebenfalls auffällig. Wird eine derartig hergestellte Silberchlorid-Elektrode mit pHEMA bedeckt, reduziert sich der toxische Effekt auf die Zellen deutlich (rechtes Bild). Der gesamte Bereich, in dem pHEMA aufgebracht ist, wird nicht von Zellen bewachsen.

Auch die silberchloridhaltige Paste ist in ihrer unmittelbaren Nähe zellschädigend. Wie auf der linken Seite von Abbildung 85 zu erkennen ist, haben sich die ersten drei bis fünf Zellreihen nach der Silberchlorid-Paste stark verändert oder sind abgestorben. Wird das Silberchlorid mit pHEMA abgedeckt, ist kein zytotoxischer Effekt erkennbar und die Zellen haben, wie in Abbildung 85 (rechts) gezeigt, auch am Rand normales Wachstum und unauffällige Morphologie.

6.5 Impedanzmessung

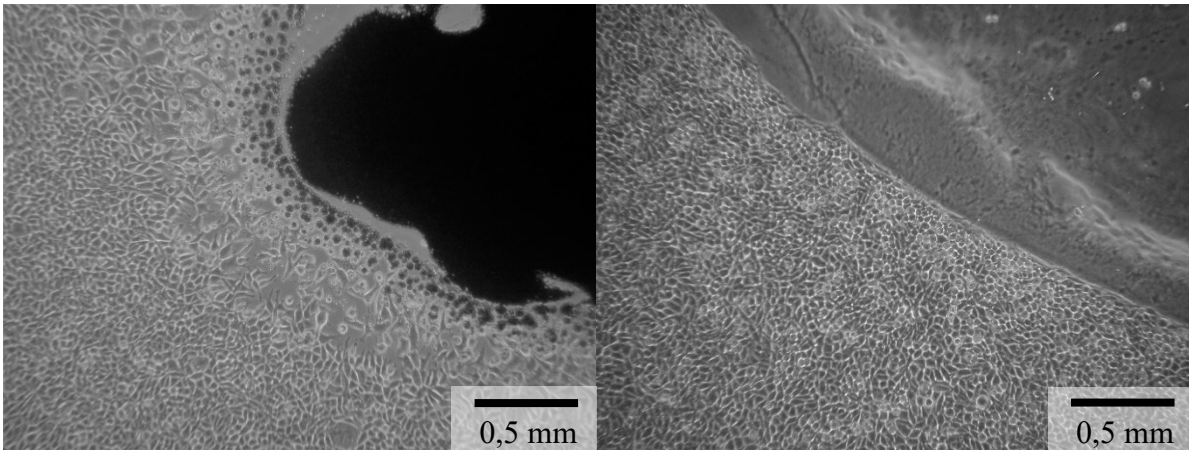


Abbildung 85: Die zytotoxische Wirkung der aufgetragenen silberchloridhaltigen Paste ist auf einen Abstand von etwa 0,5 mm zur Kante der Paste beschränkt (linkes Bild). Wird die Paste zusätzlich mit pHEMA bedeckt, sind die Zellen bis zum Rand der pHEMA-Schicht morphologisch unauffällig.

6.5 Impedanzmessung

Während des Experiments werden vier Messlösungen mit verschiedenen Leitfähigkeiten auf den Sensor gegeben. Mit Hilfe des Roboters wird das alte Medium bis auf einen geringen Rest aus den Kavitäten der eMTP abgesaugt. Diese Reste werden mit destilliertem Wasser ausgespült, um eine Verschleppung der alten Messlösung zu verhindern. Durch die geringe Leitfähigkeit des destillierten Wassers kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des Widerstands während der Spülvorgänge.

Aufgrund dieser Sprünge können die Rohdaten nicht sinnvoll dargestellt werden, wie Abbildung 86 exemplarisch für Kavität Nr. 5 zeigt. Der gemessene Betrag der Impedanz liegt bei eingefüllter Messlösung zwischen 50 Ω und 350 Ω . Während des Spülens erreicht der Betrag der Impedanz Werte bis zu 30 k Ω .

Zur besseren Visualisierung und Auswertung der Messungen wurden jeweils die letzten 30 Messpunkte vor Beginn des nächsten Spülzyklus ausgewählt und alle übrigen Messpunkte aus dem Graphen entfernt. Dies entspricht einem Zeitraum von fünf Minuten, in dem der Spülvorgang keine direkte Auswirkung auf die Messdaten zeigt. Drei der vierundzwanzig Sensoren (1, 18 und 22) werden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie der Hersteller der Folien als fehlerhaft markiert hat. Die bereinigten Messdaten werden für alle funktionsfähigen Impedanzsensoren in Abbildung 87 dargestellt.

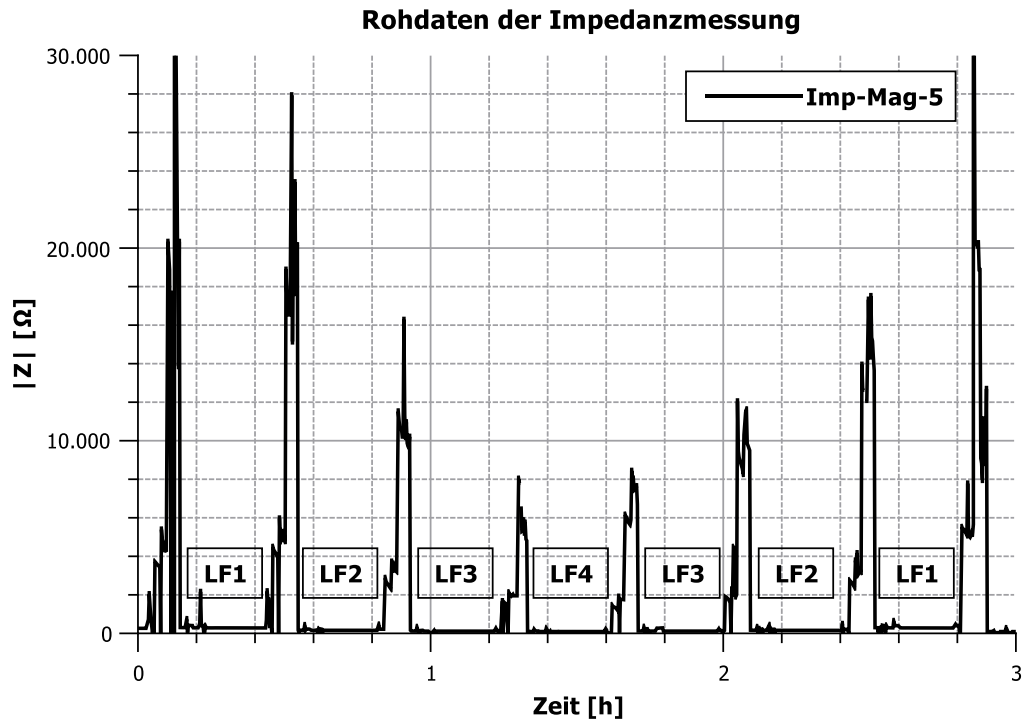


Abbildung 86: Durch das Absaugen kommt es beim Wechsel der Leitfähigkeitslösung zu hohen Schwankungen des gemessenen Widerstandes. Die eigentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Messlösungen gehen dadurch in der Darstellung der Rohdaten unter.

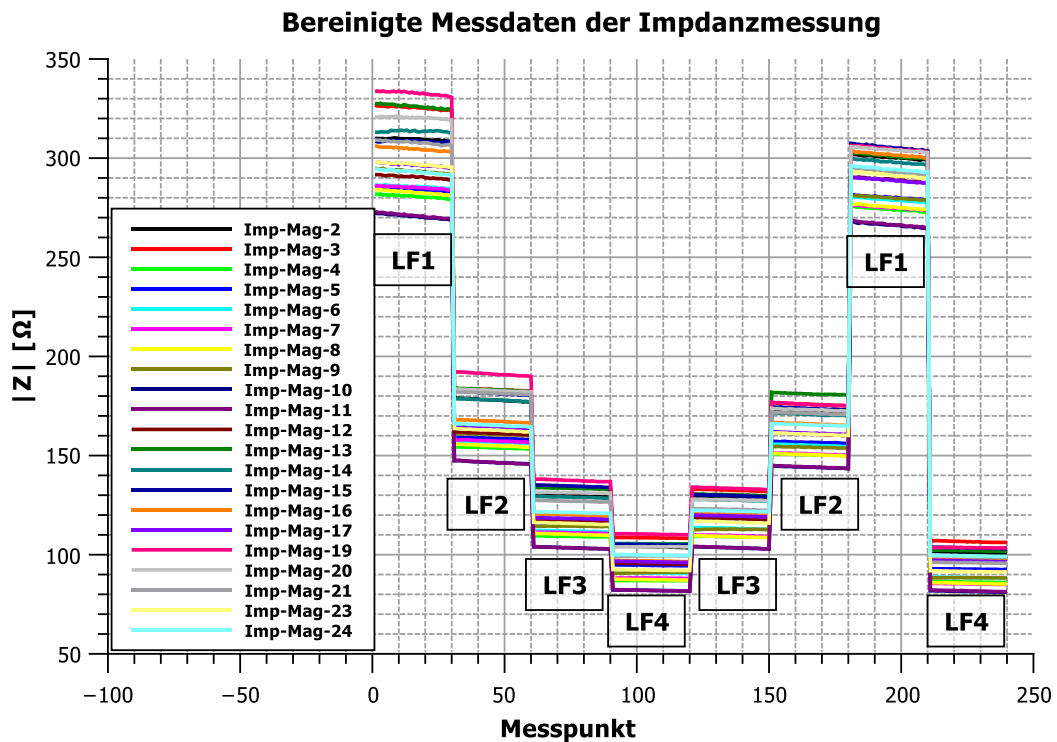


Abbildung 87: Für eine bessere Darstellung der Messdaten wurden die Artefakte, die im Zusammenhang mit dem Medienwechsel stehen, aus den Messdaten entfernt. Im neuen Graphen ist deutlich zu erkennen, dass der am Sensor gemessene Widerstand mit der Erhöhung der Leitfähigkeit sinkt.

6.5.1 Stabilität und Drift

Um die Stabilität zu untersuchen, werden die jeweils zehn Messpunkte derselben Messlösung (LF1) zu Beginn sowie gegen Ende des Versuchs (nach 2,6 Stunden) miteinander verglichen. Für die Visualisierung dieses Vergleichs wurden in Abbildung 88 alle übrigen Messpunkte entfernt. Sensoren, die eine höhere Abweichung als $10\ \Omega$ zeigen, sind rot dargestellt.

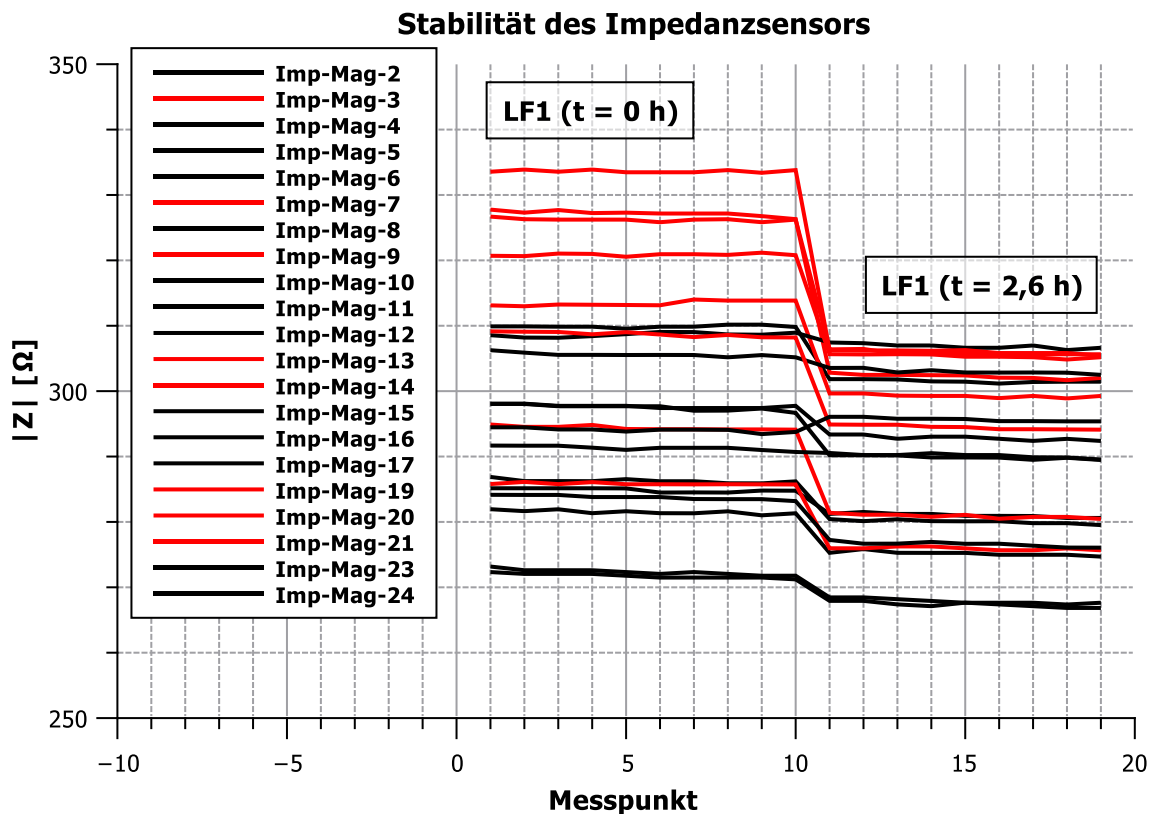


Abbildung 88: Ein Teil der Sensoren zeigte zu Beginn der Messung eine verstärkte Drift. Um dies darzustellen, wurden die gemessenen Widerstände für dieselbe Leitfähigkeitslösung LF1 an zwei verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt. Sensoren, die um mehr als $10\ \Omega$ gedriftet sind, wurden rot eingefärbt. Es fällt auf, dass es sich dabei ausschließlich um Sensoren aus den Spalten 1, 2 und 3, also der linken Seite der eMTP, handelt.

Es fällt auf, dass Sensoren in den linken drei Spalten der eingesetzten eMTP tendenziell stärker driften sowie keine Sensoren auf der rechten Seite der Platte um mehr als $10\ \Omega$ driften.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnten Unregelmäßigkeiten beim Pipettiervorgang sein. Beispielsweise könnte eine leichte Verkippung der eMTP dafür sorgen, dass die Pipettenspitzen den Boden der Platte berühren und das Einsaugen des Mediums dadurch behindert wird. Dies ist nicht auszuschließen, da die Pipettenspitzen in diesem Versuch niedriger als üblich positioniert wurden, um die Restmengen nach dem Absaugen des Mediums zu minimieren.

Eine andere Erklärung könnte die Vorgeschichte der verwendeten eMTP sein. Bei der verwendeten Platte wurde lediglich die pH-Elektrode der rechten Seite mit Iridiumoxid beschichtet. Während dieser Beschichtung standen die Impedanzstrukturen der rechten Seite in Kontakt mit dem Galvanikbad und wurden mit elektrischem Strom beaufschlagt, da sie als Gegenelektrode dienten. Es wäre möglich, dass die Impedanzsensoren der linken Seite eine verstärkte Drift zu Beginn der Messung haben, da sie noch nie mit Strom beaufschlagt wurden.

6.5.2 Sensitivität und Genauigkeit des Impedanzsensors

Für die Untersuchung von Sensitivität und Genauigkeit der Sensoren wurde der Abschnitt des Versuchs ausgewertet, in dem der Widerstand stufenweise von LF4 auf LF1 steigt (Messpunkte 90 bis 210 in Abbildung 87). Aus jeweils 30 Messpunkten, die einer der vier Messlösungen zugeordnet sind, wurde ein Mittelwert gebildet. Jeder Mittelwert wurde in Abbildung 89 gegen den spezifischen Widerstand der jeweiligen Messlösung aufgetragen.

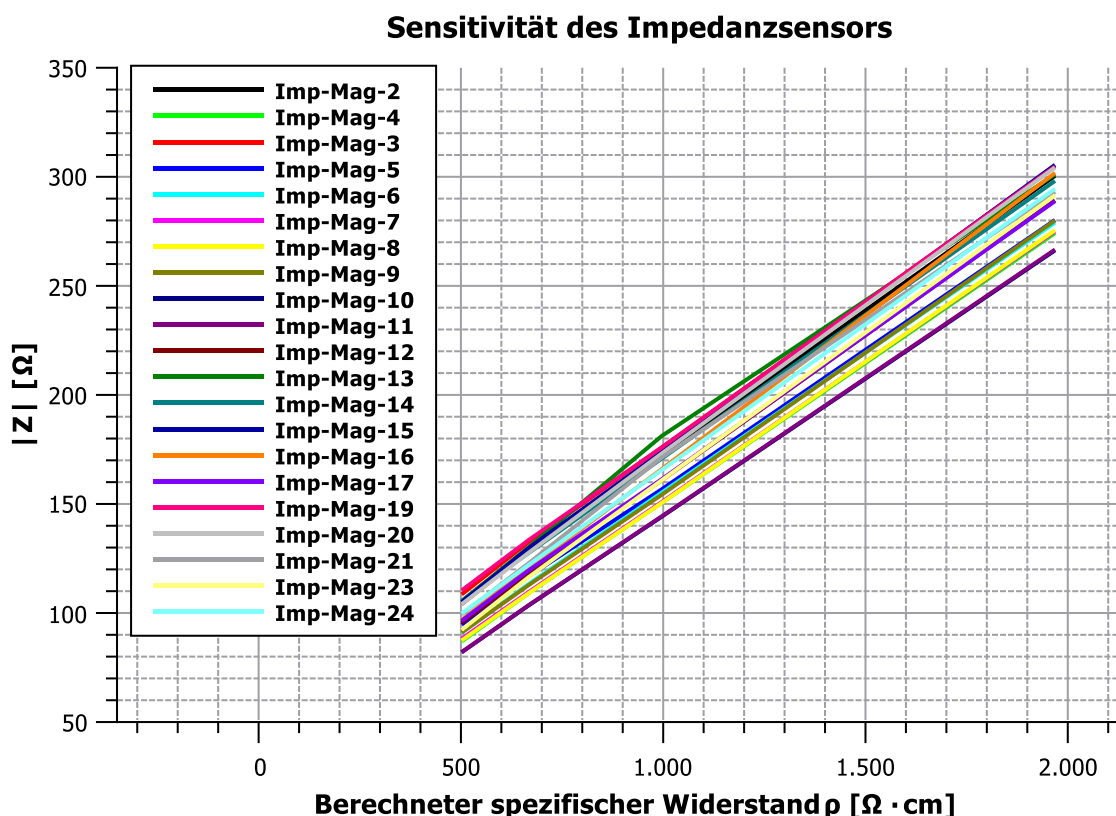


Abbildung 89: Für die Bestimmung der Sensitivität wird die am Sensor gemessene Impedanz gegen den berechneten spezifischen Widerstand der jeweiligen Leitfähigkeitslösung aufgetragen. Dazu werden die Messpunkte verwendet, die in der zweiten Hälfte des Versuchs (LF4 – LF3 – LF2 – LF1) aufgenommen wurden.

6.5 Impedanzmessung

Mittelwert und Standardabweichung für alle funktionsfähigen Sensoren der verwendeten eMTP werden in Abbildung 90 dargestellt. Bis auf zwei Ausnahmen (Sensor 13 und Sensor 21) zeigen alle Sensoren ein lineares Verhalten, sind jedoch nicht streng linear. Dies entspricht auch dem zu erwartenden Ergebnis, da bei einer Zweielektrodenmessung weder der Zuleitungswiderstand noch der Ladungstransferwiderstand der Messelektroden kompensiert wird. In Summe finden sich diese Widerstände als konstanter Offset in der Messung wieder.

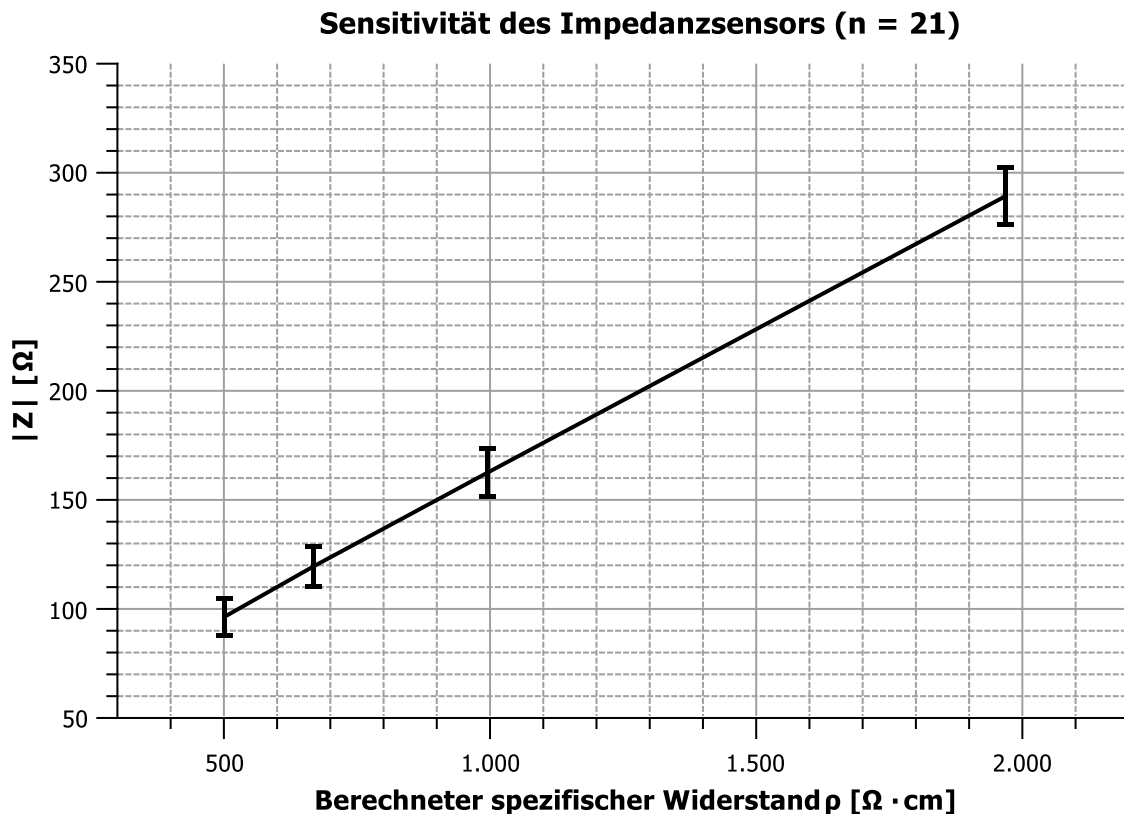


Abbildung 90: Mittelwert und Standardabweichung der an den Sensoren gemessenen Impedanzen werden gegen den berechneten spezifischen Widerstand aufgetragen. Es werden die Messwerte der zweiten Hälfte des Versuchs verwendet. Die Darstellung zeigt, dass sich die Sensoren erwartungsgemäß linear verhalten und es eine von der Messlösung unabhängige Offsetverschiebung gibt.

Tabelle 6-5 zeigt die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse des in Abbildung 89 dargestellten Zusammenhangs zwischen spezifischem Widerstand der Messlösung und dem tatsächlich am Sensor erfassten Widerstand.

Die Steigung der Regressionsgerade lässt sich als Sensitivität bzw. als Zellkonstante (vgl. Abschnitt 3.8.4.2) des Sensors interpretieren. Der Achsenabschnitt hingegen entspricht dem Elektrodenwiderstand, der sich aus dem Widerstand der Zuleitungen sowie dem Widerstand der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt zusammensetzt. Somit liegen die

Kapitel 6: Versuchsergebnisse

Zellkonstanten der vermessenen Sensoren zwischen $0,125 \text{ cm}^{-1}$ und $0,14 \text{ cm}^{-1}$. Die Elektrodenwiderstände liegen zwischen 19Ω und 45Ω .

Bezeichnung	Steigung	Achsenabschnitt	Bestimmtheitsmaß R^2
Imp-Mag-2	0,13318835	38,7174262	0,99980781
Imp-Mag-3	0,13335094	42,6208608	0,99991081
Imp-Mag-4	0,12737502	23,5450462	0,99997267
Imp-Mag-5	0,12616613	31,6883001	0,99992795
Imp-Mag-6	0,12791781	27,3863182	0,99995855
Imp-Mag-7	0,12727789	24,3615064	0,99999018
Imp-Mag-8	0,12808839	23,2322589	0,99998546
Imp-Mag-9	0,12873277	26,4495545	0,99997977
Imp-Mag-10	0,12544291	19,3251072	0,99998571
Imp-Mag-11	0,12566679	19,2443962	0,99998512
Imp-Mag-12	0,13178662	29,7194443	0,99997993
Imp-Mag-13	0,13235624	42,6955423	0,99729065
Imp-Mag-14	0,13129782	39,7578649	0,99999374
Imp-Mag-15	0,13606211	37,8845548	0,99988635
Imp-Mag-16	0,13961171	26,9725688	0,99999468
Imp-Mag-17	0,13081887	31,3176023	0,9999458
Imp-Mag-19	0,132213	44,462908	0,99996315
Imp-Mag-20	0,13621647	36,4859051	0,99992643
Imp-Mag-21	0,13146557	35,765249	0,99871782
Imp-Mag-23	0,13537236	25,3672637	0,99991345
Imp-Mag-24	0,13267602	33,3415701	0,99999895

Tabelle 6-5: Übersicht über die Ergebnisse der linearen Regression

6.5 Impedanzmessung

Die manuelle Vermessung der Zuleitungswiderstände der Impedanzsensoren mit einem Multimeter zeigt eine maximale Schwankungsbreite von 5Ω . Die höhere Abweichung der Elektrodenwiderstände von bis zu 25Ω kann folglich nicht ausschließlich durch den Zuleitungswiderstand erklärt werden. Weitere Ursachen, wie Elektrodengeometrie oder der Zustand der Elektrodenoberfläche, müssen in Betracht gezogen werden.

Zellkonstante und Elektrodenwiderstände sind in Abbildung 91 in einem gemeinsamen Graphen für alle untersuchten Sensoren aufgetragen. Aus der Abbildung lässt sich jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den beiden Parametern erkennen. Dies deutet darauf hin, dass für die Schwankungen des Elektrodenwiderstands in dieser Messreihe der Zustand der Elektrodenoberfläche mitverantwortlich ist, da die Zellkonstante lediglich von der Elektrodengeometrie abhängt.

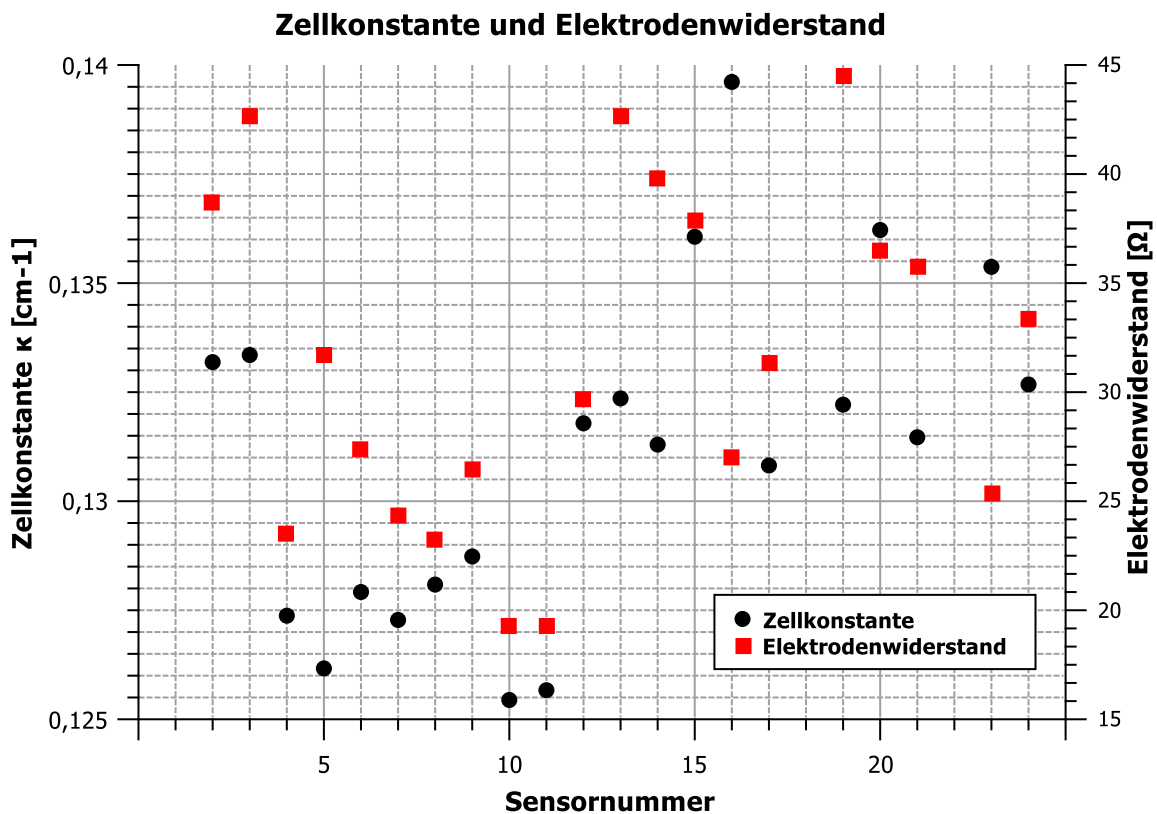


Abbildung 91: Die Zellkonstante und der Elektrodenwiderstand werden für jeden einzelnen Sensor aufgetragen. Hierfür werden die in Tabelle 6-5 gegebene Steigung als Zellkonstante und der Achsenabschnitt als Elektrodenwiderstand interpretiert.

6.6 Messung des Stromverbrauchs

Da die Messelektronik während einer Messperiode verschiedene Stadien mit unterschiedlichem Stromverbrauch durchläuft, unterliegt der Stromverbrauch einer Schwankung von 10-15 mA. Im Mittel verbraucht die Messelektronik bei deaktivierter Impedanzmessung 125 mA und 145 mA, wenn alle Module aktiv sind.

6.7 Untersuchung der Sensorinterferenzen bei multiparametrischer Messung

6.7.1 Einfluss der Sauerstoffmessung

Bei der Aktivierung der Sauerstoffmessung kommt es durch die Polarisierung der Arbeitselektrode zu einem sprunghaften Anstieg des Messstromes. Die Sauerstoffkonzentration an der Elektrode nimmt dadurch rasch ab, was zum Absinken des Stroms führt, bis der Gleichgewichtszustand erreicht wird (vgl. Abschnitt 3.6.2.3). Wird die Sauerstoffmessung deaktiviert, kommt es zu einer entgegengesetzten Polarisierung der Elektrode und damit wiederum zu einem Strompeak in entgegengesetzter Richtung.

Abbildung 92 zeigt die Messdaten der Sensorinterferenz zwischen Sauerstoff und pH. Es handelt sich um Sensoren auf Glassubstrat. Der Messstrom ist schwarz aufgetragen. Die parallel laufende Messung der Sensorspannung des pH-Sensors wurde im selben Graphen rot aufgetragen. Die periodischen Ein- und Ausschaltvorgänge sind als deutliche Ausschläge im Messstrom zu erkennen. Der Einfluss des Sauerstoffsensors auf den pH-Sensor ist ausschließlich während der Schaltvorgänge groß genug, um vom Sensordrift unterscheidbar zu sein. Die auftretenden Peaks sind etwa 40 μV hoch. Bei einer Empfindlichkeit des pH-Sensors von 70 mV/pH entspricht dies einem Fehler von 0,00057 pH.

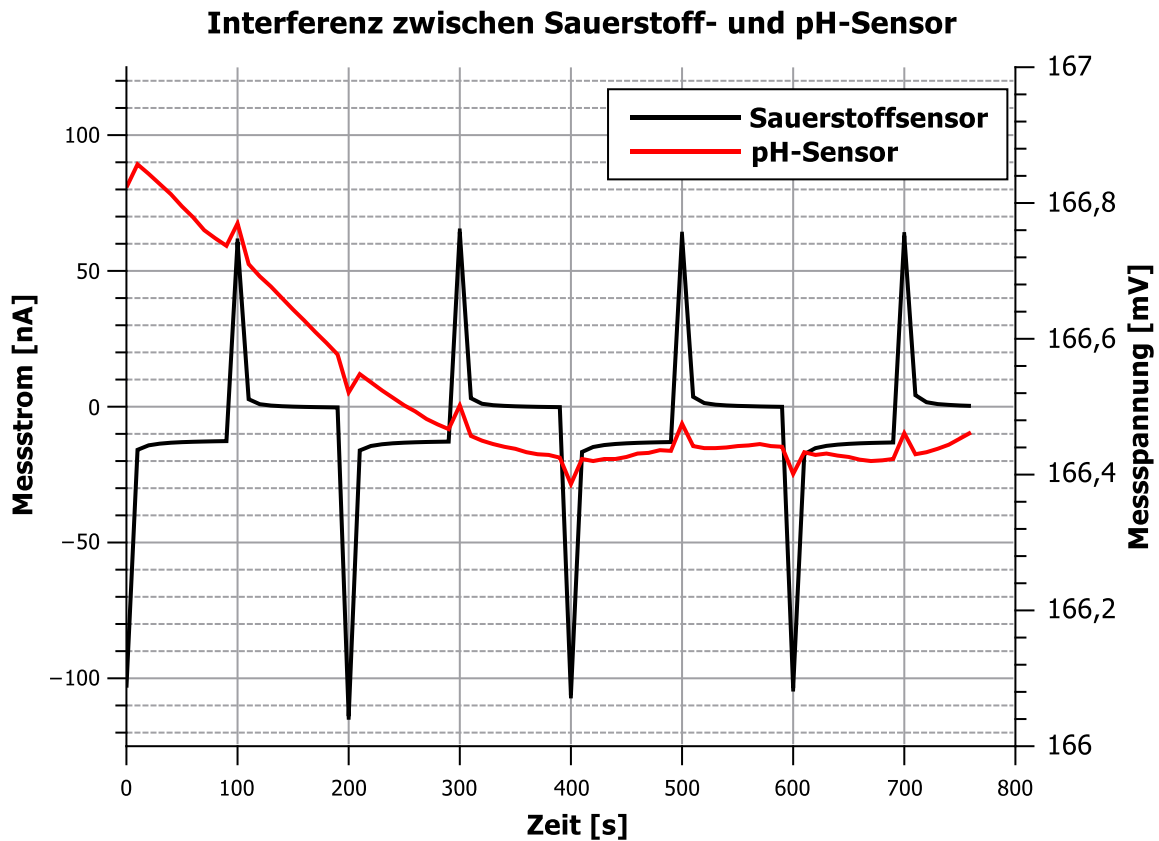


Abbildung 92: Aus dem Verlauf des Messstroms durch den Sauerstoffsensor ist zu erkennen, wie dieser periodisch an- und abgeschaltet wird. Eine Beeinflussung der Messspannung am pH-Sensor ist zu den Umschaltzeitpunkten zu erkennen, in denen der Stromfluss besonders hoch ist. Der Signalpegel der Interferenz ist mit $40 \mu\text{V}$ sehr gering. Bei der gezeigten Messung wurden Sensoren auf Glassubstrat verwendet.

Bei Sensoren auf dem Foliensubstrat ist der Einfluss der Sauerstoffmessung auf den pH-Sensor mit maximal $20 \mu\text{V}$ ebenfalls sehr gering. Abbildung 93 stellt das Ergebnis der entsprechenden Messung dar. Die Beeinflussung erfolgt auch bei diesen Sensoren ausschließlich zum Zeitpunkt des Ein- und Ausschaltens des Sauerstoffmessung.

Für die Charakterisierung des Sauerstoffsensors auf Foliensubstrat (siehe Abschnitt 5.2) wurde ein Langzeitversuch durchgeführt, in dem die Sauerstoffkonzentration in PBS stufenweise verändert wurde, während der Sauerstoffsensor kontinuierlich betrieben wurde. Abbildung 94 zeigt die Messwerte von Sauerstoff- und pH-Sensor in diesem Versuch. Eine Beeinflussung der pH-Messung durch den Sauerstoffsensor konnte in diesem Fall nicht festgestellt werden.

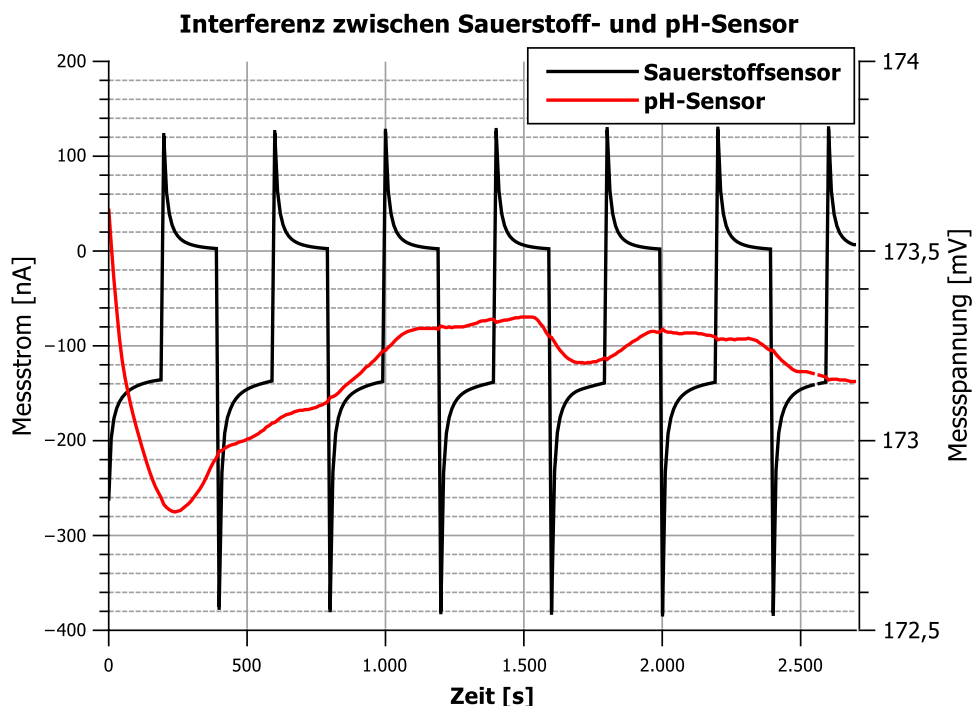


Abbildung 93: Die Messung zeigt die Beeinflussung des pH-Sensors durch die Sauerstoffmessung bei Sensoren auf Foliensubstrat. Die Interferenz ist mit einem Signalpegel von 20 μV sehr gering und tritt nur während der Schaltvorgänge auf.

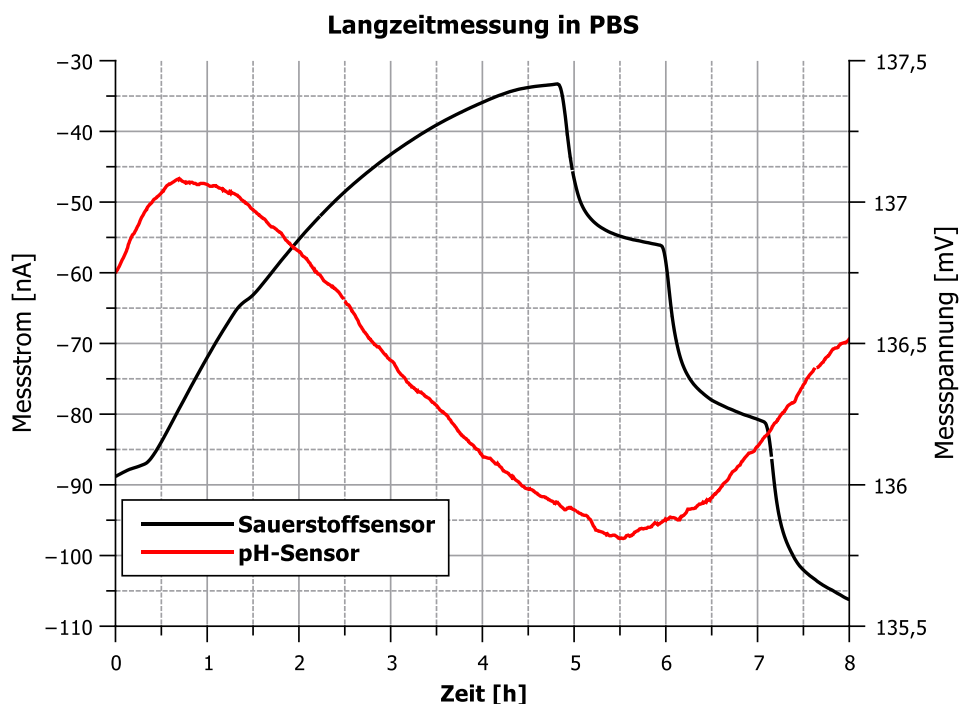


Abbildung 94: Die Abbildung zeigt eine Langzeitmessung eines pH- und Sauerstoffsensors auf Foliensubstrat. Das verwendete Medium war PBS. Der Sauerstoffgehalt wurde während der Messung variiert, was sich im Verlauf des Messstroms durch den Sauerstoffsensor (schwarze Kurve, linke Skala) widerspiegelt. Der pH-Sensor (rote Kurve, rechte Skala) ist über die gesamte Dauer des Versuchs sehr stabil und schwankt um weniger als 1,3 mV.

6.7 Untersuchung der Sensorinterferenzen bei multiparametrischer Messung

Der Einfluss der Sauerstoffmessung auf den Impedanzsensor wird in Abbildung 95 dargestellt. Durch die Aktivierung des Sauerstoffsensors verändert sich der Betrag der gemessenen Impedanz um etwa $0,4 \Omega$. Anders als beim pH-Sensor äußert sich die Interferenz nicht durch einen kurzzeitigen Peak. Stattdessen nimmt der gemessene Widerstand nach der Aktivierung des Sauerstoffsensors kontinuierlich zu bzw. nach Deaktivierung kontinuierlich ab.

Dies ist ein Anzeichen dafür, dass jeweils unterschiedliche Mechanismen für die Interferenzen verantwortlich sind.

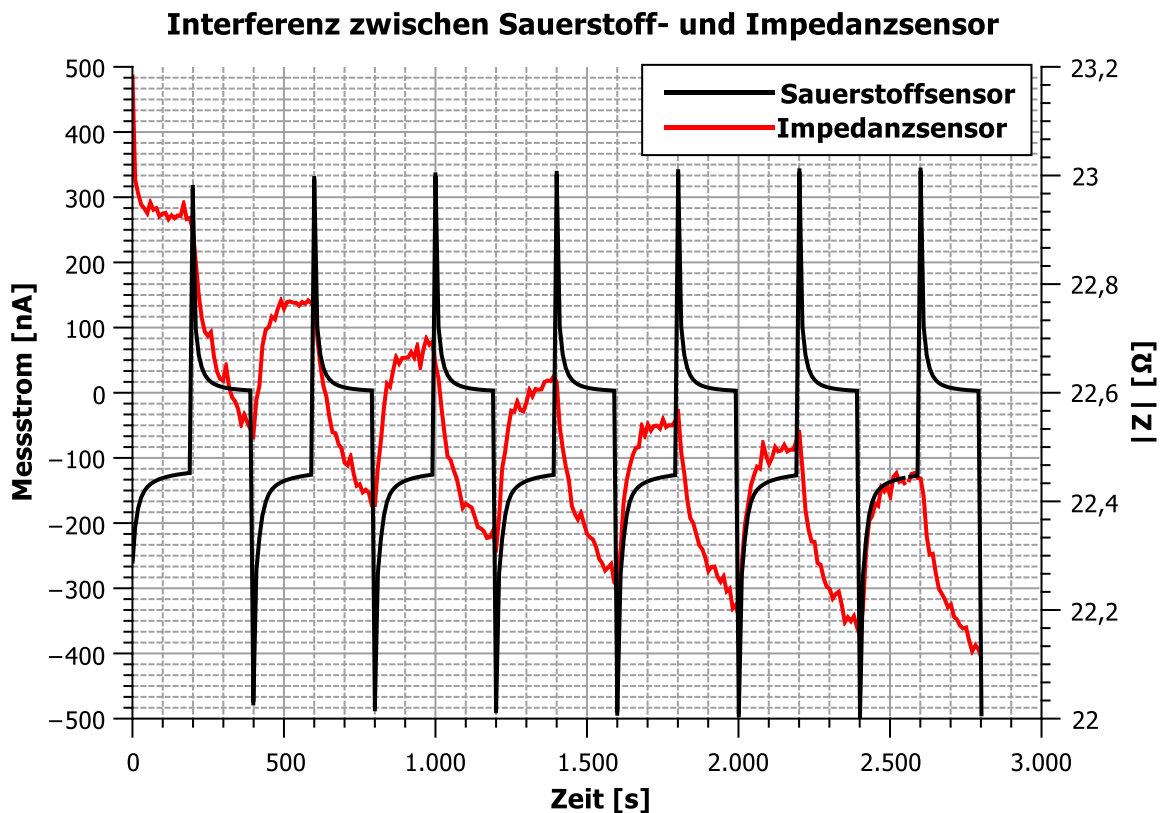


Abbildung 95: Es ist zu erkennen, dass nach der Aktivierung der Sauerstoffmessung (schwarze Kurve, linke Skala) der Messwert des Impedanzsensors (rote Kurve, rechte Skala) auf höhere Widerstandswerte steigt. Der Effekt beläuft sich auf ungefähr $0,4 \Omega$ und ist somit gering, aber dennoch messbar.

6.7.2 Einfluss der Impedanzmessung

Durch die Impedanzmessung kommt es zu keiner messbaren Beeinflussung des Sauerstoff- oder pH-Sensors. In Abbildung 96 wird dargestellt, wie sich diese Sensoren bei periodischer An- und Abschaltung der Impedanzmessung verhalten.

Beide Sensorsignale sind vom Zustand der Impedanzmessung unabhängig. Dennoch ist eine ungewöhnliche Instabilität in den Messungen zu erkennen, die auf die Verwendung einer ungepufferten KCl-Lösung als Messmedium zurückgeführt wird.

In Versuchen mit einer pH-gepufferten Messlösung treten solche Instabilitäten auch bei aktivierter Impedanzmessung nicht auf. Abbildung 94 zeigt den Spannungsverlauf des pH-Sensors, der während der Charakterisierung des Sauerstoffsensors (siehe Abschnitt 5.2 und 6.2) aufgezeichnet wurde. Die Messspannung des pH-Sensors schwankt über einen Zeitraum von acht Stunden um weniger als 1,3 mV, während der Impedanzsensor dauerhaft aktiv ist.

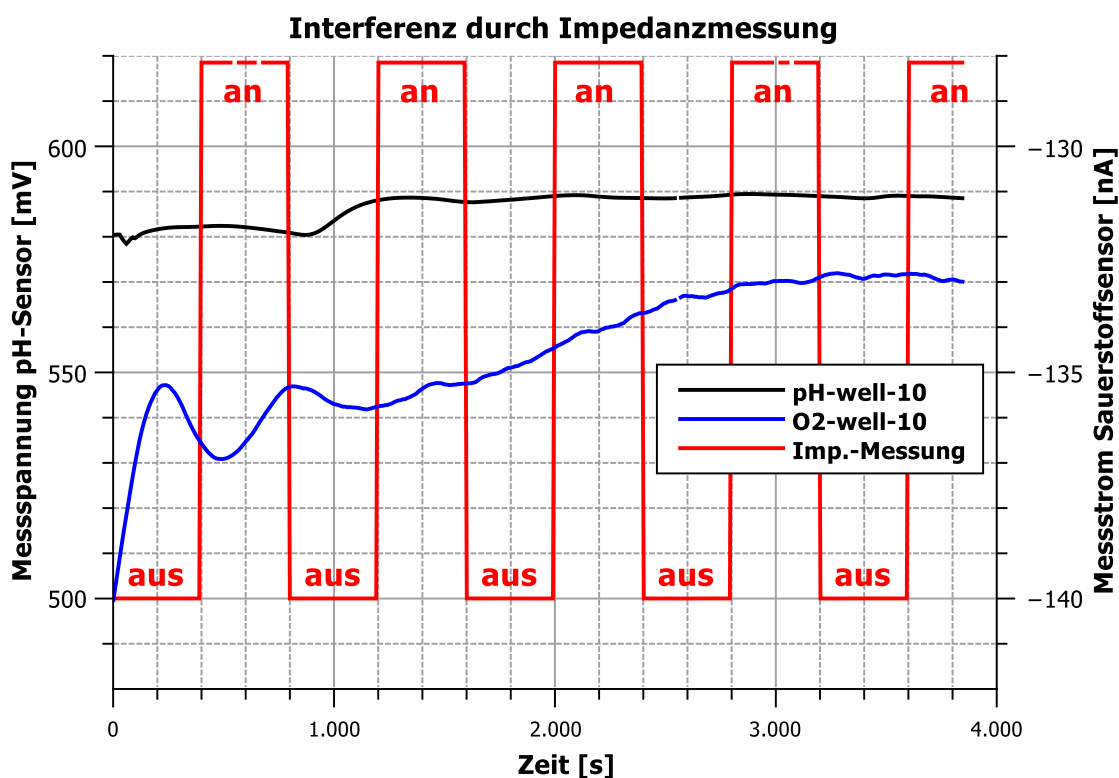


Abbildung 96: Während die Impedanzmessung periodisch ein- und ausgeschaltet wurde, zeigten sich weder der pH-Sensor (schwarze Kurve, linke Skala) noch der Sauerstoffsensor (blaue Kurve, rechte Skala) vom Schaltzyklus beeinflusst. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, da die bei der Messung verwendete Wechselspannung keinen polarisierenden Einfluss auf das Elektrodensystem hat und auch kein DC-Strom fließt, der zu einem iR -Fehler führen könnte.

6.8 Zellkulturversuche

6.8.1 Messung des extrazellulären pH-Wertes

Zu Beginn der ersten Phase der Messung wird das Kultivierungsmedium gegen das Messmedium ausgetauscht und die Zellen passen sich an die neuen Umgebungsbedingungen an. Aufgrund dieser Einflüsse wird diese Phase von der Auswertung ausgeschlossen.

Für einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Sensoren eignet sich die zweite Phase, da durch die längeren Pipettierzyklen eine hohe Signalamplitude erzielt wird. Wie bereits in Abschnitt 6.3 festgestellt wurde, haben die pH-Sensoren einen absoluten Offset. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Messdaten der pH-Sensoren in Abbildung 97 zunächst offsetbereinigt und danach leicht versetzt übereinandergelegt. Die relativen Spannungsänderungen wurden ohne Anpassung übernommen. Sensoren auf der linken Seite der eMTP sind mit Iridiumoxid beschichtet und werden als „IrOx“ bezeichnet. Sensoren auf der rechten Seite sind unbeschichtet und werden als „Blank“ bezeichnet.

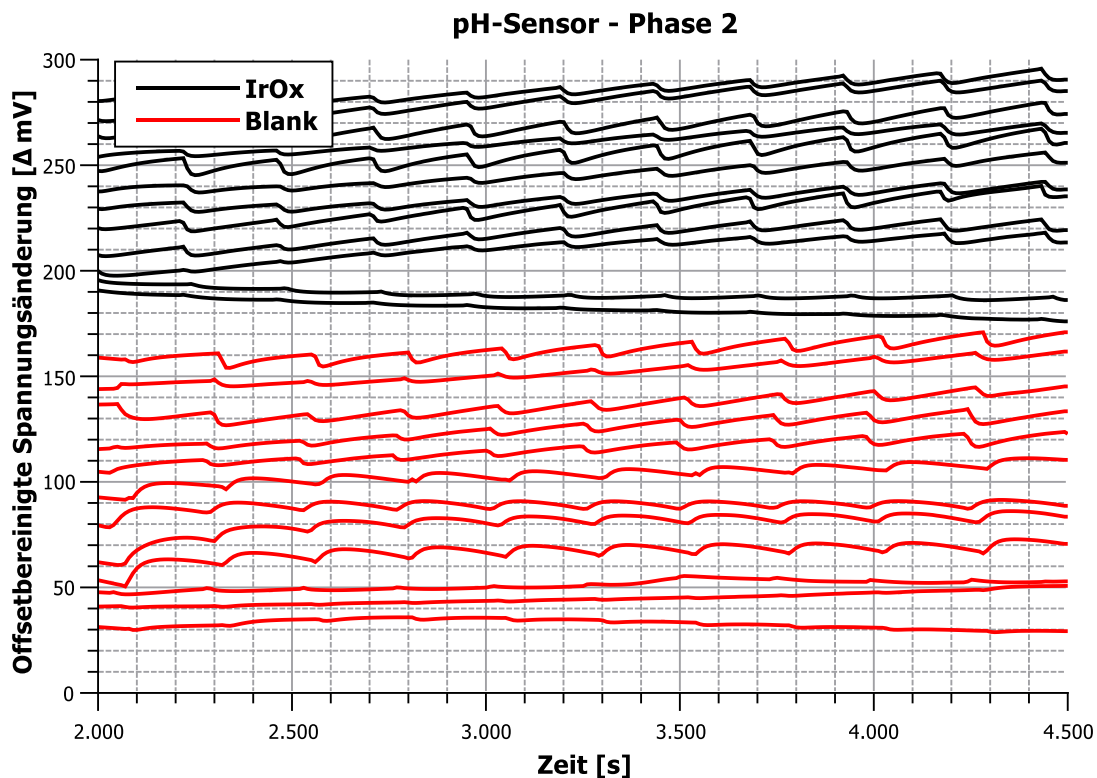


Abbildung 97: Die mit Iridiumoxid beschichteten Sensoren (schwarz) zeigen das typische Sägezahnmuster. Der zelluläre Metabolismus führt zum Absinken des pH-Wertes. Während des Austauschs des Mediums steigt der pH-Wert wieder an. Die von oben betrachtet ersten fünf Sensoren ohne Iridiumoxid (rot) zeigen ebenfalls das Sägezahnmuster, was auf eine unbeabsichtigte Abscheidung von Iridiumoxid auf diesen Sensoren hindeutet.

Zwei der zwölf Sensoren auf der linken Seite der eMTP (Kavität 8 und Kavität 19) wurden bei der Fertigung des Foliensubstrates beschädigt und aus diesem Grund nicht vollständig mit Iridiumoxid beschichtet. Die übrigen zehn mit Iridiumoxid beschichteten Sensoren zeigen das typische Sägezahnmuster, das sich aus dem langsamen Abfall des pH-Wertes (steigende Spannung) und dem schnellen Anstieg des pH-Wertes während des Mediaaustausches zusammensetzt. Fünf der insgesamt zwölf unbeschichteten Sensoren zeigen – wider Erwarten – das für beschichtete Sensoren typische Sägezahnmuster. Dieses Verhalten zeigt, dass es während der Beschichtung des Referenzsensors zu einer ungewollten Abscheidung auf einem Teil der Mikroelektroden des pH-Sensors gekommen ist. Die anderen sieben Sensoren zeigen ein abweichendes Muster, das auf die nicht vorhandene Iridiumoxidbeschichtung zurückzuführen ist.

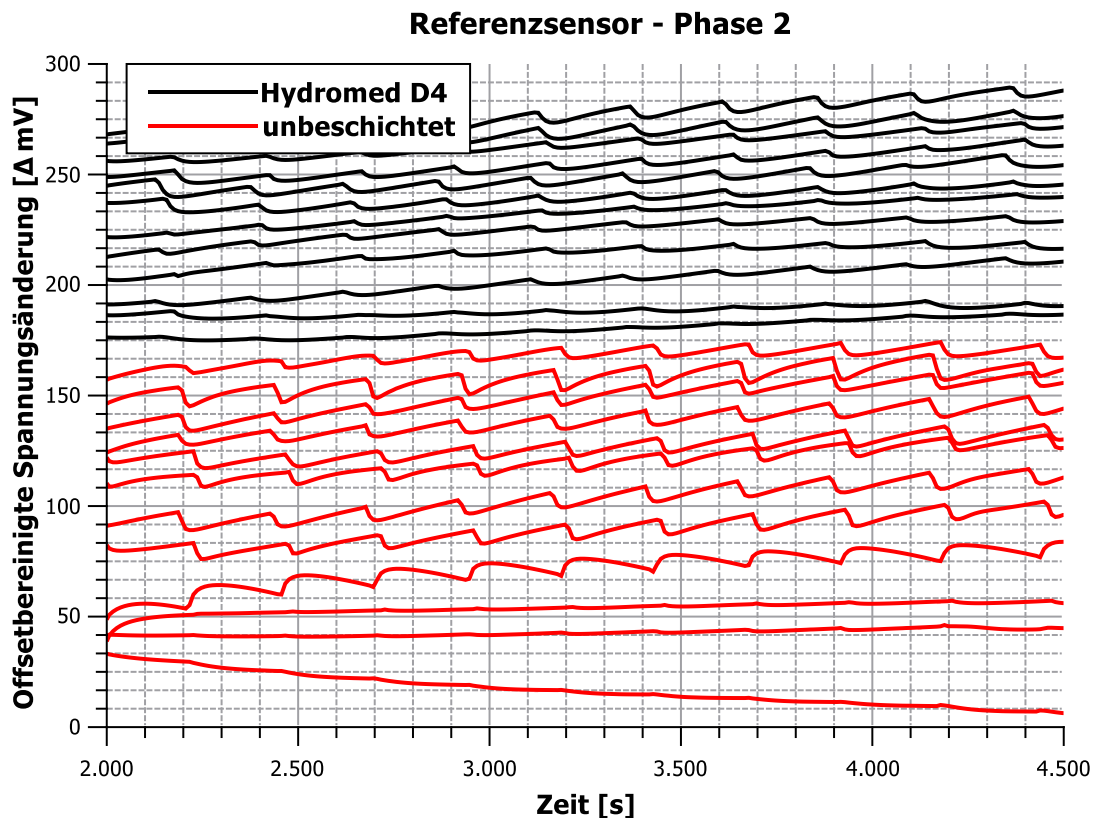


Abbildung 98: Auf alle abgebildeten Sensoren wurde Iridiumoxid abgeschieden. Sensoren, die nachträglich mit Hydromed™ D4 bedeckt wurden (schwarz), haben im Vergleich zu unbeschichteten Sensoren (rot) einen tendenziell gedämpften Spannungsverlauf mit geringerer Amplitude.

Neben dem Mikroelektrodenarray wurde die linke der drei großflächigen Elektroden (siehe Abbildung 50) mit Iridiumoxid beschichtet. Dieser zusätzliche pH-Sensor wird als Referenzsensor bezeichnet. Abbildung 98 zeigt den Einfluss einer Hydromed™ D4-

6.8 Zellkulturversuche

Beschichtung auf den Referenzsensor. Diese Messdaten sind zur besseren Darstellung ebenfalls um einen Offset verschoben.

Mit Hydromed™ D4 bedeckte Referenzsensoren zeigen ebenfalls ein Sägezahnmuster, das in seinem Verlauf mit den pH-Sensoren vergleichbar ist. Bei der Hälfte der Referenzsensoren (Kavität 1, 2, 3, 7, 9, 19) ist das Signal gedämpft. Der ungedämpfte Verlauf der anderen Hälfte der Referenzsensoren kann verschiedene Ursachen haben. Entweder die Elektrode wird durch das Hydromed™ D4 nur zum Teil abgedeckt oder die Hydromed™ D4 löst sich von der Elektrode ab. Auch eine zu geringe Schichtdicke ist eine mögliche Erklärung.

Referenzsensoren ohne Hydromed™ D4 zeigen bis auf vier Ausnahmen ein gut ausgeprägtes Sägezahnmuster. Die erste Ausnahme (Kavität 11, Abbildung 98: vierte Kurve von unten) zeigt das Verhalten eines Sensors ohne erfolgreiche Iridiumoxidabscheidung. Die übrigen drei Ausnahmen (Kavität 6, 17, 23, Abbildung 98: drei unterste Kurven) entwickeln das Muster erst in den späteren Phasen des Experiments.

Der Verlauf des Experiments wird für die Phasen 2 bis 5 exemplarisch an Kavität 7 demonstriert. Diese Kavität wurde ausgewählt, da hier die Beschichtung des pH-Sensors und des Referenzsensors mit Iridiumoxid optisch bestätigt wurde und eine hohe Dämpfung des Referenzsensors durch das Hydrogel erzielt wird.

Abbildung 99 vergleicht die Messspannungen des pH-Sensors mit dem Referenzsensor in Phase 2. Die Aufteilung der Skalen rechts und links sind so gewählt, dass die relativen Spannungsänderungen vergleichbar bleiben. Das Signal des pH-Sensors hat eine Amplitude von ungefähr 5 mV. Die Amplitude des Referenzsensors ist mit 1 mV wesentlich geringer. Dennoch folgt der Referenzsensor der langsamen Änderung des pH-Sensors in vollem Umfang. Das Hydrogel erhöht folglich die Relaxationszeit des Referenzsensors, wodurch es zum beobachteten Tiefpassverhalten kommt.

In der dritten Phase wurde der Pipettierzyklus von 240 auf 120 Sekunden verkürzt. Dadurch halbiert sich, wie aus Abbildung 100 ersichtlich ist, erwartungsgemäß die Amplitude des pH-Sensors auf etwa 2,5 mV. Die Amplitude des Referenzsensors reduziert sich auf 0,3 mV. In diesem Messabschnitt unterscheidet sich das niederfrequente Verhalten der beiden Sensoren. Der steigende Trend des Referenzsensors ist in dieser Phase atypisch, da sich die anderen mit Hydrogel beschichteten Sensoren deutlich stabiler verhalten.

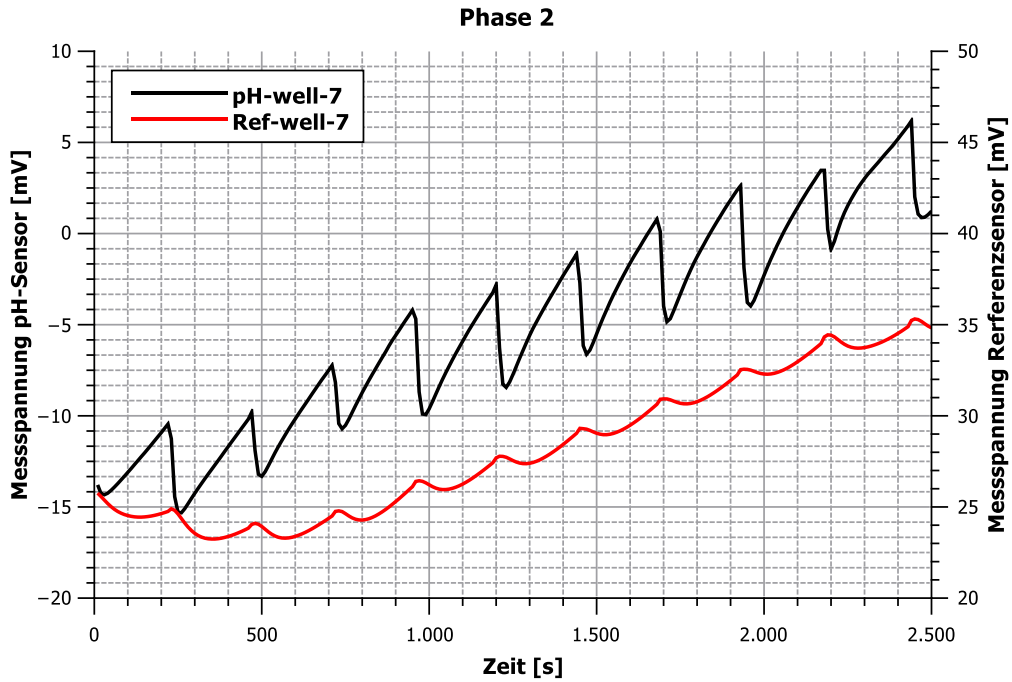


Abbildung 99: Durch eine nachträgliche Beschichtung der Iridiumoxidelektrode mit Hydromed™ D4, reagiert der Referenzsensor (rot) langsamer als der pH-Sensor auf Änderungen des pH-Wertes. Wie ein Tiefpass-gefiltertes Signal folgt die rote Kurve dem Trend bzw. der Drift der schwarzen Kurve.

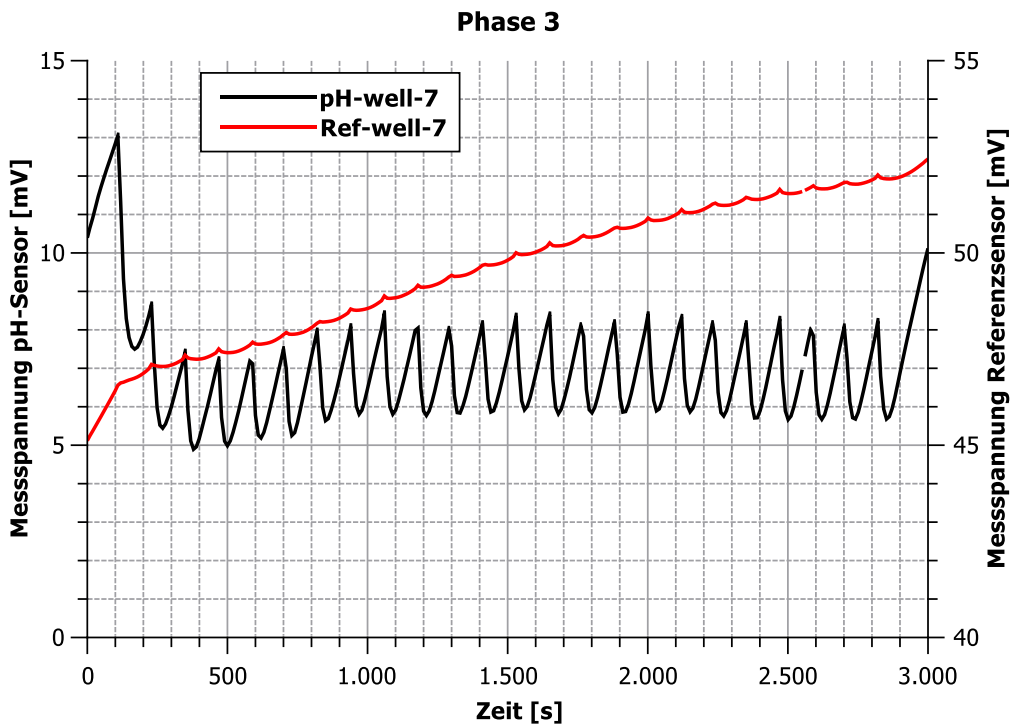


Abbildung 100: In der dritten Phase des Versuchs wird die Frequenz des Mediumwechsels verdoppelt. Dadurch reduzieren sich die Amplituden von pH- und Referenzsensor. Der Trend des pH-Sensors weicht vom Verhalten des Referenzsensors ab. Die genauen Ursachen dafür konnten nicht geklärt werden.

6.8 Zellkulturversuche

Die vierte Phase unterscheidet sich im Pipettierzyklus nicht von der dritten Phase, da Kavität 7 zu der Gruppe der Kavitäten gehört, die kontinuierlich weiter beprobt wurden. Abbildung 101 zeigt den Verlauf der Messspannungen für diesen Abschnitt. Die Amplituden von pH- und Referenzsensor sind weitgehend unverändert. Der Trend des Referenzsensors hat sich stabilisiert.

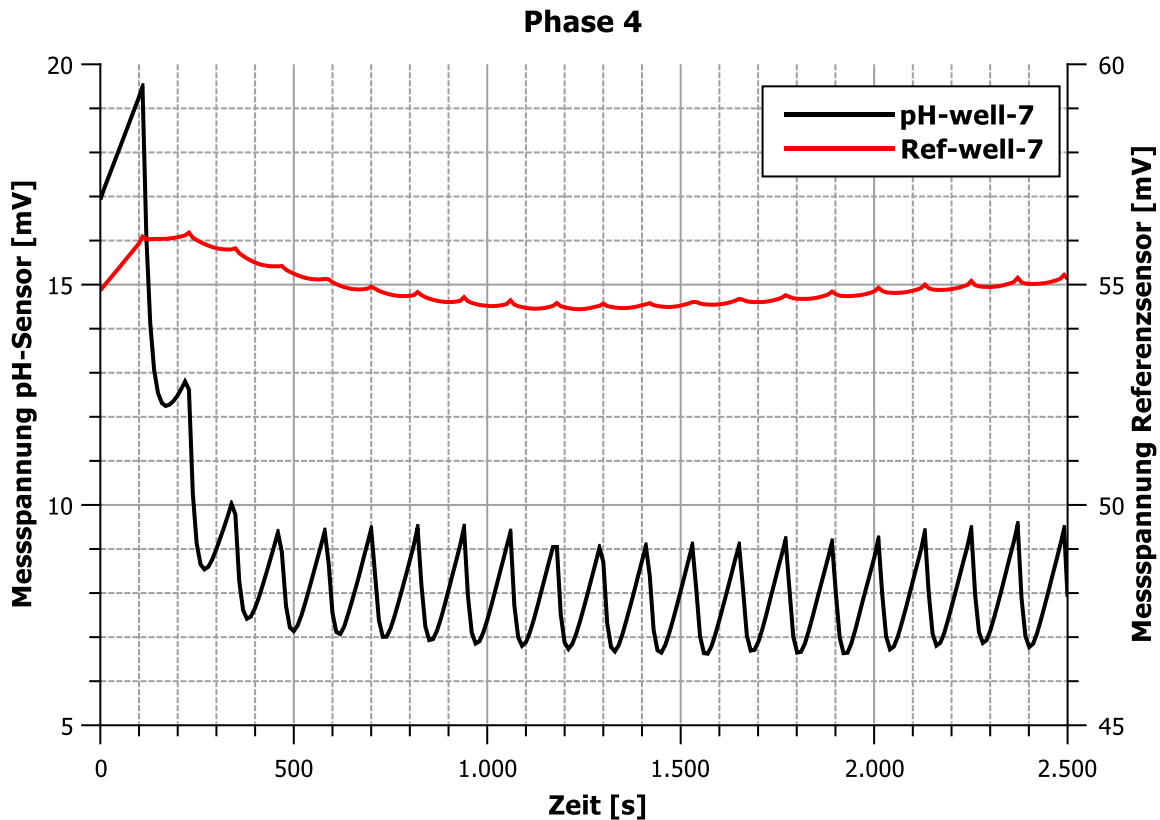


Abbildung 101: Zu Beginn der Phase 4 wird der Pipettierroboter nach einer Pause von etwa sieben Minuten reaktiviert. Durch das frische Zellkulturmedium kommt es zum Anstieg des pH-Wertes in der Messkammer. Der pH-Sensor reagiert mit einem Spannungsabfall von 22 mV (entspricht einer pH-Änderung von ca. 0,3 pH). Die Spannung des mit Hydrogel bedeckten Referenzsensors ändert sich hingegen um weniger als 2 mV (entspricht ca. 0,029 pH).

In der fünften Phase wird Triton[™] X-100 verwendet, um die Zellen in der Kulturkammer abzutöten und den zellulären Metabolismus zu beenden. Der Effekt auf den pH-Sensor ist in Abbildung 102 zu erkennen. Die Zugabe führt beim Signal des pH-Sensors zu einer deutlichen Verringerung der Amplitude. Auch das Signalmuster ändert sich, sodass die typische Sägezahnform nach dem Auflösen der Zellen nicht mehr erkennbar ist. Die Pipettiervorgänge sind weiterhin als kleine positive Spannungsspeaks in den Messungen sichtbar. Dieses Phänomen ist bereits aus den Messungen mit PBS-Puffern (vgl. Abschnitt 6.3) bekannt. Der

Referenzsensor folgt den langsamen Änderungen des pH-Sensors. Nach dem Auflösen der Zellen gleicht sich die Amplitude des pH-Sensors an den Referenzsensor an.

Die übrigen pH-Sensoren, auf denen Iridiumoxid abgeschieden wurde, zeigen bis auf zwei Ausnahmen ein ähnliches Verhalten wie Kavität 7. Die Ausnahmen bilden Kavität 8 und Kavität 19, die bereits in Phase 2 auffällig geworden sind. In den Kavitäten 9, 13 und 20 führt die Zugabe von Triton™ X-100 zu einer viel geringeren Reduktion des Sägezahnsignals als bei den anderen Kavitäten. Dies ist ein Hinweis, dass es in diesen Kammern zu einer Kontamination, beispielsweise durch Bakterien oder Pilze, gekommen sein kann.

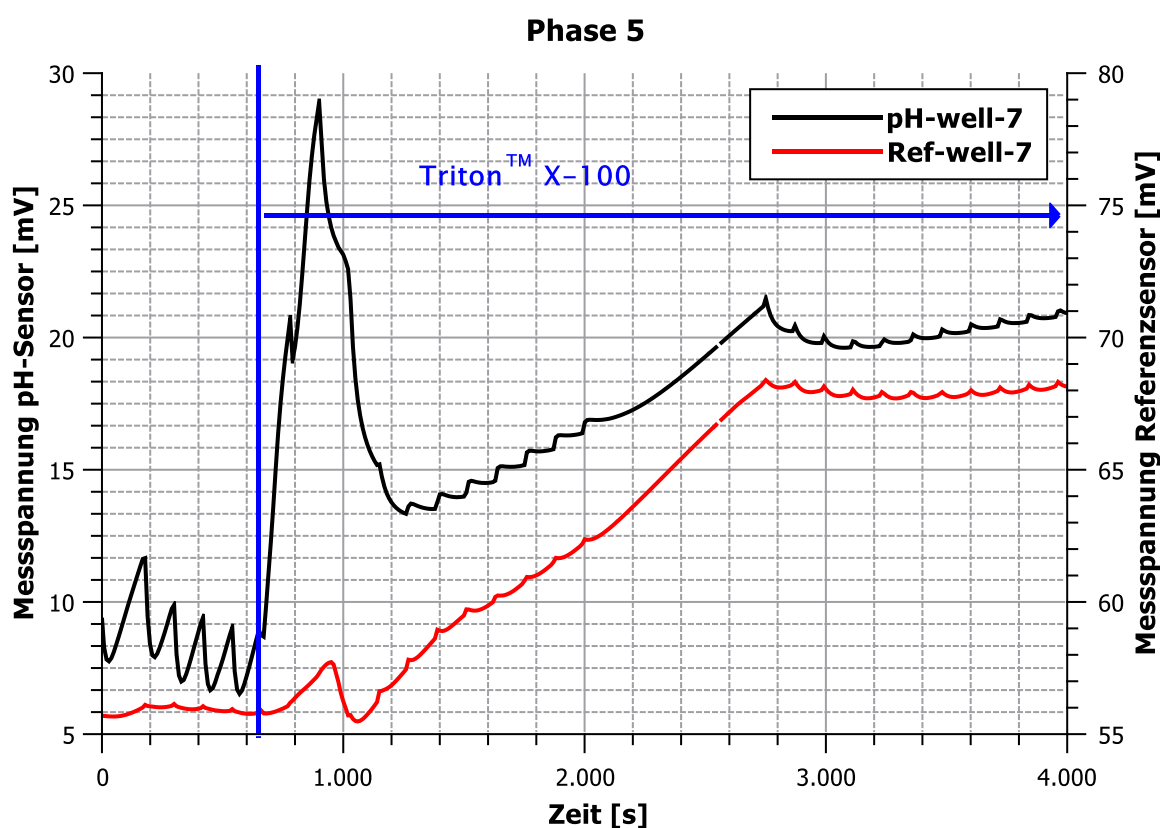


Abbildung 102: Durch die Zugabe von Triton™ X-100 in Phase 5 kommt es zum Auflösen der Zellmembranen sowie zu einem Abfall des pH-Wertes (Spannungsanstieg). Dies ist im Verlauf des pH-Sensors (schwarz) deutlich zu sehen. Auch der Referenzsensor (rot) folgt der schwarzen Kurve mit seinem charakteristisch gedämpften Verhalten. Nachdem sich der pH-Sensor stabilisiert hat, ist das für die zelluläre Ansäuerung charakteristische Sägezahnsignal nicht mehr zu erkennen und beide Messkurven haben einen sehr ähnlichen Verlauf.

Unter den zwölf mit Hydromed™ D4 beschichteten Referenzelektroden zeigen insgesamt fünf Kavitäten (1, 2, 3, 7 und 9) dasselbe gedämpfte Verhalten wie es in Kavität 7 beobachtet wurde. Kavität 11 zeigt das Muster einer blanken, nicht mit Iridiumoxid beschichteten

6.8 Zellkulturversuche

Elektrode. Bei den übrigen sieben Kavitäten steigt die Amplitude des Sägezahnsignals im Verlauf des Experimentes weiter an, bis sie eine vergleichbare Größenordnung wie der pH-Sensor erreicht. Dies deutet auf ein fortschreitendes Ablösen der Hydromed™ D4-Schicht in diesen Kavitäten hin.

6.8.2 Bestimmung der extrazellulären Ansäuerungsrate

Mittels linearer Regression wird aus den aufgenommenen Messdaten die Ansäuerungsrate der Zellen zwischen zwei Pipettiervorgängen berechnet. Für die Berechnung werden in Phase 2 die letzten 16, in den übrigen Phasen die letzten sieben Messwerte vor dem Pipettieren verwendet. Die übrigen Messpunkte werden für diese Berechnung vernachlässigt. Basierend auf Abschnitt 6.3 wird 70 mV/pH als Sensitivität der pH-Sensoren angenommen. Abbildung 103 und Abbildung 104 zeigen das Ergebnis der Auswertung für Phase 2 bzw. Phase 5. Zur besseren Gegenüberstellung wurden die Mittelwerte beider Analysen sowie die Standardabweichungen in einen gemeinsamen Graphen (Abbildung 105) übertragen. Die Ansäuerungsrate in Phase 5 vor der Zugabe von Triton™ X-100 ist mit der Ansäuerungsrate in Phase 2 vergleichbar. Nach der Zugabe fällt die Ansäuerungsrate deutlich unter dieses Niveau ab.

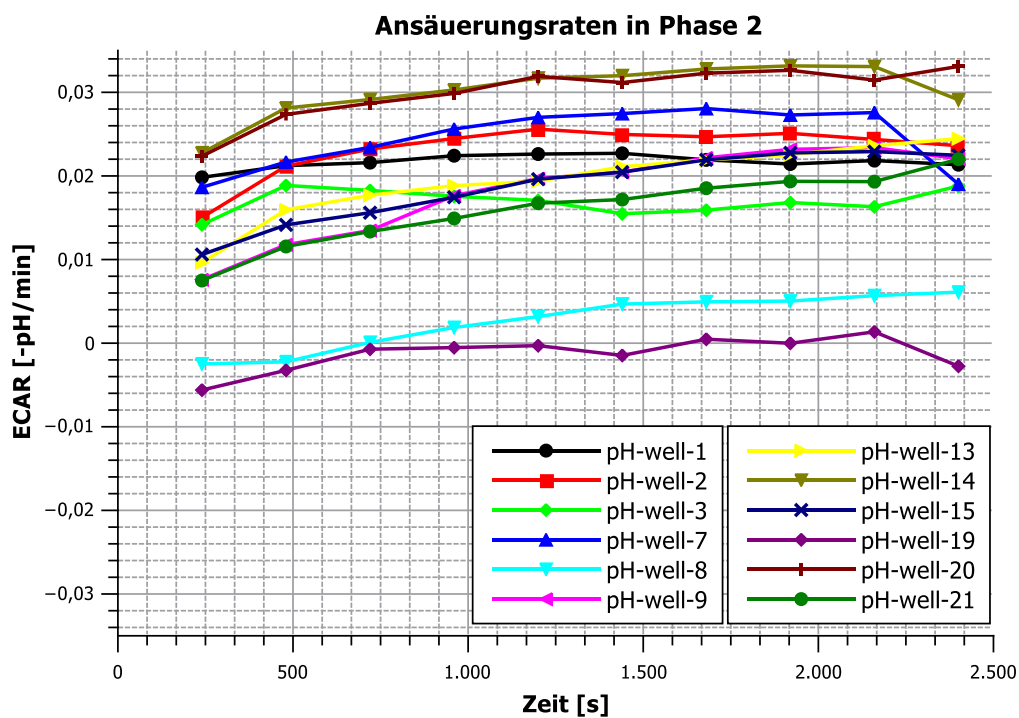


Abbildung 103: Die extrazelluläre Ansäuerungsrate wurde durch lineare Regression der Messkurve des pH-Sensors berechnet. Durch die hohe Signalqualität der pH-Sensoren sind die berechneten Ansäuerungsraten kaum verrauscht.

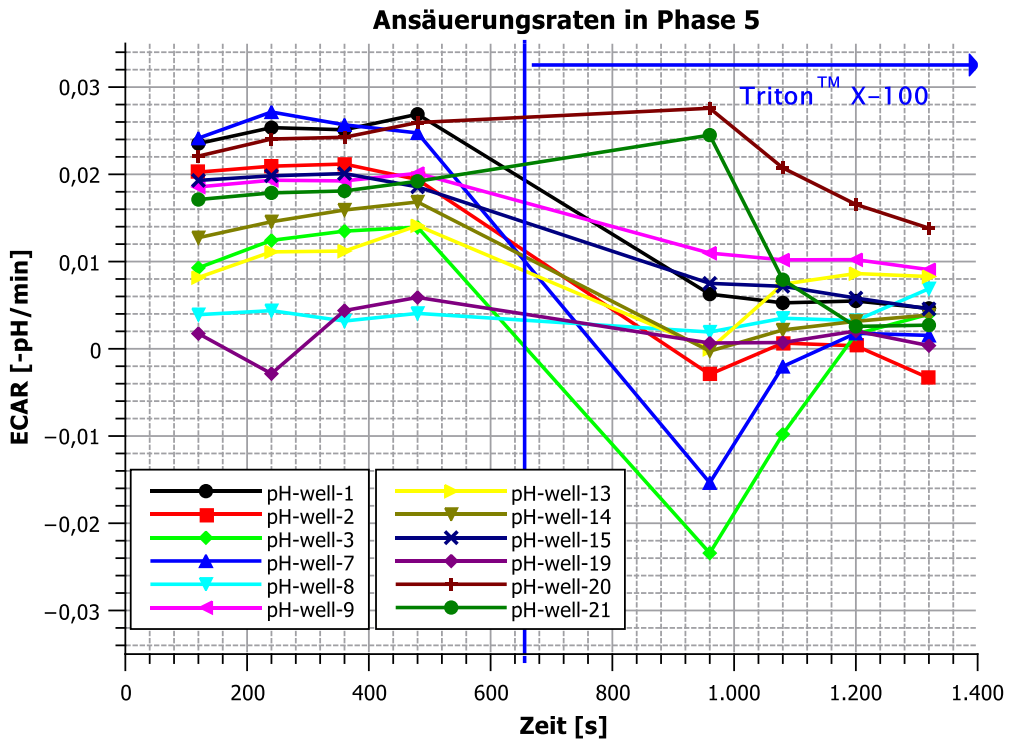


Abbildung 104: Die Auswertung der Ansäuerungsraten in Phase 5 zeigt, dass die Auflösung der Zellen durch Zugabe von Triton™ X-100 zum Abfall der Ansäuerungsrate führt.

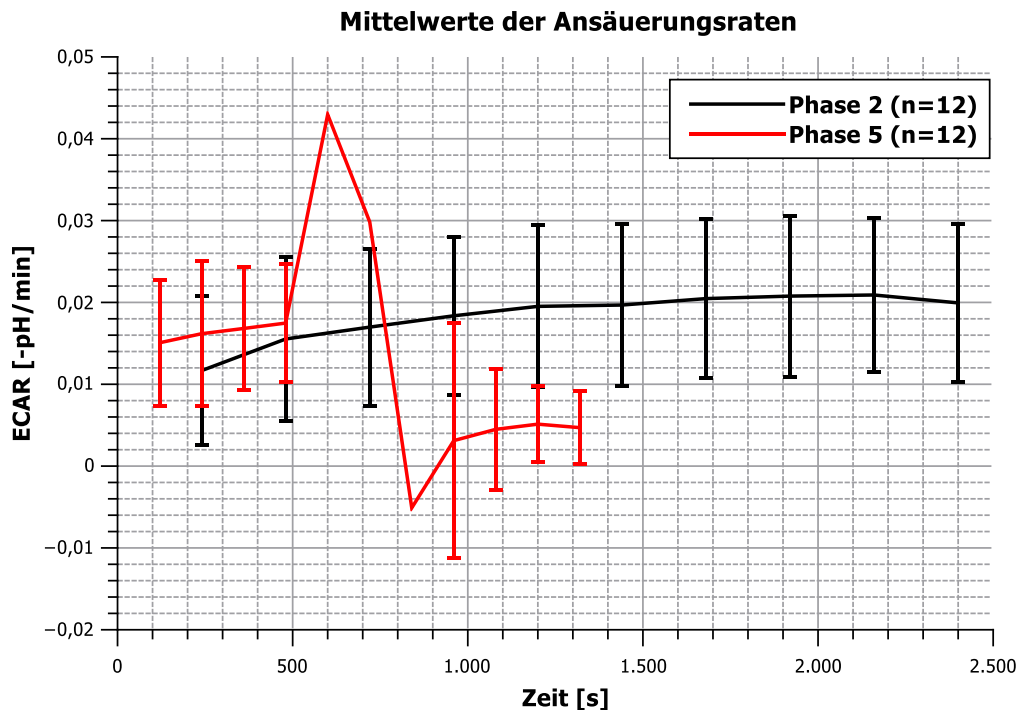


Abbildung 105: Die Gegenüberstellung der Mittelwerte der Ansäuerungsraten aus Phase 2 und Phase 5 zeigt, dass die Ansäuerungsraten der Phase 5 vor Zugabe von Triton™ X-100 in einem ähnlichen Bereich wie in Phase 2 liegen. Nachdem die Zellen aufgelöst wurden, fällt die Ansäuerungsrate erwartungsgemäß deutlich unter diese Werte.

6.8.3 Messung der Zellatmung

Das Verhalten des Sauerstoffsensors während der Phasen 2 bis 5 wird exemplarisch an den Sensoren der Kavitäten 2, 3, 4 und 5 dargestellt. Die übrigen Sauerstoffsensoren haben ein sehr ähnliches Verhalten, mit Ausnahme der Sensoren der Kavitäten 6, 7, 13, 17 und 23. Diese Sensoren zeigen kein typisches Sägezahnsignal. Als Ursache wurden Probleme mit der Gegenelektrode identifiziert. Einige Gegenelektroden der fehlerhaften Sensoren hatten Produktionsmängel, andere wurden durch Luftblasen abgedeckt, die sich in der Zellkulturkammer gefangen hatten.

Abbildung 106 stellt die Messströme der betrachteten Sensoren während der zweiten und dritten Messphase dar. Es fällt auf, dass der Strom unmittelbar nach dem Austausch des Mediums nicht linear abfällt.

Durch die Erhöhung der Frequenz des Pipettierens nimmt die Signalamplitude des Sauerstoffsensors von Phase 2 zu Phase 3 ab. Gleichzeitig steigt der Mittelwert des Sensorstroms an. Beide Effekte entsprechen dem erwarteten Ergebnis. Durch das häufigere Pipettieren wird mehr sauerstoffreiches Medium in die Kammer eingebracht. Während sich die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellkultur nicht ändert, ist die Periodendauer verkürzt, wodurch die Amplitude geringer ausfällt.

In der vierten Phase wird der Austausch des Messmediums für die Kavitäten der rechten Hälfte der Platte unterbrochen. Der Effekt auf den Sauerstoffsensor wird in Abbildung 107 dargestellt.

Drei Minuten nach dem Mediumwechsel fällt der Sauerstoffgehalt in den Kavitäten 4 und 5 annähernd linear ab. Zur Verdeutlichung dieses Effekts wird in Abbildung 108 die Ableitung des Stromverlaufs dargestellt. Der Verlauf der Signale in Kavität 2 und 3 zeigt, dass der lineare Bereich beim verkürzten Pipettierzyklus von 120 Sekunden nicht erreicht wird. Der lineare Verlauf in Kavität 4 und 5 endet, nachdem der Messstrom unter 2 nA fällt.

Sobald der Austausch des Messmediums wieder aufgenommen wird, steht den Zellen neuer Sauerstoff zur Verfügung und wird von diesen ohne erkennbare Verzögerung konsumiert. Dadurch entsteht erneut das typische Sägezahnmuster.

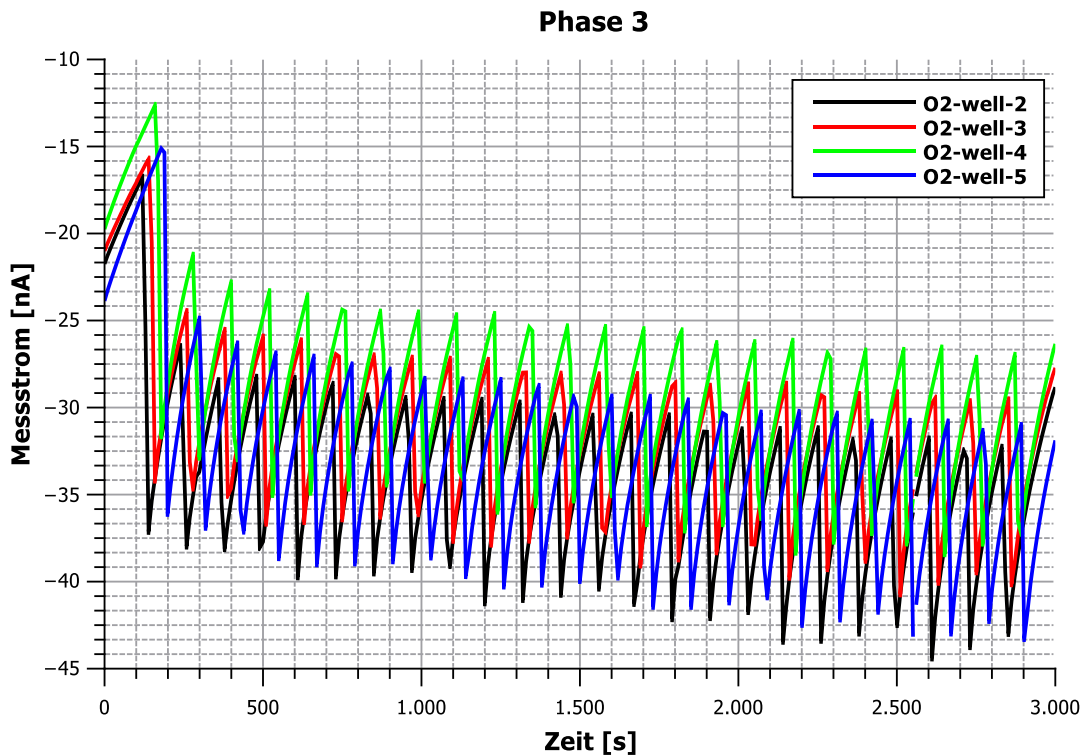
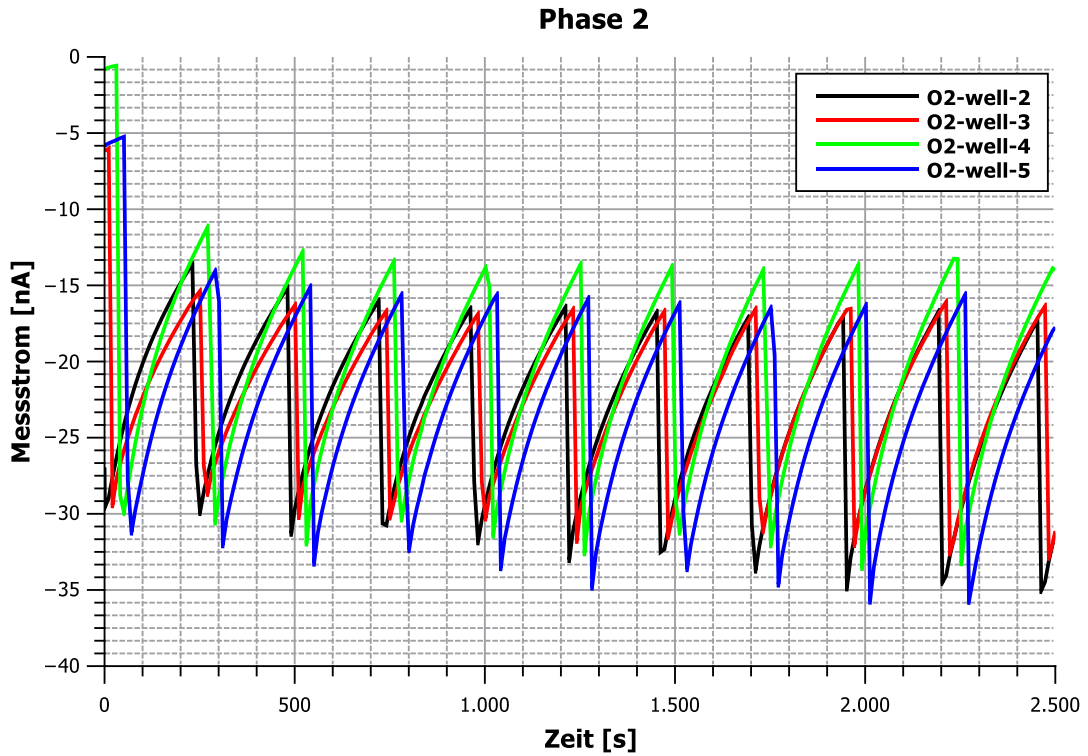


Abbildung 106: Im oberen Bild wird der Messstrom des Sauerstoffsensors in Phase 2 abgebildet. Der untere Graph zeigt den Messstrom in Phase 3. Durch den zeitlichen Versatz beim Mediumwechsel ergibt sich ein zeitlicher Versatz zwischen den einzelnen Kavitäten. Das Signal in Phase 3 hat eine geringere Amplitude und einen niedrigeren Offset als in Phase 2, dies ist durch die unterschiedliche Dauer zwischen den Pipettiervorgängen zu erklären.

6.8 Zellkulturversuche

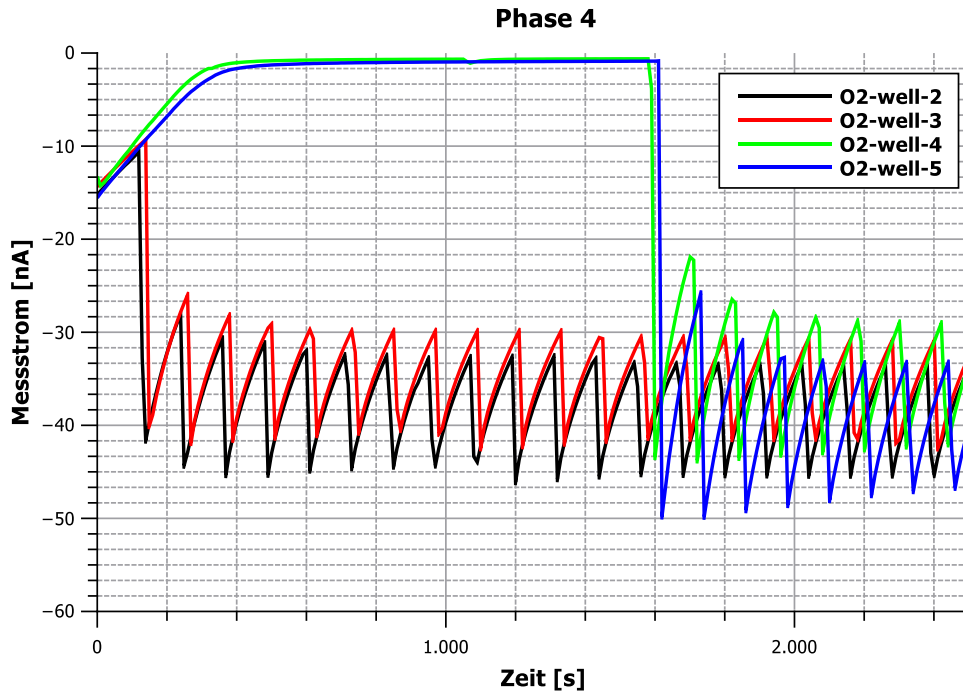


Abbildung 107: Nach Ausbleiben des Medienwechsels in den Zellkulturkammern 4 und 5 kommt es zu einer raschen Verknappung des Sauerstoffgehalts. Der Messstrom sinkt gegen null. Nachdem der Medienwechsel nach 30 Minuten wieder aufgenommen wurde, zeigt das Messsignal eine erhöhte Amplitude, die sich nach vier Zyklen normalisiert.

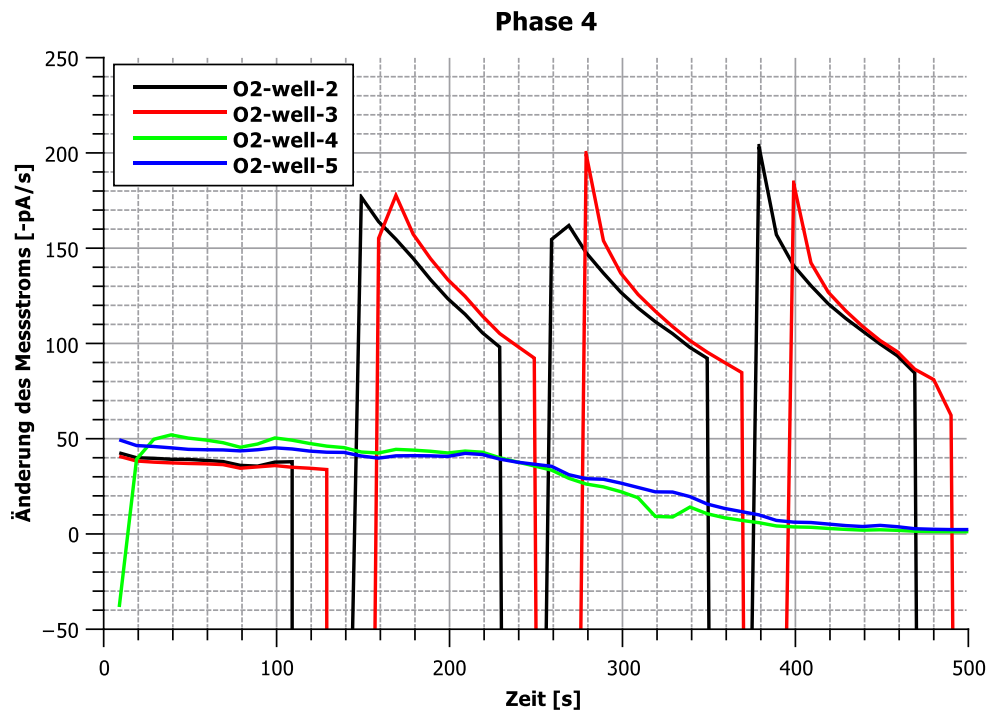


Abbildung 108: Die Ableitung des Messstroms zeigt, dass der Sauerstoffgehalt in der Zellkulturkammer ab der dritten Minute nach Tausch des Mediums linear abfällt. Fällt der Sauerstoffgehalt in der Kammer weiter ab, endet das lineare Verhalten wieder. Hieraus wird deutlich, dass neben dem zellulären Einfluss auch die Störung der Diffusionsschicht durch den Pipettiervorgang berücksichtigt werden muss.

Der Effekt der Zugabe von Triton™ X-100 in der fünften Phase wird in Abbildung 109 dargestellt. Die Amplitude des Sägezahnsignals halbiert sich und der Betrag des Mittelwerts steigt um 10 nA. Die Dynamik des Stromverlaufs verändert sich ebenso. Die Zugabe von Messmedium hat weiterhin einen deutlichen Einfluss auf den Messstrom. Ursache hierfür ist nicht der zelluläre Sauerstoffverbrauch, sondern die Konvektion durch den Pipettiervorgang, auf die ein direkt amperometrischer Sensor, wie in Abschnitt 3.6.2.2 beschrieben, reagiert.

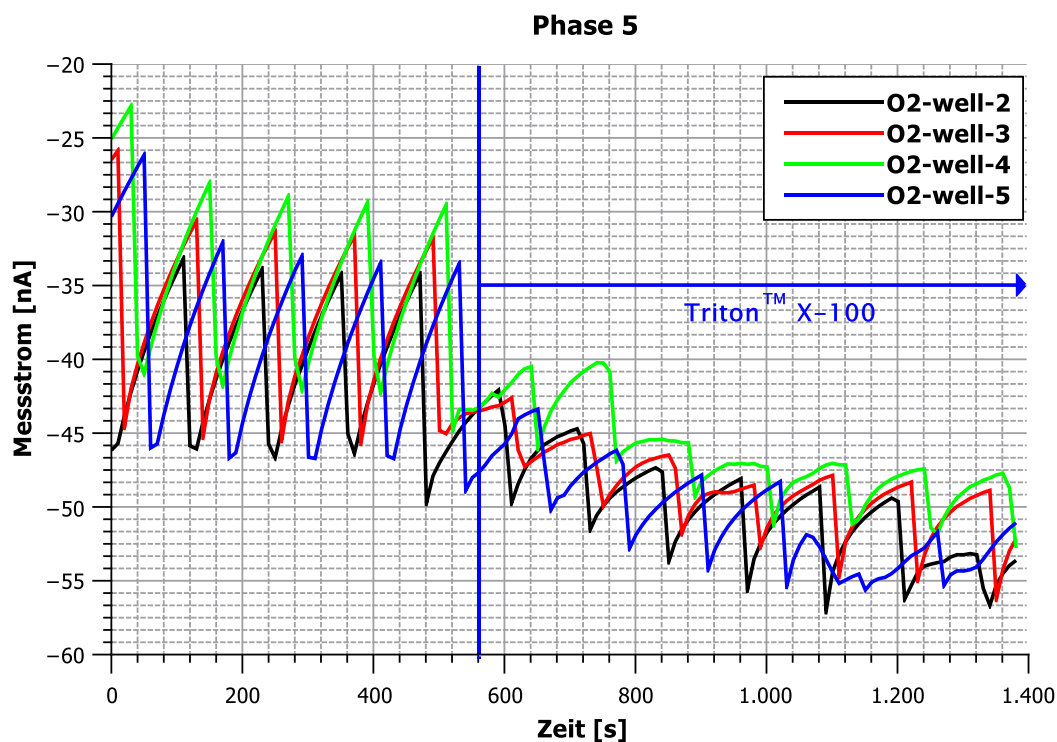


Abbildung 109: Durch die Zugabe von Triton™ X-100 werden die Zellen in der Kulturkammer aufgelöst. Daraus resultiert eine deutliche Abnahme der Amplitude des Messsignals. Bedingt durch die Konvektion des Mediums beim Pipettiervorgang bleibt die Sägezahnform des Messsignals auch nach Lyse der Zellen bestehen.

Analog zu der Auswertung der Ansäuerungsrate wird die Sauerstoffverbrauchsrate für die fünfte Phase berechnet. Hierfür werden die Messdaten aufgeteilt und den einzelnen Pumpzyklen zugeordnet. Lineare Regression wird eingesetzt, um die Steigung aus den Messpunkten der einzelnen Zyklen zu bestimmen. Die Änderungsrate des Sensorstroms wird als Äquivalent für die Sauerstoffverbrauchsrate verwendet. Abbildung 110 zeigt die entsprechenden Kurven sowie den Mittelwert und die Standardabweichung für 18 der 24 Kavitäten. Sechs Sensoren werden aufgrund der bereits genannten Probleme von der Auswertung ausgeschlossen. Die Steigung des Messstroms nimmt durch die Lyse der Zellen signifikant ab, fällt jedoch nicht gänzlich auf 0 ab.

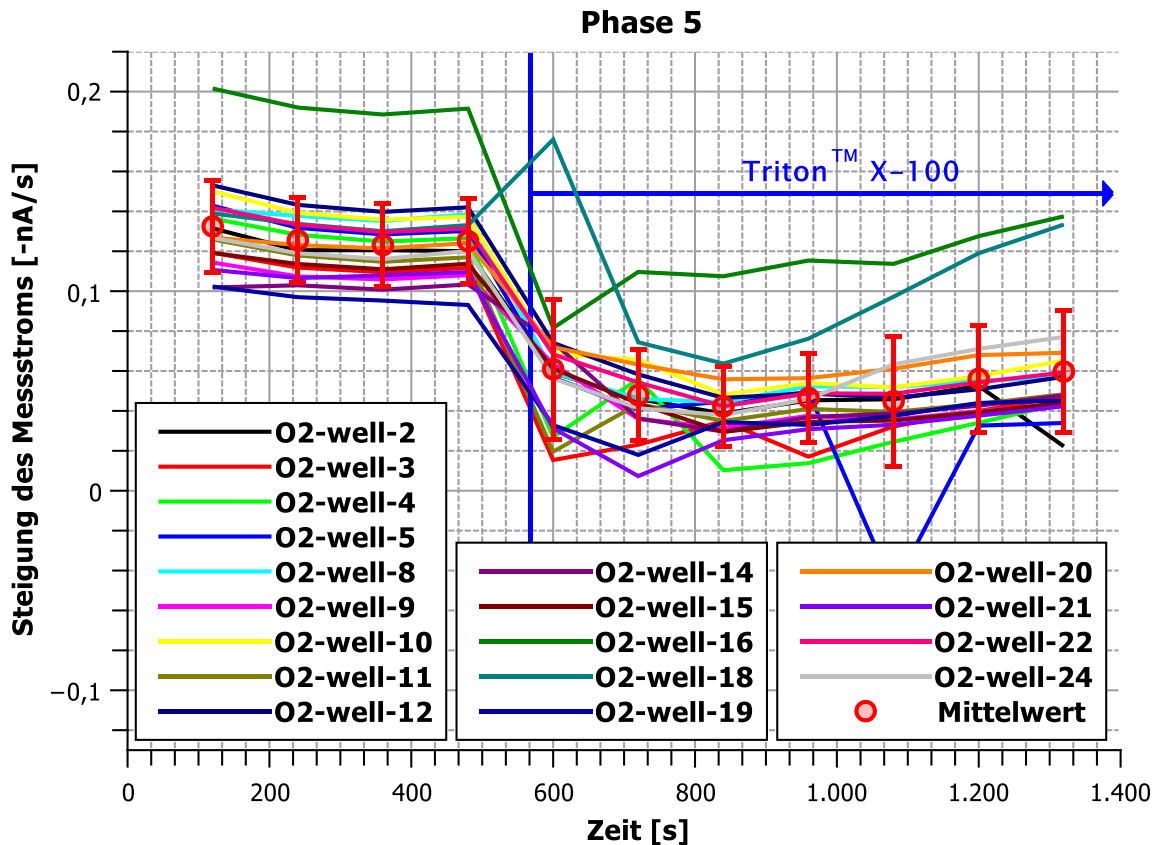


Abbildung 110: Die Steigung des Messstroms wird durch lineare Regression über die einzelnen Messperioden berechnet und für jede Zellkulturkammer aufgetragen. Mittelwert und Standardabweichung der Steigungen aller Kammern werden ebenfalls gezeigt. Die Zugabe von Triton™ X-100 bewirkt eine klar erkennbare Verringerung der Steigung.

6.8.4 ECIS

Die Auswertung der ECIS-Messung war nur bei 11 der 24 beteiligten Sensoren möglich. Die 13 übrigen Sensoren lieferten unplausibel hohe Widerstandswerte mit hoher Streuung. Als Ursachen für dieses Problem wurde bei drei der Sensoren ein Kontaktierungsproblem festgestellt. Bei zehn weiteren Sensoren wird vermutet, dass Luftblasen in der Messkammer die Auslöser des Problems waren.

Von diesen Problemen abgesehen, zeigen die Sensoren stabile und gut reproduzierbare Messergebnisse. Abbildung 111 stellt den gemessenen Verlauf des Betrags der Impedanz exemplarisch für die Kavitäten 2, 3, 4 und 5 in Phase 3 dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Austausch des Mediums einen Einfluss auf die Impedanz hat. Als Ursache dieses Phänomens kommen sowohl ein zellulärer Ursprung als auch die in Abschnitt 6.7.1 gezeigte Sensorinterferenz in Frage.

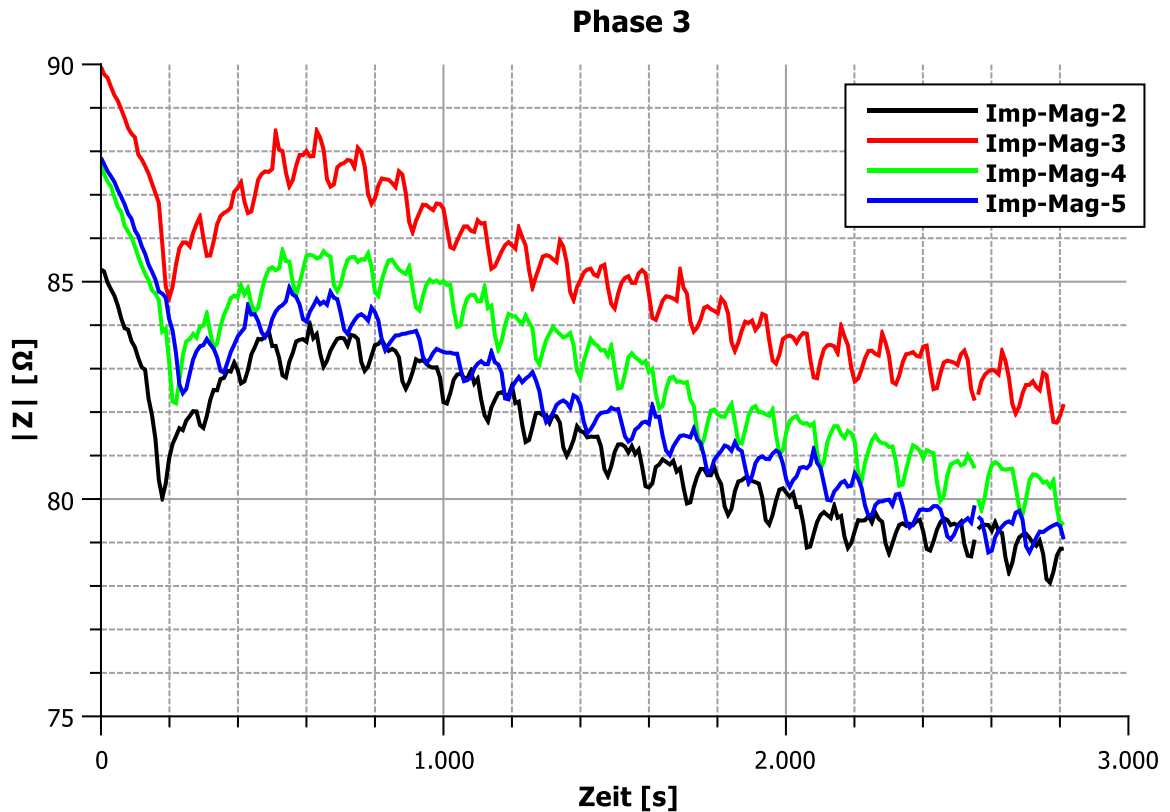


Abbildung 111: Das Messsignal der ECIS-Messung setzt sich aus einer niederfrequenten Änderung der gemessenen Impedanz sowie einem überlagerten periodischen Signal zusammen. Die Frequenz des periodischen Signals wird durch das Intervall des Mediumwechsels bestimmt.

Der Verlauf des Betrags der Impedanz für Phase 4 wird in Abbildung 112 dargestellt. In dieser Phase zeigen die Kavitäten 4 und 5 während des Aussetzens des Mediumwechsels keine periodischen Änderungen. Der Austausch des Messmediums direkt nach der langen Pause führt hingegen zu einem starken Ausschlag der gemessenen Impedanz, gefolgt von einer langsameren Relaxation hin zu den ursprünglichen Werten. Unter Berücksichtigung der bereits gezeigten Sauerstoff- und pH-Messungen in dieser Phase ist Sensorinterferenz als alleinige Ursache für einen derart hohen Ausschlag nicht plausibel.

Wird die gemessene Änderung am Impedanzsensor durch die Zellkultur verursacht, müssen zwei Effekte unterschieden werden: Der erste ist die Änderung der Leitfähigkeit durch die zelluläre Ansäuerung und die damit verbundene pH-Änderung. Der zweite Effekt ist eine Änderung des Widerstands der Zellschicht über dem Impedanzsensor, der wiederum durch morphologische Änderungen (Formänderungen) der Zellen oder durch eine Veränderung des Zellmembranwiderstands bedingt sein kann.

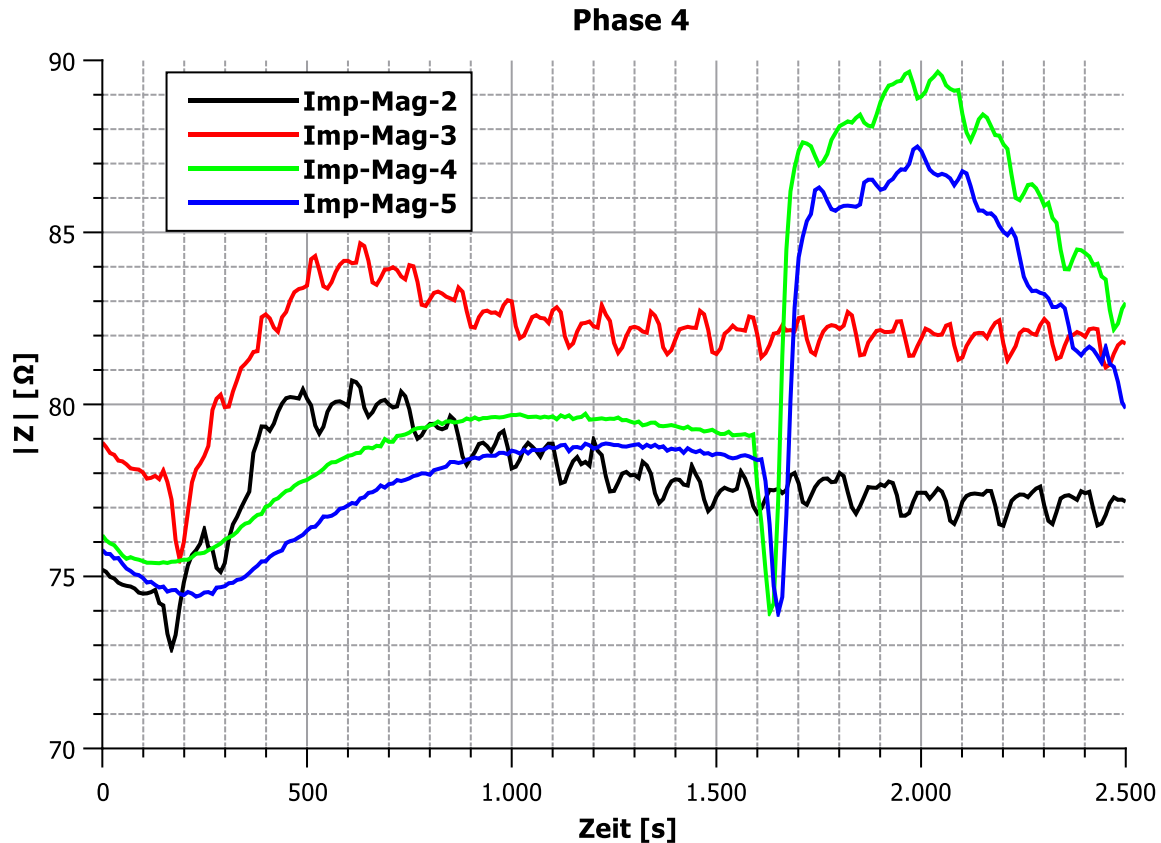


Abbildung 112: Der Mediumwechsel wurde in den Zellkulturkammern 4 und 5 innerhalb der ersten 30 Minuten ausgesetzt und danach normal fortgeführt. Das Messsignal zeigt beim Wiedereinsetzen der Nährstoffversorgung eine deutliche Änderung im Verlauf. Dies deutet auf Änderungen der Zellmorphologie oder der Struktur der Zellmembran in dieser Phase hin.

Abbildung 113 zeigt den Verlauf von pH- und Impedanzsensor in Kavität 4 während der 4. Phase. Wird die Versorgung der Zellen wieder aufgenommen, fällt der gemessene Widerstand in 30 Sekunden um etwa 5 Ω ab und steigt darauf in den nächsten 60 Sekunden um circa 13 Ω an. Die vom pH-Sensor gemessene Spannung sinkt währenddessen kontinuierlich ab. Der Verlauf beider Kurven ist zu einem großen Teil unabhängig. Somit ist der größte Teil der Änderung, die am Impedanzsensor beobachtet werden kann, auf die Änderung des Widerstands der Zellschicht zurückzuführen.

Die Lyse der Zellen durch Triton™ X-100 in Phase 5 führt zum deutlichen Abfall des Betrags der Impedanz. Dies wird in Abbildung 114 für die elf betrachteten Sensoren gezeigt.

Obwohl der Mediumwechsel nach der Zugabe von Triton™ X-100 periodisch fortgesetzt wurde, zeigt der Verlauf der Messdaten keinen periodischen Anteil. Dies deutet erneut darauf hin, dass der periodische Verlauf der Impedanzmessung eine Reaktion der Zellen selbst auf den Mediumwechsel oder die damit einhergehende Strömung darstellt.

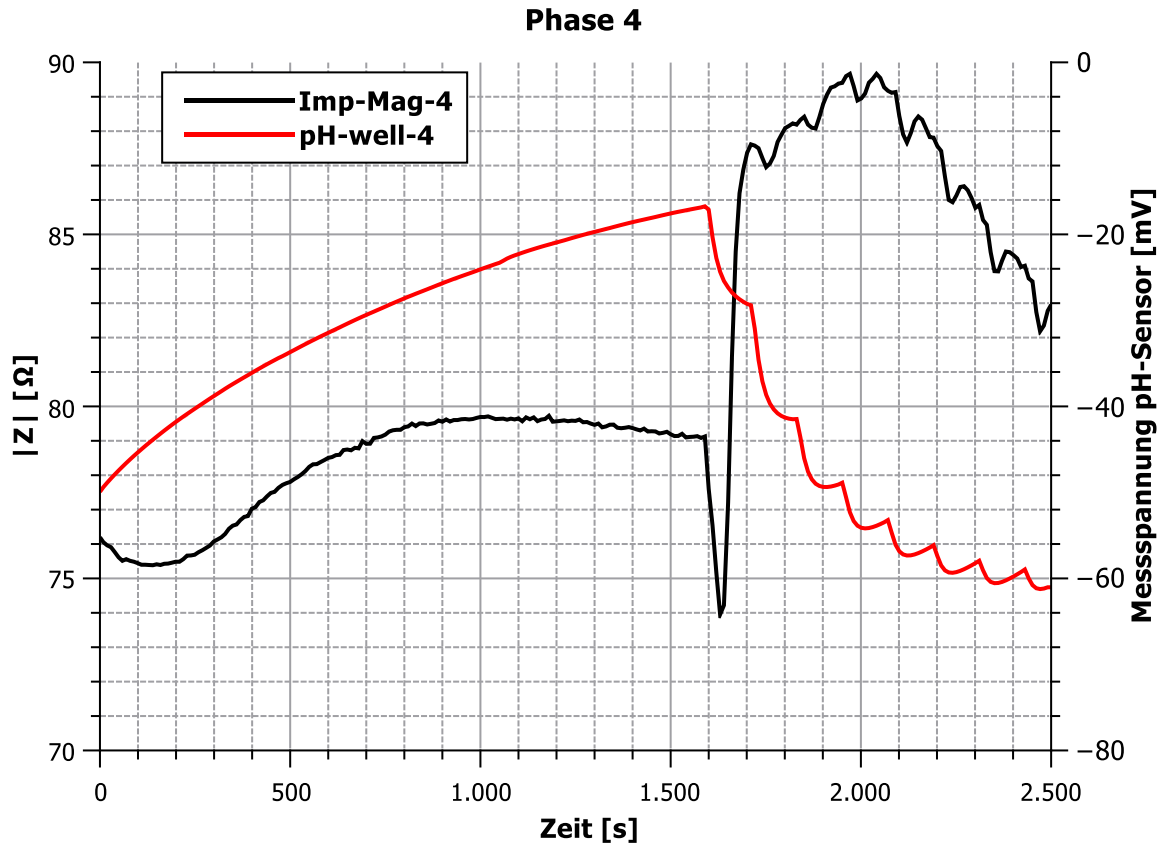


Abbildung 113: In Phase 4 findet in der dargestellten Kavität (Nr. 4) in den ersten 30 Minuten kein Mediumwechsel statt. In dieser Zeit steigt die gemessene Spannung des pH-Sensors (schwarze Kurve, rechte Skala) um 10 mV an. Dies entspricht beim verwendeten pH-Sensor einem Abfall von ca. 0,14 pH. Der Betrag der Impedanz (grüne Kurve, linke Skala) steigt zu Beginn ebenfalls an und stagniert dann. Nachdem der Mediumwechsel wieder aufgenommen wurde, fällt die Spannung des pH-Sensors kontinuierlich ab. Nach drei Zyklen ist das typische Sägezahnmuster wieder zu erkennen. Der gemessene Widerstand fällt nach dem ersten Austausch des Zellkulturmediums kurz ab und steigt dann wieder über den Ursprungswert hinaus an.

In Abbildung 115 werden der Impedanz- und der Sauerstoffsensoren der 4. Kavität isoliert dargestellt. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt 6.8.3 besprochen wurde, zeigt der Sauerstoffsensoren auch nach dem Auflösen der Zellen ein periodisches Signal geringerer Amplitude, das allein durch den Medienwechsel verursacht wird. Der Impedanzsensor ist hiervon nicht betroffen. Nach Auflösen der Zellen bleibt der Betrag der gemessenen Impedanz bis auf eine geringe Drift von 0,3 Ω stabil.

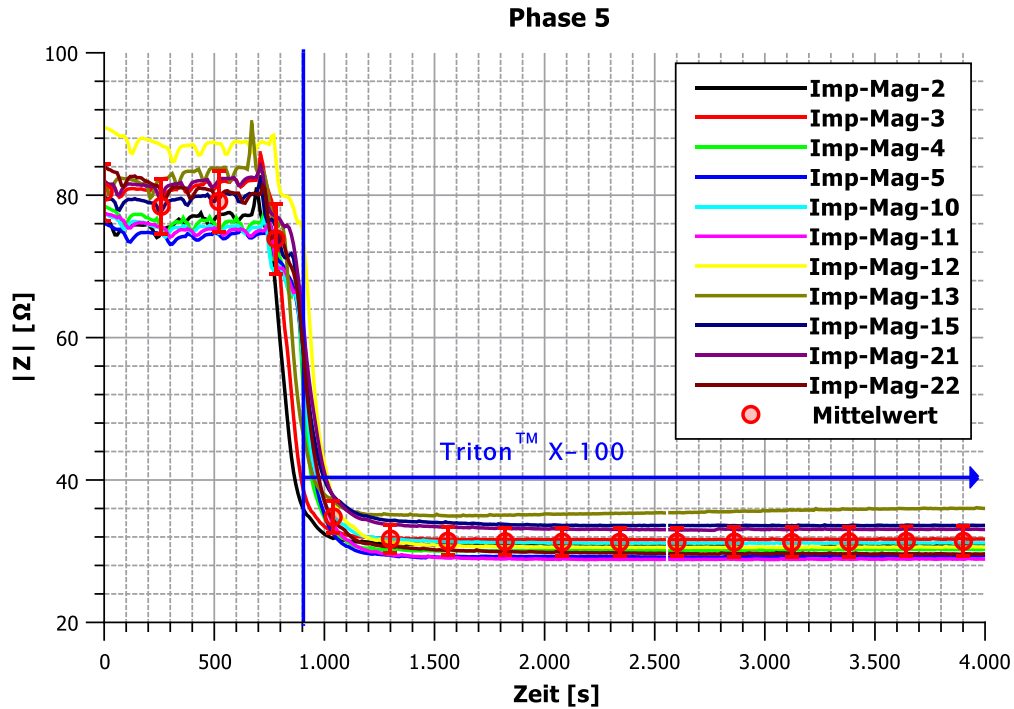


Abbildung 114: Die Zugabe von Triton™ X-100 führt zur Lyse der Zellen und somit zum Abfall des Betrags der gemessenen Impedanz. Der Pipettiervorgang wurde nach Zugabe periodisch weitergeführt, dennoch verschwindet der periodische Anteil nach Zerstörung der Zellen aus dem Messsignal.

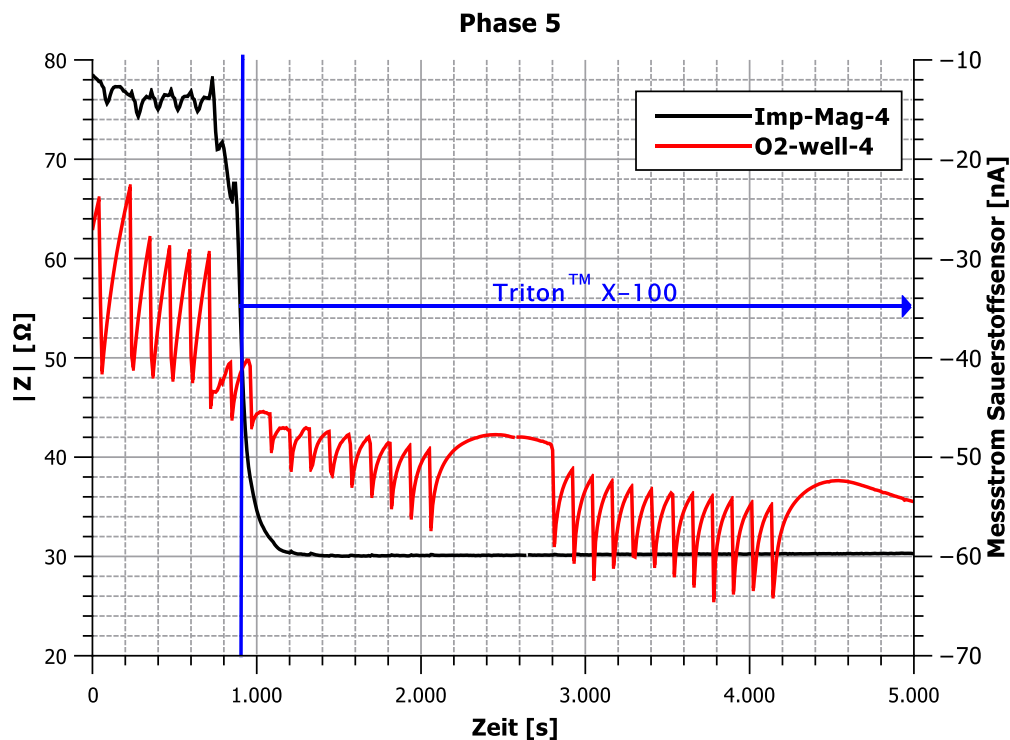


Abbildung 115: Nach dem Auflösen der Zellen durch Triton™ X-100 fällt der Betrag der Impedanz auf etwa 30 Ω ab und hält diesen Wert auf 0,3 Ω genau. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Impedanz- und Sauerstoffmessung ist nicht zu erkennen.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

7.1 Multiparametrische Messung in einer Mikrotiterplatte

Kapitel 4.1 behandelt im Detail, wie Interferenzen zwischen elektrochemischen Sensoren entstehen und wie sie zu vermeiden sind. Die Ergebnisse daraus können in zwei wesentlichen Punkten zusammengefasst werden:

1. Der Potentialunterschied zwischen Messschaltung und Elektrolyt muss definiert und stabil sein.
2. Der Stromfluss durch den Elektrolyten muss ausreichend klein gehalten werden.

Punkt 1 schließt nicht aus, dass mehrere Referenzelektroden an der Messung beteiligt sein dürfen. Jeder Sensor kann beispielsweise mit einer eigenen Referenzelektrode ausgestattet werden, die nah an der Arbeitselektrode platziert wird. Hierdurch kann der iR -Fehler minimiert werden, wenn amperometrische und potentiometrische Sensoren gleichzeitig betrieben werden. An der Regelung der Potentialdifferenz zwischen Schaltung und Elektrolyt darf hingegen lediglich eine Referenzelektrode beteiligt sein. Ansonsten können bereits kleine Spannungsdifferenzen zwischen den Referenzelektroden zu störenden Ausgleichsströmen im Elektrolyt führen. Werden die Referenzelektroden nicht hochohmig an die Messschaltung angeschlossen, kann es zusätzlich zu Stromfluss durch diese Elektroden kommen. Vor allem kleine Referenzelektroden können dadurch degradieren und so zu Messfehlern führen.

Punkt 2 zielt darauf ab, den iR -Fehler durch die Reduktion des Stromflusses i zu minimieren. In einer kleinen Messzelle bietet es sich an, kleine Elektroden zu verwenden, die bei der gleichen Stromdichte einen geringeren Stromfluss durch die Zelle verursachen. Durch die Abhängigkeit der amperometrischen Sensoren vom diffusiven Stofftransport, bieten kleine Elektroden zusätzlich den Vorteil einer schnelleren Ansprechzeit.

Für die Interferenz zwischen elektrochemischen Sensoren gilt als Faustregel, dass Elektroden, die keinen Strom führen, auch keine anderen elektrochemischen Messungen beeinflussen können. Dies gilt lediglich im idealisierten Fall, in dem der angeschlossene Verstärker einen unendlich hohen Eingangswiderstand hat und die Elektrode im stromfreien Fall nicht mit dem Medium reagiert bzw. sich nicht auflöst.

7.2 Weiterentwicklung der Sensortechnologie

In der Praxis müssen auch andere Effekte berücksichtigt werden. Dies betrifft vor allem die nichtidealen Eigenschaften der elektrischen Komponenten im Front-End des Sensors der Messelektronik. So haben Operationsverstärker, die mit Bipolartransistoren aufgebaut sind, einen derart hohen Eingangsstrom, dass der Eingangswiderstand nicht als unendlich hoch angenommen werden kann. Operationsverstärker mit MOSFET-Eingängen sind häufig mit ESD-Schutzdioden ausgestattet, die den Eingangswiderstand negativ beeinflussen. Dieser Effekt ist besonders groß, wenn die Versorgungsspannung des Operationsverstärkers getrennt wird. Eine korrekt ausgelegte und funktionierende Messschaltung kann deshalb im ausgeschalteten bzw. unversorgten Zustand zu Stromfluss durch Elektroden führen, obwohl diese hochohmig angeschlossen sind. Dies kann zu temporären Fehlern oder zum Ausfall von Elektroden führen.

Beim Entwurf des analogen Front-Ends muss neben den oben genannten Aspekten das dynamische Verhalten der Schaltung betrachtet werden. Hohe kapazitive Lasten in der Rückkopplungsschleife eines Operationsverstärkers können bekanntermaßen zu Instabilität oder Oszillation führen. Die Bandbreite der Operationsverstärker muss stets unter Berücksichtigung des Gesamtsystems gewählt werden. Besondere Bedeutung hat hierbei die Regelung der Potentialdifferenz zwischen dem Elektrolyten und der Messelektronik. Die Bandbreite dieses Reglers muss hoch genug sein, um auf Störungen zu reagieren, die durch die übrigen Sensoren oder von externen Quellen verursacht werden. Ansonsten kann es zu Potentialverschiebungen und den damit verbundenen Messfehlern kommen.

7.2 Weiterentwicklung der Sensortechnologie

Soll eine sensorbestückte Mikrotiterplatte für Zellkulturversuche eingesetzt werden, muss die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Kavitäten sichergestellt werden. Ansonsten kann kein valides experimentelles Setup erzeugt werden. Aus diesem Grund ist es erstrebenswert, Sensoren mit möglichst homogenen Eigenschaften auf einer Platte zu erzeugen. Besonders die vergleichbare Messung von relativen Änderungen wird in der vorliegenden Arbeit betrachtet, da die relativen Änderungen geeignet sind, um einen Zustandswechsel der Probe zu signalisieren. Nichtsdestotrotz sind absolute Messwerte nützliche Parameter für die Qualitätskontrolle und können für den Vergleich verschiedener Experimente sinnvoll sein.

7.2.1 Iridiumoxidbasierter pH-Sensor

Der in dieser Arbeit entwickelte pH-Sensor besteht aus einem Array aus mehreren Iridiumoxid-Mikroelektroden. Durch die Verwendung von Mikroelektroden werden die Edukte der Abscheidung mittels sphärischer Diffusion zur Elektrode transportiert. Hierdurch kann mit einer konstanten Abscheidungsspannung ein konstanter Abscheidungsstrom gewährleistet werden. Es wird angenommen, dass die konstanten Abscheideparameter zu den verbesserten Eigenschaften des pH-Sensors führen. Wider Erwarten hat sich die Qualität der Abscheidung in Vorversuchen durch das gleichzeitige Schütteln der Lösung verbessert. Das Schütteln wurde aus diesem Grund in das Abscheidungsprotokoll übernommen. Die genauen Ursachen und Hintergründe dieser Verbesserung wurden nicht weiter untersucht.

Durch die vorgestellte Methode der Abscheidung ist es möglich, bis zu 24 Elektroden in getrennten Kavitäten gleichzeitig zu beschichten. Hierdurch reduziert sich die Zeit, welche für die Herstellung aller pH-Sensoren einer Platte benötigt wird, von sechs Stunden auf 30 Minuten. Die Abscheidung des Iridiumoxids führte bis auf wenige Ausnahmen, die durch Kontaktierungsprobleme verschuldet sind, zum Erfolg. Ein häufig auftretendes Problem war die unbeabsichtigte Beschichtung von Elektroden, die bewusst nicht an den Potentiostaten angeschlossen wurden. Es wird vermutet, dass Ausgleichsströme zwischen den einzelnen Kavitäten für diesen Effekt verantwortlich sind. Solche Ströme fließen über Elektroden, die nicht mit dem Potentiostaten verbunden, aber dennoch untereinander kurzgeschlossen sind. Durch diesen Kurzschluss wird ein weiterer Strompfad zwischen den Kavitäten erzeugt.

Die Ergebnisse legen dar, dass die hergestellten Iridiumoxidelektroden eine gut reproduzierbare pH-Sensitivität von 72 mV/pH aufweisen. Alle höheren Abweichungen der pH-Sensitivität sind auf einen Fehler bei der Dosierung zurückzuführen, der durch den verwendeten Pipettierroboter verursacht wurde. Die absolute Potentialabweichung einer Gruppe von 24 pH-Sensoren wurde zu 55 mV bestimmt. Dies stellt bereits eine Verbesserung zur Spannweite von 83 mV dar, die von Carroll und Baldwin [172] berichtet wurde. Um diese Abweichung weiter zu reduzieren, muss das Potential der Arbeitselektrode während der Abscheidung in jeder einzelnen Kavität für sich geregelt werden. Dies wäre beispielsweise mit einer modifizierten Version der entwickelten Messelektronik möglich. Zusätzlich sollte die in jeder Kavität integrierte (Pseudo-)Referenzelektrode verwendet werden. Die Abscheidelösung muss in diesem Fall modifiziert werden, so dass sie eine definierte Chloridionenkonzentration aufweist. Dies kann beispielsweise durch die Zugabe von Kaliumchlorid erreicht werden.

7.2 Weiterentwicklung der Sensortechnologie

Ein anderer Einflussfaktor auf den Offsetfehler ist die in [105] beschriebene stromlose Fortführung der Abscheidung nach Abschalten des Zellstromes. Eine Erklärung dieses Phänomens liefern die verschiedenen Redox-Zustände, in denen Iridiumoxid vorliegen kann. Der Übergang von einem Zustand in einen anderen kann als Energielieferant für die Weiterführung der Abscheidung dienen. Um den Offsetfehler zu minimieren, sollte dieser Prozess besser kontrolliert und das Iridiumoxid in einen definierten Redox-Zustand überführt werden.

Ein anderes Problem tritt auf, wenn sehr kleine Mikroelektroden (z. B. mit einem Durchmesser von 20 μm) mit SU-8 3000 Lack hergestellt werden. Hier können sich Luftblasen auf der Mikroelektrode fangen und die Abscheidung von Iridiumoxid verhindern. Eine Plasmabehandlung des Substrates kurz vor der Abscheidung behebt dieses Problem. Der Effekt der Plasmabehandlung lässt jedoch nach etwa drei bis fünf Tagen nach, was die Lagerung dieser Sensorchips bis zur Abscheidung stark einschränkt. Die Anhaftung von Luftblasen bei sehr kleinen Mikroelektroden kann verhindert werden, wenn der SU-8 Lack durch eine Kombination aus Siliziumnitrid- und Siliziumoxidschichten ersetzt wird [64, 66, 188].

7.2.2 Iridiumoxidbasierte Referenzelektrode

Ein bemerkenswertes Ergebnis der Versuche ist die Tatsache, dass Iridiumoxid durch die Beschichtung mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 erfolgreich als Referenzelektrode eingesetzt werden kann. Die Auswertung der Messungen zeigt bei diesen Referenzelektroden ein ungleiches Verhalten zwischen den einzelnen Kavitäten. Während das typische Sägezahnsignal bei einem Teil der Referenzelektroden ausreichend gedämpft wird, zeigt es sich beim anderen Teil der Elektroden weniger stark ausgeprägt.

Dieses Verhalten lässt sich durch zwei Ursachen erklären: Die erste liegt in dem händischen Auftrag des Hydrogels auf der Iridiumoxidelektrode und den daraus resultierenden Schwankungen der Schichtdicke, die wiederum Einfluss auf die Diffusion hat. Die zweite Ursache ist die mäßige Haftung des Hydrogels auf dem verwendeten Foliensubstrat. Dies kann bei den Referenzelektroden zu einer kompletten oder partiellen Delamination führen. Das Haftungsproblem wird als Hauptursache gesehen, da während der Messung bei einem Teil der Referenzelektroden eine Zunahme der Signalamplitude über die Zeit beobachtet wird und diese nicht durch eine steigende Zellaktivität zu erklären ist.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Verwendung dieser Referenzelektrode nur eine Aussage über die relative pH-Änderung erlaubt, da das Hydrogel lediglich als Tiefpassfilter

über dem Sensor wirkt und nicht die pH-Sensitivität des Sensors blockiert. Dennoch stellt diese Referenzelektrode aufgrund der guten Biokompatibilität von Hydromed™ D4 und Iridiumoxid eine interessante Alternative zur Silberchlorid-Referenzelektrode dar. Die Iridiumoxid-Referenzelektrode kann prinzipiell auch für den Sauerstoffsensor eingesetzt werden. Die Auswirkungen von Drift- und Offsetfehler müssen in diesem Fall genauer untersucht und bewertet werden. Auch muss der pH-Wert des verwendeten Zellkulturmediums bekannt und über den gesamten Versuchszeitraum konstant sein.

7.2.3 Sauerstoffsensor

Der Einsatz von Mikroelektrodenarrays zeigt sich bei der Verbesserung des Sauerstoffsensors als erfolgversprechend. Die reproduzierbarsten Ergebnisse liefern die Gold-Mikroelektroden auf dem Foliensubstrat. Die einzelnen Mikroelektroden haben einen Durchmesser von 140 μm und wurden mit Lötstop-Lack strukturiert. Ohne Kalibration liegt ihre Genauigkeit (nach Definition in Abschnitt 6.2.1) bei etwa zwei Volumenprozenten. Als Nachteil ist die lange Zeit für die Ausbildung der Diffusionsschicht zu nennen und die damit einhergehende Relaxationszeit des Messstromes von 180-200 Sekunden. Da sich die Diffusionsschicht nach jedem Pipettiervorgang neu ausbilden muss, tritt der Effekt während der Zellkulturexperimente periodisch auf. Die lange Relaxation des Messstromes kann in der Auswertung eines Experimentes mit dem zellulär bedingten Sauerstoffverbrauch verwechselt werden, da sich beide Effekte überlagern. Deswegen ist für die präzise Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate ein Sensor nötig, dessen Relaxationszeit wesentlich kürzer ist als die Dauer zwischen zwei Medienwechseln.

Mit Hilfe der SU-8-Isolation konnten wesentlich kleinere Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 20 μm hergestellt werden. Wie erwartet, haben diese Sensoren wesentlich kürzere Relaxationszeiten und erreichen einen stationären Stromfluss bereits nach 20 Sekunden. Bei dieser Variante des Sensors kommt es jedoch zu Problemen, da sich Luftblasen auf dem Sensor bilden und so einzelne Mikroelektroden blockieren. Dies führt zu schwer reproduzierbaren Messergebnissen und zufälligen Sprüngen der Messwerte. Um die Luftblasenproblematik zu lösen, bietet sich – wie bereits erwähnt – die Verwendung von Siliziumnitrid in Kombination mit Siliziumoxid als Passivierungsschicht an [64, 66, 188].

Alternativ können größere Arbeitselektroden eingesetzt werden, wenn das von van Rossem entwickelte Messprotokoll [188] (vgl. Abschnitt 3.6.2.4) verwendet wird. So kann der Sauerstoffgehalt bereits kurz nach der Polarisierung der Elektrode bestimmt werden. Hierzu

7.2 Weiterentwicklung der Sensortechnologie

muss die Arbeitselektrode jedoch kontinuierlich umpolarisiert werden. Dies kann im biologisch relevanten Medium zu einer beschleunigten Degeneration der Elektrode führen [246].

Die Messung des Sauerstoffgehalts kann sowohl mit einer Polarisierungsspannung von 0,7 V als auch mit 0,5 V durchgeführt werden, ohne die Genauigkeit des Sensors zu beeinflussen. Eine geringere Polarisierungsspannung bietet sich hinsichtlich einer längeren Lebensdauer des Sensors an. Dies muss jedoch in geeigneten Langzeitversuchen separat analysiert werden.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass Verdunstungseffekte Einfluss auf den Messstrom des Sensors haben. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da die Verdunstung Einfluss auf den pH-Wert der Messlösung hat. Der pH-Wert ist wiederum am elektrochemischen Potential der Sauerstoffreduktionsreaktion beteiligt, was aus Reaktionsgleichung (3.7) ersichtlich ist. Um künftig die Langzeitstabilität des Sauerstoffsensors zu untersuchen, muss die Verdunstung des untersuchten Mediums über die gesamte Dauer des Experiments verhindert werden.

Während eines Zellkulturversuches kommt es durch den zellulären Metabolismus in der Regel zu einer unvermeidbaren Schwankung des pH-Wertes, welche Einfluss auf die Sauerstoffmessung hat. Durch die hohe Auflösung des entwickelten pH-Sensors kann die Periodendauer so kurz gewählt werden, dass die Schwankung 0,1 pH nicht überschreitet. Dennoch sollte die Querempfindlichkeit des Sauerstoffsensors auf den pH-Wert des Zellkulturmediums exakt bestimmt werden, um eine rechnerische Kompensation zu ermöglichen.

Durch das Aufbringen des Hydrogels Hydromed™ D4 auf die Arbeitselektrode wurde die Genauigkeit des Sensors tendenziell leicht verschlechtert. Dies liegt daran, dass sich die Sensitivität etwas verringert und gleichzeitig die Standardabweichung minimal erhöht hat. Beides lässt sich erklären, wenn davon ausgegangen wird, dass Sauerstoff im Hydrogel eine geringere Diffusionskonstante als im Medium besitzt. Nach Formel (3.11) folgt daraus der geringere Messstrom. Die höhere Standardabweichung lässt sich durch Schwankungen der Schichtdicke des Hydrogels erklären, da das Aufbringen mit dem Handdispenser erfolgte.

Eine Hydrogelschicht auf der Arbeitselektrode kann den Sensor auf mehrere Arten verbessern, wenn diese mit einer definierten Schichtstärke aufgebracht werden kann. So können Störungen durch Konvektion des Mediums besser unterdrückt werden. Durch die Variation der Schichtdicke kann die Ansprechzeit des Sensors angepasst werden. Wird das Hydrogel entsprechend modifiziert, kann die Arbeitselektrode beispielsweise durch das Aufbringen einer

zusätzlichen sauerstoffselektiven Schicht auf das Hydrogel vor degenerativ wirkenden Stoffen aus dem Messmedium geschützt werden [184].

7.2.4 Impedanzsensor

Die untersuchten Impedanzsensoren haben im Mittel eine Zellkonstante von $0,131 \text{ cm}^{-1}$ mit einer Schwankungsbreite von $\pm 5,7 \%$. Der Elektrodenwiderstand der einzelnen Sensoren verursacht einen Offsetfehler, der im Mittel $31,5 \Omega$ beträgt und zwischen 19Ω und 45Ω variieren kann.

Die Schwankung der Zellkonstante kann entweder auf die Fertigungstoleranz bei der Herstellung der Messelektroden oder auf eine nachträgliche Verformung des Foliensubstrates zurückgeführt werden. Flexible Substrate stellen für großflächige Impedanzsensoren eine besondere Herausforderung dar, da sich durch leichtes Biegen oder Wölben der Folie eine geometrische Änderung und dadurch eine Änderung der Zellkonstante ergeben kann.

Die Schwankung des Elektrodenwiderstands kann nur zum Teil durch den Zuleitungswiderstand oder die Geometrie der Elektroden erklärt werden. Es wurde festgestellt, dass die Höhe dieses Fehlers bei Elektroden am geringsten ist, die bereits in vorangegangenen Messungen über einen längeren Zeitraum von zwölf Stunden eingesetzt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass der Zustand der Elektrodenoberfläche ebenfalls ein entscheidender Faktor für die Schwankung des Elektrodenwiderstands ist. Ein neuer Impedanzsensor erreicht folglich erst nach einer mehrstündigen Einlaufphase die höchstmögliche Genauigkeit. Um die Streuung zwischen neuen Sensoren bereits zu Beginn der Messung zu reduzieren, muss die Oberfläche der Elektroden in einen definierten Zustand überführt werden. Dies kann beispielsweise über das Anlegen einer höheren Wechselspannung im Bereich von $0,3\text{-}0,8 \text{ V}$ erfolgen. Kommerzielle Leitfähigkeitsmessgeräte setzen diese Methode häufig ein, um dem Alterungsprozess der Messelektroden entgegenzuwirken. Während eines Zellkulturversuchs ist der Einsatz jedoch nicht möglich, da die Zellen durch die hohen Potentiale geschädigt werden können.

Der entwickelte Impedanzsensor besteht aus zwei gleichgroßen ineinandergreifenden Fingerelektroden. Eine derartige Elektrodenanordnung wird häufig für ECIS verwendet, wenn eine großflächige Beobachtung der Zellkultur gewünscht ist. Die Besonderheit der untersuchten Sensorkonfiguration ist die gleichzeitige Verwendung einer der beiden Fingerelektroden als Gegenelektrode für alle Sensoren in der Kavität. Auch die Art der Spannungseinprägung unterscheidet sich von den in den Vorarbeiten verwendeten Methoden: Anstatt die Spannung

7.2 Weiterentwicklung der Sensortechnologie

zwischen den beiden Fingerelektroden zu regeln, wird die eingeprägte Spannung auf die gemeinsame Referenzelektrode bezogen. Durch diese Maßnahme sollte die Impedanzmessung vom Zustand der Gegenelektrode entkoppelt werden, um Interferenzen zwischen den Sensoren zu verhindern. Diese Annahme erweist sich im Nachhinein als falsch. Es stellt sich heraus, dass durch die Sauerstoffmessung eine geringe aber zweifelsfrei messbare Beeinflussung der Impedanzmessung verursacht wird. Für dieses Phänomen kommen zwei mögliche Ursachen in Frage:

1. Durch den Stromfluss bei der amperometrischen Sauerstoffmessung können Reaktionsprodukte an der Gegenelektrode entstehen und so die Leitfähigkeit der Messlösung in unmittelbarer Nähe des Impedanzsensors verfälschen.
2. Die entwickelte Instrumentierung regelt das DC-Potential der Arbeitselektrode des Impedanzsensors auf eine minimale Potentialdifferenz zur Gegenelektrode. Wird die Sauerstoffmessung aktiviert, verschiebt sich das Potential der gemeinsam genutzten Gegenelektrode und durch die Regelung ebenso das Potential der Arbeitselektrode des Impedanzsensors. Durch diese Verschiebung ändern sich der Arbeitspunkt und somit in der Regel auch der Ladungstransferwiderstand der Elektrodenoberfläche.

Um diese Probleme zu vermeiden, empfiehlt es sich, den Impedanzsensor von der Gegenelektrode zu trennen. Hierzu sollte die Arbeitselektrode zum einen örtlich von der Gegenelektrode getrennt und zum anderen der DC-Anteil der Polarisierungsspannung nicht mehr auf die Gegenelektrode referenziert werden. Stattdessen ist das Potential der Arbeitselektrode des Impedanzsensors so zu regeln, dass der DC-Anteil des gemessenen Stromes minimiert wird.

Die Größe der Arbeitselektrode kann an die Anforderungen des Experiments angepasst werden. Eine große Elektrode wird gewählt, um einen Mittelwert über das örtlich verteilte Verhalten von vielen Zellen zu bekommen. Eine kleine Elektrode liefert Informationen über einige wenige Zellen, die sich lokal auf dieser Elektrode befinden. Die Größe der Arbeitselektrode sollte stets kleiner als die Gegenelektrode sein, da die Gegenströme ansonsten eine zu hohe Spannung an der Gegenelektrode bewirken können. Allgemein sind kleinere Arbeitselektroden vorzuziehen, um den Stromfluss durch die Messzelle gering zu halten und das Risiko für Sensorinterferenzen zu reduzieren.

7.2.5 Interferenz zwischen den Sensoren

Weder die pH- noch die Impedanzmessung zeigten bei den durchgeführten Messungen Auswirkungen auf die übrigen Sensoren. Lediglich der Betrieb des Sauerstoffsensors führte zu Interferenzen.

War der Sauerstoffsensor aktiv, bewirkte das amperometrische Messprinzip einen geringen Messstrom von 20 nA (bei den Sensoren auf Glassubstrat) oder 200 nA (bei den Sensoren auf Foliensubstrat). Wurde das Potential an der Messelektrode sprunghaft geändert, konnte der Strom für Sekundenbruchteile um ein Vielfaches ansteigen. Ebenso kam es zu einem Anstieg des Messstroms, wenn zusätzlicher Sauerstoff durch Konvektion zur Elektrode transportiert wurde, beispielsweise während des Pipettiervorgangs.

Während dieser Stromspitzen wurde die Messung des die Potentialdifferenz zwischen der pH- und der Referenzelektrode, bedingt durch den iR -Fehler, verändert. Die Abweichung betrug lediglich 40 μV und ist zeitlich sehr begrenzt. Aus diesem Grund wurde die Störung des pH-Sensors als unkritisch eingestuft.

Die Auswirkung der Sauerstoffmessung auf die Impedanzmessung ist als gering einzustufen, da die gemessene Schwankung kleiner als 1 Ω ist. Die durch die Zellen verursachte Impedanzänderung liegt dagegen bei über 40 Ω . Mögliche Ursachen für dieses Phänomen sowie Lösungsvorschläge zur Minimierung des Effekts sind in Abschnitt 7.2.4 aufgeführt.

7.3 Integration der Sensoren in die eMTP

7.3.1 Isolierung und Verguss der Sensorzuleitungen

Wie in Abschnitt 4.2.3 ausführlich beschrieben wurde, stellt die Integration von elektrochemischen Sensoren in eine Mikrotiterplatte eine besondere Herausforderung dar. Der nasse Sensorbereich muss hermetisch vom Bereich der Messelektronik getrennt sein und dennoch muss die Übertragung der elektrischen Signale von einem Teil in den anderen gewährleistet sein. Die Ergebnisse zeigen, dass dies sowohl für die folien- als auch für die glasbasierten Sensoren zuverlässig möglich ist. Die angewendeten Prozesse lassen sich automatisieren und ermöglichen eine maschinelle Produktion der Platten.

Ein selten auftretendes Problem wurde bei den Foliensubstraten festgestellt: Im Laufe des Herstellungsprozesses der Zuleitungen müssen Leiterbahnen durch Laserschnitte getrennt werden, was zu kleinen Löchern im Substrat führt. Während der Verklebung können diese

7.3 Integration der Sensoren in die eMTP

Löcher dazu führen, dass Kleber auf die Kontaktstellen der Sensorplatte gelangt und dadurch der betroffene Kontakt isoliert wird. Das Problem tritt nicht auf, wenn das Überdosieren des Klebers verhindert wird. Dennoch ist es sinnvoll, in Zukunft die Position der Laserschnitte bewusst vorzugeben und sie möglichst weit entfernt von der Klebekontur zu legen.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Untersuchung der Isolationslacke NPR-80 und SU-8 3000 gewidmet. Sie haben vor allem für die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Sauerstoffsensors eine wesentliche Bedeutung, da sie die aktive Fläche des Sensors definieren. NPR-80 hat verglichen mit SU-8 3000 in den ersten 10 Stunden eine doppelt so hohe Isolationswirkung. Nach 50 bis 85 Stunden nimmt die Isolationsfähigkeit des NPR-80 kontinuierlich ab. Es wird vermutet, dass bei SU-8 3000 ein anderer Mechanismus die Leitfähigkeit erhöht als bei NPR-80. Die unterschiedlichen Mechanismen werden im Folgenden erläutert.

Beim SU-8 3000 Lack deuten der in seiner Höhe limitierte Leckstrom sowie die Reversibilität nach der Trocknung darauf hin, dass der Elektrolyt chemisch oder physikalisch mit dem SU-8 Lack interagiert und dadurch dessen elektrischen Widerstand verringert.

Beim NPR-80 Lack ist der stetig ansteigende und nicht durch Trocknung reversible Leckstrom ein Indiz dafür, dass es sich um einen Durchbruch in der Isolationsschicht handelt. Es wird vermutet, dass anfangs ein punktueller Durchbruch entsteht. Ein solcher Durchbruch tritt in der Regel an Stellen auf, an denen der Lack durch fertigungsbedingte Fehlstellen oder Mikrolöcher (Pinholes) geschwächt ist. Die angelegte Spannung von 2,5 V führt an dieser Stelle zur Elektrolyse und die dabei entstehenden Gase zur Delamination der Isolationsschicht. Die Zuverlässigkeit der Isolation lässt sich demnach durch eine Erhöhung der Schichtdicke des Lacks verbessern. Zur Vermeidung von Pinholes sollte der Lack in zwei Schichten aufgebracht werden. Wird der Lack im Siebdruckprozess aufgetragen, müssen zwei unterschiedliche Siebe für die Schichten verwendet werden, um Fehler auszuschließen, die durch das Sieb hervorgerufen werden können.

Im Falle des normalen Messbetriebs liegen die zu erwartenden Spannungsdifferenzen unter 1 V und damit weit unter der verwendeten Testspannung von 2,5 V. Die Testspannung wurde höher gewählt, um einem Szenario zu entsprechen, in dem ein komplett isolierter Temperatursensor auf dem Sensorarray integriert wird. Durch die Verwendung gewöhnlicher Messschaltungen kann es zu einer höheren Spannungsdifferenz zwischen dem Temperatursensor und den übrigen Sensoren kommen.

Um die Anforderungen an die Isolationsschicht gering zu halten, empfiehlt es sich, den Temperatursensor auf der Rückseite des Substrates zu platzieren und so den Kontakt zum Messmedium unabhängig von der Isolationsschicht zu verhindern.

7.3.2 Elektrische Kontaktierung der Sensoren

Eine häufige Fehlerquelle stellt die Kontaktierung zwischen Sensor und Messelektronik dar. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine trennbare Verbindung nötig ist, um die sensorbestückte Mikrotiterplatte tauschen zu können. Lange Leitungen zwischen dem Sensor und der ersten Verstärkerstufe sind anfällig für die Einkopplung von elektromagnetischen Störungen und würden eine hochauflösende Messung im angestrebten Einsatzumfeld unpraktikabel machen. Durch den Einsatz von Leiterplattentechnologie und der Auswahl von Federkontakten mit niedriger Bauhöhe konnten die Leitungslängen zwischen Sensor und analogem Front-End auf Werte zwischen 10 mm und 20 mm reduziert werden.

Die ausgewählten Federkontakte sind resistenter gegen Korrosion als die üblicherweise verwendeten zylinderförmigen Federkontaktstifte. Dies ist vor allem im Umfeld von Biolaboren notwendig, da es hier mit hoher Wahrscheinlichkeit zu ungewolltem Kontakt zwischen dem salzhaltigen Messmedium und den spannungsführenden Federkontakten kommen kann. Ein weiterer Vorteil der Federkontakte ist ihre offene Bauform. Hierdurch wird eine einfache Reinigung der Federn in destilliertem Wasser und eine anschließend schnelle Trocknung ermöglicht. Federkontaktstifte tendieren hingegen dazu, verschüttetes Messmedium in sich aufzunehmen. Im Inneren des Stiftes kommt es – häufig vom Anwender unbemerkt – zur Korrosion, wodurch der Stift mechanisch und elektrisch ausfällt.

Leiterplatten und eMTP weisen fertigungsbedingte Toleranzen wie beispielsweise Verzug auf. Gleichzeitig muss eine hohe Anzahl an Einzelkontakten zuverlässig an die eMTP angepresst werden. Dies macht eine spezielle, auf alle Komponenten abgestimmte, Kontaktierungsvorrichtung notwendig. Die erste entwickelte Vorrichtung verteilt den Anpressdruck mit sechs Federn über die gesamte eMTP. Der Anpressdruck kann bei dieser Vorrichtung nicht justiert werden und die Bedienbarkeit ist für den Benutzer durch die verwendeten Druckverriegelungen und die hohen Federkräfte zu umständlich. In einer weiteren Iteration konnte die Bedienbarkeit der Vorrichtung durch Spannhaken verbessert werden. Nach dem Ersetzen der Druckfedern durch Kugelspannschrauben kann die Druckverteilung besser eingestellt und kontrolliert werden. Das neue Konzept erlaubt es ohne große Änderungen, die Höhe des Messsystems auf bis zu 40 mm zu reduzieren.

7.3.3 Zytokompatibilität

Eine der wichtigsten Anforderungen an eine elektrochemische Mikrotiterplatte für die Mikrophysiometrie ist die Zellverträglichkeit aller Materialien, die innerhalb der Zellkulturkammer eingesetzt werden. Bis auf die silberhaltige Referenzelektrode erfüllen sämtliche verwendeten Komponenten dieses Kriterium. Durch die Bedeckung der Silberchlorid-Referenzelektrode mit dem Hydrogel pHEMA konnten die zellschädigenden Effekte deutlich reduziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 bedecktes Iridiumoxid als Referenzelektrode in der Zellkulturkammer eingesetzt werden kann. Dadurch kann der Einsatz von Silber vollständig vermieden werden.

Für eine zuverlässige Anwendung von Hydrogelen muss eine ausreichende Haftung auf dem Foliensubstrat und auf dem Sensor selbst sichergestellt sein.

7.4 Messelektronik

7.4.1 Realisierung der multiparametrischen Messung

Der Schlüssel zur Realisierung einer hochauflösenden multiparametrischen Messung mit geringen Sensorinterferenzen liegt in der Aufarbeitung der entsprechenden theoretischen Grundlagen. Die Verknüpfung von Schaltungstechnik, Elektrochemie und Prinzipien der elektromagnetischen Verträglichkeit stellt die Basis für die Entwicklung eines effizienten analogen Front-Ends für multiparametrische Messungen dar.

Das entwickelte Front-End ermöglicht die gemeinsame Verwendung von einer Referenz- und einer Gegenelektrode für alle Sensoren. Dadurch werden 72 elektrische Kontakte eingespart und die benötigte Anzahl an Elektroden in jeder Kavität reduziert.

Aus elektrochemischer Sicht ist eine derartige Anordnung sinnvoll, da nur eine Referenzelektrode für die Regelung der Potentialdifferenz zwischen Messmedium und Messschaltung nötig ist. Die Verwendung von mehreren an der Regelung beteiligten Referenzelektroden ist nur möglich, wenn jeder Referenzelektrode ein eigener Schaltungsabschnitt zugeordnet wird und diese Abschnitte galvanisch voneinander getrennt werden. Dadurch können die Massen der Schaltungsabschnitte auf unterschiedlichen Potentialen liegen und es fließen keine Ausgleichsströme durch den gemeinsamen Elektrolyten.

Eine galvanische Trennung der einzelnen Sensoren und der zugehörigen Elektronik ist bei der entwickelten Schaltung folglich unnötig. Durch den Verzicht auf Trennverstärker wird die Leistungsaufnahme der Messelektronik gesenkt. Der Einsatz von Linearreglern statt isolierter DC/DC-Wandler minimiert die Welligkeit der Versorgungsspannung und eliminiert so eine mögliche Quelle für EMV-Probleme. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Versorgung und den Betrieb der hochauflösenden analogen Messelektronik.

Der modulare Aufbau ermöglicht eine einfache Weiterentwicklung der Messelektronik. So können einzelne Module gezielt ausgetauscht werden, um das System zu optimieren oder anzupassen. Der Stromverbrauch kann beispielsweise durch den Austausch der Operationsverstärker des analogen Front-Ends weiter reduziert werden. Es ist ebenso möglich, das Messsystem ohne großen Aufwand um zusätzliche Sensoren zu erweitern, indem weitere OPV und AD-Wandler hinzugefügt werden.

7.4.2 Reduktion von Störungen und Rauschen

Die Einkopplung von elektromagnetischen Störungen wird, wie bereits erwähnt, durch kurze Leitungslängen zwischen Sensor und analogem Front-End reduziert. Zusätzlich wird auf den Einsatz von Schaltreglern verzichtet, die ein Risiko für die Entstehung von EMV-Problemen darstellen können.

Diese Maßnahmen sind Grundvoraussetzung für eine hochempfindliche Messung, reichen allein jedoch nicht aus, wenn Spannungsänderungen im μV Bereich zuverlässig gemessen werden sollen. Vor allem das niederfrequente Netzbrummen von 50 Hz bleibt in der Praxis problematisch, da es mit einfachen passiven Filtern schwer zu dämpfen ist. Durch die Verwendung von digitalen Filtern kann das Netzbrummen effizienter aus dem Messsignal gefiltert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Sigma-Delta AD-Wandler realisiert.

7.4 Messelektronik

In einem Multikanalsystem mit sehr vielen Sensoren, die quasi-simultan ausgewertet werden, zeigt sich die Verwendung von Sigma-Delta AD-Wandlern aus mehreren Gründen als besonders hilfreich:

- Sie entlasten den Hauptprozessor, indem sie digitale Filterung übernehmen
- Sehr hohe Auflösungen können rauschfrei erzielt werden
- Die im AD-Wandler implementierten digitalen Filter dämpfen die kritischen Frequenzen (50 Hz und 60 Hz) um bis zu 120 dB
- Die Überabtastung wird vom AD-Wandler automatisch durchgeführt und an den internen Filter übergeben, ohne große Datenmengen über den Datenbus an den Mikrocontroller zu übertragen
- Die Anti-Aliasing-Filter können als einfache RC-Filter gestaltet werden

Eine andere Quelle für Störungen stellt die Eigenschwingung von Operationsverstärkerschaltungen dar. Die Ursachen hierfür liegen oft in unzureichender Frequenzkompensation des Verstärkers in Verbindung mit kapazitiven Lasten in der Rückkopplungsschleife. Da sich die Kapazität der Messelektroden im laufenden Versuch ändern kann, ist ein spontanes Auftreten dieses Problems möglich. Für die entwickelten Messschaltungen wurden Simulationen eingesetzt, um die Stabilität der Verstärker vorab zu prüfen. Der Vorteil einer solchen Simulation ist, dass die Parameter des Ersatzschaltbildes der Messelektrode über den relevanten Bereich variiert werden können. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche bestätigen, dass es zu keinen Eigenschwingungen der eingesetzten Verstärkerschaltungen kommt.

Allgemein zeigt das beschriebene Vorgehen exemplarisch, wie sich eine Messschaltung mit elektrochemischen Komponenten durch geeignete Vereinfachungen mit SPICE simulieren lässt. So kann beispielsweise bei der Stabilitätsbetrachtung die kompliziert zu modellierende Warburg-Impedanz ignoriert werden, da sie erst bei niedrigen Frequenzen dominant ist. Die Simulation ermöglicht es, die Schaltung bereits vor dem ersten Prototyp geeignet zu parametrisieren und den Testaufwand am Prototyp zu senken.

Neben den bereits genannten Maßnahmen verhindert ein EMV-gerechtes Design, dass es zu Interferenzen zwischen digitalen und analogen Signalen kommt. Die Gesamtheit der getroffenen Maßnahmen führt zu einer starken Reduktion von Störungen im aufgezeichneten Signal. Die verbleibenden Störungen sind auf externe Faktoren, wie Sensordrift oder Temperaturschwankungen der Umgebung, zurückzuführen.

7.4.3 Stromversorgung

Um eine stabile Spannungsversorgung sicherzustellen, wurde das Messsystem mit mehreren Linearreglern ausgestattet. Die Versorgungsspannung der einzelnen Komponenten wurde dabei mit 5 V gewählt, um einerseits ein großes Potentialfenster für die Instrumentierung der Sensoren zur Verfügung zu stellen und andererseits die Kompatibilität zum USB-Standard zu demonstrieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stromaufnahme ausreichend gering war, um die direkte Versorgung der Messschaltung durch den USB-Port eines Computers zu ermöglichen. Der Stromverbrauch lag mit maximal 145 mA weit unter dem für USB 1.1 und 2.0 spezifizierten Maximum von 500 mA.

In der Zukunft muss bei einer direkten Versorgung der Messschaltung über einen USB-Port beachtet werden, dass die USB 2.0 Spezifikation [247] Schwankungen der Busspannung zwischen 4,4 V und 5,5 V erlaubt. Dies kann durch den Versorgungsspannungsdurchgriff der verwendeten Operationsverstärker im Extremfall zu Messfehlern führen. Die Versorgungsspannung sollte deswegen weiterhin mit einem Linearregler stabilisiert werden. Ebenso wichtig ist es, dass ein zweckmäßiger Eingangsfilter die Übertragung von hochfrequenten Störungen über die Versorgungsleitung des USB-Anschlusses verhindert. In der Praxis werden häufig π -Filter als Tiefpass für diesen Zweck eingesetzt.

7.5 Integration der eMTP in das Labor

7.5.1 Integration des Messsystems in Liquid-Handling-Systeme

Die elektrochemische Mikrotiterplatte mit Anpressvorrichtung und Messelektronik ist derart ausgelegt, dass die Grundfläche umlaufend maximal 3 mm größer als das standardisierte Maß einer Mikrotiterplatte ist. Die Gesamthöhe des Messsystems inklusive eMTP beträgt 65 mm und ist damit 20,9 mm höher als eine deepwell Mikrotiterplatte des Herstellers Eppendorf [248]. Um Probleme bei der Integration in einen alternativen Pipettierroboter zu vermeiden, sollte die Höhe des Messsystems deshalb verringert werden.

Wird das Hauptmodul der Messelektronik geringfügig modifiziert, können die Kugelspannschrauben der Kontaktiervorrichtung direkt auf der Platine aufliegen. Die Gesamthöhe des Messsystems lässt sich dadurch von 65 mm auf 40 mm verringern. In diesem Fall müssen zum Anpressen speziell angefertigte Spannhaken verwendet werden.

7.5 Integration der eMTP in das Labor

Ein derart modifiziertes Messsystem weist eine geringere Höhe als eine Deepwell-Platte auf. Dadurch lässt es sich in Liquid-Handling-Systeme vieler Hersteller integrieren. Aus Gründen, die in Abschnitt 4.2 ausführlich erläutert wurden, stellt der Betrieb mittels eines Pipettierroboters in der Praxis einen Vorteil dar. Die geringe Stellfläche ermöglicht den Betrieb mehrerer eMTP mit demselben Liquid-Handling-System. Dies ist eine wichtige Möglichkeit zur Erhöhung des Durchsatzes an Messungen.

7.5.2 Austausch des Messmediums in der Zellkulturkammer

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass der Austausch des Messmediums eine Fehlerquelle darstellt, die unbedingt beachtet werden muss. Drei verschiedene Probleme wurden insbesondere identifiziert:

1. Ungenaue Dosiermenge des Pipettierroboters
2. Unzureichender Mediumaustausch in der Zellkulturkammer
3. Mangelhafte Ausrichtung der eMTP zu den Dosierspitzen

Das erste Problem tritt in einem Szenario auf, in dem der Roboter mehrmals hintereinander Medium aufnimmt, ohne es wieder abzugeben. Dabei unterscheidet sich die eingestellte Menge von der tatsächlich aufgenommenen. Die Ursache wird in den Grundeinstellungen des Roboters vermutet. Das Problem lässt sich abstellen, indem der Pipettierablauf angepasst oder ein anderer Roboter verwendet wird.

Das zweite Problem wird durch die runde Geometrie der Hauptkammer und die punktförmigen Zuläufe verursacht. Obwohl die Hauptkammer in jedem Zyklus mit dem Vierfachen ihres Volumens durchspült wird, sind mehrere Pipettiervorgänge nötig, um das Medium komplett auszutauschen. Dieses Problem ist allgemein bekannt und auf Verwirbelungen zurückzuführen, die entstehen, wenn eine kreisförmige Kammer über punktförmige Zuläufe durchströmt wird. Eine optimierte Geometrie der Flusskammer und der Zuläufe kann diese Situation wesentlich verbessern [24]. Ein effizienter Austausch des Messmediums hat mehrere Vorteile: Die Menge des benötigten Messmediums pro Zyklus wäre um den Faktor vier kleiner, was aus wirtschaftlichen und ethischen Gründen – wie der Einsparung von fetalem Kälberserum – anzustreben ist. Des Weiteren werden die Zellen bei gleichbleibender Pipettierfrequenz besser mit Nährstoffen versorgt. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass die Amplitude des gemessenen metabolischen Signales steigt.

Ein weiteres Problem liegt darin, dass die mangelhafte Ausrichtung zwischen Pipettierspitzen und eMTP zur Kollision führen kann. Dies geschieht insbesondere, wenn Medium in der Nähe des Plattenbodens aufgenommen wird. Das Problem wurde in der neuen Kontaktier Vorrichtung mit vier Gewindestifte behoben, die eine Justierung der Parallelität zwischen eMTP und Pipettierkopf ermöglichen.

7.5.3 Einfluss der Messumgebung

Bei der Konzeption des Messsystems wurde vermutet, dass die mechanische Bewegung des Pipettierroboters Einfluss auf das Messsignal haben kann. Dies hat sich jedoch bei den Messungen nicht bestätigt. Elektromagnetische Interferenzen, die vom Pipettierroboter oder vom Inkubator ausgehen können, haben ebenfalls keine messbaren Störungen verursacht.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Messung hat die Temperatur. Vor allem bei der pH-Messung konnte dieser Effekt sehr deutlich wahrgenommen werden. Eine genaue Quantifizierung erweist sich jedoch als schwierig, da externe Temperatursensoren nicht ohne weiteres in die Zellkulturkammer integriert werden können und eine zu lange Ansprechzeit haben. Um den Effekt von Temperaturänderungen auf die verwendeten Sensoren zu untersuchen, muss ein Temperatursensor auf dem Foliensubstrat integriert werden. So kann eine ausreichend schnelle Ansprechzeit gewährleistet werden. In Zukunft kann ein solcher Sensor eingesetzt werden, um Temperatureffekte zu kompensieren und um die Einhaltung der richtigen Kultivierungstemperatur zu dokumentieren.

Generell muss die Temperatur in einem Inkubator kritisch betrachtet werden. Für die durchgeführten Zellkulturversuche wurde ein sehr einfaches Modell ohne Luftumwälzung und ohne Luftbefeuchtung verwendet. In einem solchen Inkubator können sich unterschiedliche Temperaturzonen bilden. Durch die geringe Luftfeuchtigkeit kommt es zu Verdunstung von Messmedium in der eMTP und in den angebrochenen Vorratsgefäßen. Durch die Verdunstung wird das Medium gekühlt. Gleichzeitig wird das Medium in der eMTP durch die Abwärme der Messelektronik aufgeheizt. Diese Effekte führen in der Regel zu kleineren Temperaturunterschieden von 1 bis 2 °C, dennoch müssen sie bei hochauflösenden Messungen beachtet werden. Keinesfalls darf davon ausgegangen werden, dass die Temperatur an jeder Position des Inkubators gleich sein muss.

7.6 Bewertung und Vergleich der erzielten Ergebnisse

Ventilatoren können für eine bessere Temperaturverteilung im Inkubator sorgen, fördern jedoch gleichzeitig die Verteilung von Keimen und damit Kontamination. Ein Inkubator mit Luftbefeuchtung reduziert effektiv die Verdunstung. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass die Elektronik vor Feuchtigkeit geschützt wird, falls es zur Kondensation kommt.

Geschlitzte Folien können in das Vorratsgefäß und in den Deckel der eMTP integriert werden, um die Verdunstung zwischen den Pipettiervorgängen zu reduzieren.

Bei den durchgeführten Zellkulturversuchen wurde kein negativer Effekt der Messumgebung oder des Messsystems auf die Zellen festgestellt. Es wird vermutet, dass die Erwärmung durch die Messelektronik durch die Verdunstung des Mediums aus der eMTP kompensiert wird. Im Umkehrschluss folgt daraus, dass eine zusätzliche Reduktion der Abwärme der Messelektronik nötig ist, wenn das Verdunsten des Messmediums verhindert wird.

7.6 Bewertung und Vergleich der erzielten Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein multiparametrisches Messsystem mit 24 Untereinheiten, bestehend aus jeweils vier elektrochemischen Sensoren, entwickelt. Durch die Beachtung der nötigen theoretischen Grundlagen konnte der schaltungstechnische Aufwand reduziert und gleichzeitig die Messgenauigkeit erhöht werden.

Die Leistungsaufnahme ist mit 725 mW gering. Dies reduziert die Erwärmung der biologischen Proben durch das Messsystem. Durch die Verwendung von stromsparenden Operationsverstärkern und der Reduktion der Versorgungsspannung auf 4 V lässt sich die Leistungsaufnahme in Zukunft verringern.

Im Vergleich dazu verbraucht die Messelektronik des von Schmidhuber entwickelten μ Las 650 mW (errechnet aus [17]), ohne Pumpen, Heizung und Funkmodul zu berücksichtigen. Dieses Gerät ist für den mobilen Einsatz bereits sehr stromsparend konzipiert und kann lediglich eine einzige Untereinheit mit vier Sensoren auslesen.

Die Verbesserung des SNR kann am besten am Beispiel des pH-Sensors gezeigt werden, da dieser unter Aspekten der EMV als besonders anfällig gilt. In Abbildung 116 werden die Rohdaten einer pH-Messung des μ Las (entnommen aus [17]) einer pH-Messung des neuentwickelten Systems gegenübergestellt. Da das μ LA eine achtfache Verstärkung des Messsignals vornimmt, wurden die Messdaten der eMTP mit dem Faktor acht multipliziert und danach offset bereinigt, um einen objektiven Vergleich des Rauschens zu ermöglichen.

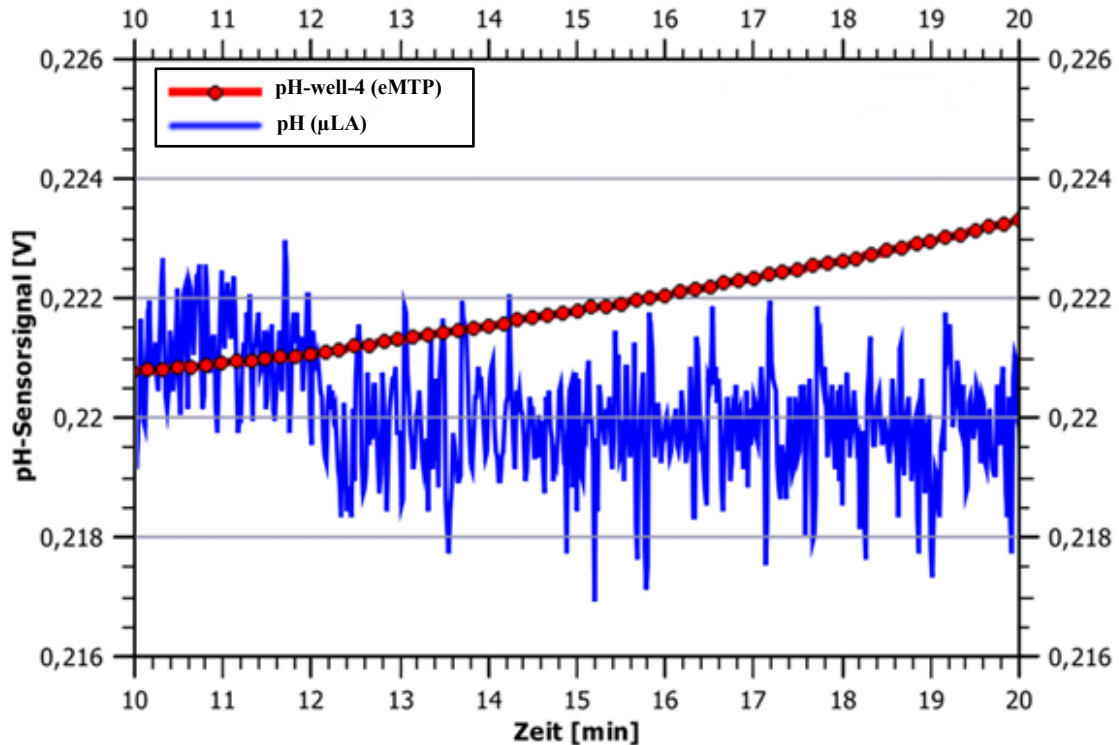


Abbildung 116: Für einen direkten Vergleich zwischen μ LA (blaue Kurve, entnommen aus [17]) und eMTP (rote Kurve) wurden die Messdaten der eMTP offset bereinigt und mit dem Faktor acht multipliziert. Auch nach dieser Normierung liegt das Rauschen der eMTP weit unter dem des μ LA.

Aus der Gegenüberstellung ist deutlich zu erkennen, dass die Messung der eMTP ein deutlich geringeres Rauschen zeigt. Ein wesentlicher Grund für den Unterschied ist die sehr effektive Dämpfung des Netzbrummens durch die verwendeten Sigma-Delta ADC. Schmidhuber verwendete ADC, die im Wägeverfahren arbeiten und keinen digitalen Filter integrieren. Stattdessen wird ein analoger Filter vorgeschaltet. Dieser müsste eine sehr niedrige Grenzfrequenz haben, um Frequenzen um 50 Hz effektiv zu filtern. Um eine digitale Filterung des Signals im μ LA zu ermöglichen, müssen das Nyquist-Kriterium beachtet werden und das Signal mit einer Frequenz von mindestens 100 Hz abgetastet werden. Dies würde die Menge an aufgezeichneten, übertragenen und zu verarbeitenden Datenpunkten wesentlich erhöhen.

Die driftbereinigten bzw. hochpassgefilterten ($f_g = 0,01$ Hz) Messungen mit der eMTP zeigen ein RMS-Rauschen von 78 μ pH, das somit ungefähr ein Hundertstel beträgt, verglichen mit den von Schmidhuber präsentierten Ergebnissen des μ LA (siehe Abschnitt 3.8.5.3) und ein Zehntel des Rauschens des Cytosensors (vgl. Abschnitt 3.5.2.1). Es muss jedoch angemerkt werden, dass eine nachträgliche Tiefpassfilterung der Signale des μ LA oder des Cytosensors zu einer Reduktion des RMS-Rauschens führen kann.

7.6 Bewertung und Vergleich der erzielten Ergebnisse

Im Vergleich zu den fotochemischen pH-Sensoren, die Lob [21] und Becker [109] im IMR-System verwendet haben (vgl. Abschnitt 3.5.6.4), liefert das neue Messsystem eine um den Faktor 300 genauere Auflösung des pH-Wertes. Während die fotochemischen Sensoren 0,01 pH bzw. 10 mpH auflösen können, wird mit der eMTP eine Auflösung von 30 μ pH erreicht. Abbildung 117 stellt einen direkten Vergleich zwischen IMR und eMTP bei der pH-Messung her. Die beiden geplotteten Signalverläufe wurden so gewählt, dass die Amplituden der Änderungen des pH-Wertes jeweils annähernd gleich sind, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

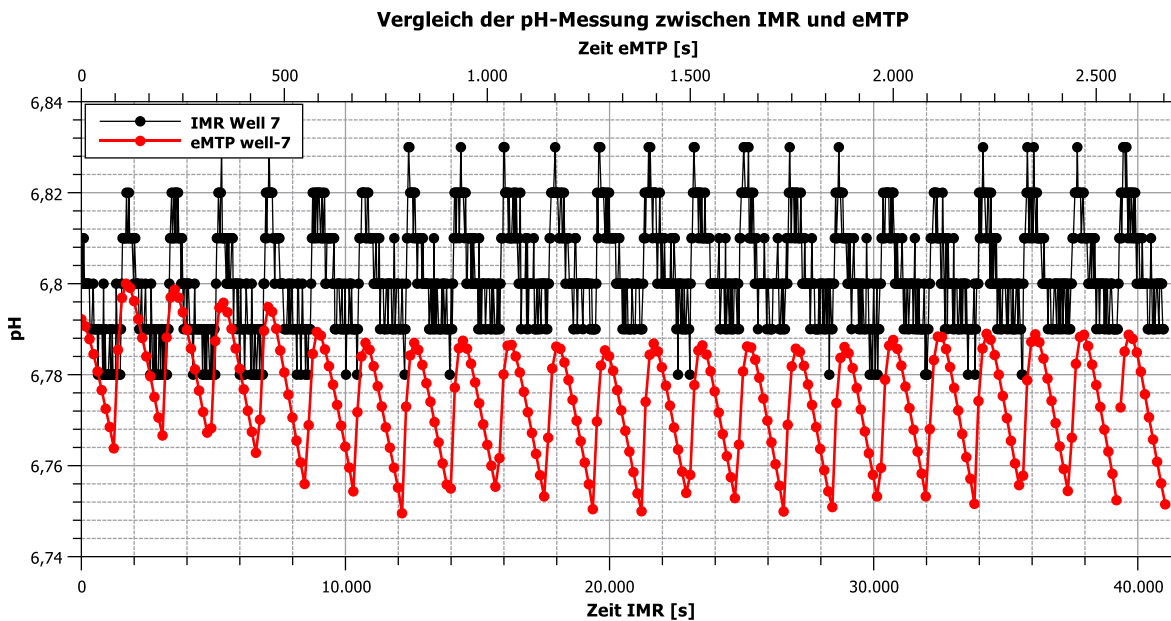


Abbildung 117: Direkter Vergleich der Messung der zellulären Ansäuerung mit den fotochemischen Sensoren des IMR (schwarz) und den elektrochemischen Sensoren der eMTP (rot). Es handelt sich um zwei unterschiedliche Versuche, die so ausgewählt wurden, dass sie annähernd die gleiche Amplitude der pH-Änderung zeigen. Die unterschiedlichen Zeitskalen bedeuten, dass das Medium im IMR-Versuch mit einer niedrigeren Frequenz getauscht wurde.

Die Versuchsergebnisse und insbesondere die Vergleiche in Abbildung 116 und Abbildung 117 zeigen, dass die Auflösung erhöht und das Signal-Rausch-Verhältnis mit dem entwickelten Messsystem verbessert werden. Dadurch ist es mit der eMTP möglich, kleinste zelluläre Signale zu messen, die bei den bisherigen Messsystemen im Rauschen und in Quantisierungsfehlern untergegangen sind.

Darüber hinaus kann durch die verbesserte Auflösung des Messsystems auch die Dauer der Pipettierzyklen reduziert werden. Bei kurzen Pipettierzyklen von wenigen Minuten muss jedoch verhindert werden, dass es beim Medienwechsel zu Verwirbelungen in der

Zellkulturkammer kommt. Solche Verwirbelungen können das Medium auch nach Abschluss des Austausches weiter durchmischen und so die Messung in der ersten Minute beeinflussen. Vor allem der Sauerstoffsensor wird durch die Konvektion des Mediums gestört. Deswegen müssen bei kurzen Zyklen die in Abschnitt 7.2.3 besprochenen Optimierungen umgesetzt werden.

Prinzipiell gilt, dass die Änderungen der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes in der Zellkulturkammer möglichst gering zu halten sind, um die Zellen vor unnötigem Stress zu schützen. Aus diesem Grund ist der Einsatz eines hochauflösenden Messsystems generell von Vorteil.

Bei der Messung sehr geringer Konzentrationsänderungen wird das Rauschen der Messelektronik gänzlich von einem Effekt überdeckt, der oft unpräzise als Sensordrift bezeichnet wird. Unter diesem Begriff werden langsame Änderungen des Sensorsignals zusammengefasst, die nicht durch die Änderung der Konzentration des Analyten verursacht werden. Mehrere Ursachen wie Temperaturschwankungen, Konvektion oder Sensordegradation kommen dafür in Frage. Das bedeutet, dass eine weitere Verbesserung der Messgenauigkeit nicht allein durch die Messelektronik erreicht werden kann. Stattdessen muss der Sensordrift reduziert werden, beispielsweise indem die Temperatur in der Zellkulturkammer konstant gehalten, der Austausch des Messmediums optimiert oder der Sensor selbst verbessert wird. In der Regel ist eine Kombination aus mehreren Maßnahmen nötig, um solche hochsensitiven Messungen durchführen zu können.

7.7 Abschließende Bewertung der eMTP als zell-basiertes Assay für ein modernes Labor

7.7.1 Aktueller Bedarf an zellbasierten Tests

In Kapitel 3.4 wurde der Begriff des zellbasierten Assays definiert und vom reinen Sensor abgegrenzt. In der Arzneimittelforschung werden zellbasierte Assays zu den phänotypbasierten Testverfahren gezählt. Gegenüber targetbasierten Tests bieten sie den Vorteil, die Wirkung einer Substanz anzuzeigen, ohne dass Details zum Wirkmechanismus bekannt sein müssen [249]. Dieser Vorteil macht zellbasierte Tests besonders attraktiv für die Erforschung neuartiger „first-in-class“-Wirkstoffe, obwohl der Durchsatz von zellbasierten Analysen aktuell den targetbasierten Tests unterliegt [250].

7.7 Abschließende Bewertung der eMTP als zell-basiertes Assay für ein modernes Labor

Die Kosten für die Zulassung neuer Wirkstoffe haben sich zwischen 1950 und 2010 etwa alle neun Jahre verdoppelt [251]. Die seit den 90er-Jahren erhoffte Effizienzsteigerung durch die technische Weiterentwicklung von targetbasierten Hochdurchsatz-Screenings blieb jedoch weitgehend aus. Stattdessen führten die unterrepräsentierten phänotypischen Analysen zu vergleichbaren Trefferzahlen [250, 252, 253].

Diese Entwicklung deutet darauf hin, dass der Bedarf nach zellbasierten Tests in naher Zukunft steigen wird. Der kommerzielle Erfolg junger Unternehmen [236, 237], die sich auf diesen Sektor spezialisiert haben, ist ein Vorbote für diese Prognose. In Zukunft wird sich die Herausforderung ergeben, die Effizienz von zellbasierten Testsystemen zu verbessern, um so den stetig steigenden Kosten entgegenzuwirken.

Eine besondere Rolle unter den zellbasierten Assays nehmen hierbei die markierungsfreien Tests ein. Sie sind in der Lage, den dynamischen Verlauf eines Zellkulturversuchs über die Zeit abzubilden (vgl. Abschnitt 3.4.2). Bei Fragestellungen, in denen der zeitliche Verlauf relevant ist, können hierdurch die Anzahl der benötigten Versuche reduziert und die Effizienz gesteigert werden.

Eine andere Möglichkeit der Effizienzverbesserung ist die Erhöhung des Probendurchsatzes. Aus diesen Gründen zeichnet sich für viele Fragestellungen ein klarer Trend zur Verwendung von Mikrotiterplatten ab. Zahlreiche kommerzielle Hersteller von markierungsfreien zellbasierten Testsystemen haben hierauf reagiert und Mikrotiterplatten in unterschiedlichen Formaten entwickelt, die von 8-fach bis 1536-fach [237, 254] reichen.

7.7.2 Vorteile und Möglichkeiten einer elektrochemischen Mikrotiterplatte

Um den steigenden Anforderungen an ein Messsystem für zellbasierte Assays gerecht zu werden, muss eine wachsende Zahl an Parametern auf engstem Raum möglichst genau aufgenommen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Mikrotiterplatte bestückt mit elektrochemischen Sensoren zu genau diesem Zweck geeignet ist. In dem entwickelten Messsystem konnten drei der wichtigsten elektrochemischen Messmethoden implementiert und simultan betrieben werden. Basierend auf diesen drei Messmethoden können nahezu alle gängigen elektrochemischen Sensoren instrumentiert werden. Dazu gehören beispielsweise ionenselektive Sensoren, Biosensoren und die Clark-Elektrode.

Elektrochemische Sensoren lassen sich gut miniaturisieren, wodurch es möglich ist, mehr Sensoren in eine Messkammer zu bringen oder die Messkammer zu verkleinern und somit den Aufbau von 96- oder 384-fach-Platten zu erlauben. Die Sensorfläche von potentiometrischen Sensoren lässt sich leicht verkleinern, ohne die Signalqualität zu beeinflussen. Bei amperometrischen Sensoren wird der Strom geringer und das Signal muss unter Umständen verstärkt werden. Die verringerte Sensorgröße verbessert das Ansprechverhalten von amperometrischen Sensoren und reduziert unerwünschte Interaktion mit dem Zellkulturmedium (vgl. Abschnitt 3.6.2.3). Der geringere Stromfluss durch den Elektrolyten verringert die Wechselwirkung mit anderen Sensoren.

Ein weiterer Vorteil der elektrochemischen Sensoren liegt in der hohen Messauflösung und im geringen Detektionslimit. Ein bekanntes Beispiel stellt die ECIS-Messung dar, die empfindlich genug ist, um Mikrobewegungen der Zellen zu detektieren [45]. Auch die relative Messung von pH-Änderungen mit dem „Cytosensor Microphysiometer“ gilt als sehr hochauflösend (siehe Abschnitt 3.5.2.1). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei multiparametrischen Messungen ebenso hohe Auflösung erzielt werden kann.

Die Instrumentierung von elektrochemischen Sensoren ist mit Standardkomponenten umsetzbar. Basierend auf den theoretischen Betrachtungen in Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass eine einfach gehaltene Messschaltung ausreichend ist, um eine hohe Signalqualität zu erreichen. Die Messschaltung ist modular aufgebaut, sodass sie sich anpassen oder erweitern lässt. Somit ist es möglich, eine erweiterte Version der eMTP für 96-Well-Platten zu entwickeln, um den Anforderungen nach Parallelisierung gerecht zu werden. Für eine 384-fach Version müssen jedoch andere Methoden der elektrischen Kontaktierung und eine zusätzliche Multiplexer-Ebene entwickelt werden.

7.7.3 Ökologische und ethische Betrachtung von Zellkultur und Einwegsensoren

Zellkulturforschung ist ein wichtiges Werkzeug in der Arzneimittelforschung und aus der biologischen Grundlagenforschung nicht wegzudenken. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass sich bestimmte Tierversuche durch zelluläre Tests ersetzen lassen [73]. Durch den stetigen Fortschritt der Zellkultivierungstechnik und die neuen sensorischen Möglichkeiten, ist zu erwarten, dass dieser Trend künftig zunehmen wird.

Doch trotz dieser zahlreichen positiven Aspekte gibt es auch eine Schattenseite, die in einer objektiven Betrachtung keineswegs vernachlässigt werden darf. Ein ethisches Problem liegt

7.7 Abschließende Bewertung der eMTP als zell-basiertes Assay für ein modernes Labor

beispielsweise in der Verwendung von fetalem Kälberserum. Dieses Thema wird in dem weiterführenden Report [255] von van der Valk et al. im Detail behandelt.

Ein ökologisches Problem ergibt sich durch den immensen Einsatz von Kunststoff-Einwegartikeln in der Zellkulturforschung. Die Gründe für die weit verbreitete Verwendung liegen in dem einfachen Gebrauch, dem Wegfall von Reinigung und der damit einhergehenden Einsparung von Zeitaufwand und Personalkosten. Auch wenn die verwendeten Kunststoffplatten nach ihrem Gebrauch dem Recycling oder der thermischen Verwertung zugeführt werden können, ist die Reduktion des entstehenden Abfalls ein Thema, das die Wissenschaft zurecht beschäftigt. Réu et al. haben beispielsweise untersucht, wie sich das Gewicht einer Petrischale zu diesem Zweck reduzieren lässt [256]. Ähnliche Betrachtungen müssen auch für eine sensorische Mikrotiterplatte angestellt werden, wenn sie nach dem Gebrauch entsorgt wird. Reinigung und Wiederverwendung der Platte stellen zwar in der Theorie eine Option dar, in der Praxis werden diese jedoch kaum wahrgenommen. Es ist nur schwer auszuschließen, dass die Sensoren durch eine falsch durchgeführte Reinigung beschädigt werden. Viele Labore scheuen den Zeitaufwand, der für eine ordentliche Reinigung mit nachfolgender Sterilisation der Platte nötig ist. Nicht zuletzt stellt eine wiederverwendbare sensorische Mikrotiterplatte den Hersteller vor die Herausforderung, dass die Qualität der Platten mit den Reinigungszyklen nicht nachlassen darf, um reproduzierbare Messungen zu ermöglichen.

Aufgrund der genannten Aspekte ist es notwendig, die eMTP als Einwegartikel auszulegen. Unter Berücksichtigung ökologischer Aspekte ist es positiv, dass keine Elektronikkomponenten, wie integrierte Schaltungen, in die eMTP eingebaut wurden. Die folienbasierte Lösung produziert durch ihre geringe Dicke weniger Abfall als die auf Glas-Chips basierende Variante. Die Verwendung von Leiterplattentechnologie bietet sich an, da die Recyclinginfrastruktur bereits auf die Wiederverwertung von Leiterplatten eingestellt ist. Schon seit einigen Jahren werden vollbestückte Leiterplatten in Einweg-Schwangerschaftssensoren eingesetzt und im Hausmüll entsorgt.

Dennoch ist die Herstellung einer Leiterkarte ein aufwändiger mehrstufiger Prozess, der eine gewisse Belastung für die Umwelt darstellt. Gedruckte Sensoren können als eine Alternative angebracht werden, die mehr auf Ökologie abzielt. Es muss jedoch der Einzelfall geprüft werden, da die nötigen Prozesse (Pastenherstellung, Trocknung der Paste, Einsatz von Lösungsmitteln) einen erheblichen ökologischen Fußabdruck haben können.

Kapitel 7: Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Der wichtigste Schritt zur Verbesserung der ethischen und ökologischen Situation ist die Erhöhung der Anzahl der Kavitäten auf der Platte, beispielsweise auf 96 oder 384 Positionen. Durch die Reduktion des benötigten Volumens pro Kavität können Zellkulturmedium und damit fetales Kälberserum eingespart werden. Gleichzeitig kann die Anzahl der benötigten Versuche durch die höhere Parallelisierung reduziert werden und somit die Menge an Einwegartikeln, die zuerst hergestellt und dann entsorgt werden müssen. Da eine hohe Parallelisierung auch aus ökonomischer Sicht wünschenswert ist, handelt es sich um eine erstrebenswerte Win-win-Strategie.

8 AUSBLICK

Der folgende Ausblick soll dazu dienen, wichtige Aspekte für eine Weiterentwicklung des in dieser Arbeit präsentierten Mikrophysiometers zu liefern. Im Fokus steht die Überführung in ein praxisfähiges Analysesystem für die Zellkulturforschung.

8.1 Weiterentwicklung des Messsystems

8.1.1 Integration zusätzlicher Temperatursensoren

Die Kultivierungstemperatur spielt in der Zellkultur eine wichtige Rolle. Bereits Temperaturänderungen von wenigen Grad Celsius können dazu führen, dass sich der Phänotyp der Zellen verändert. Aus diesem Grund ist es essenziell, die Temperatur des Zellkulturmediums konstant zu halten und zu kontrollieren. Da es bei der Temperatur auf den Absolutwert ankommt, muss ein Sensor mit einer hohen absoluten Genauigkeit eingesetzt werden. Es ist kostspielig, einen ausreichend genauen Sensor auf ein Einwegprodukt zu integrieren. Aus diesem Grund sollte der Temperatursensor auf dem Messsystem selbst integriert werden, wodurch mittels einer Werkskalibrierung eine hohe Genauigkeit erzielt werden kann. Ein oder mehrere Temperatursensoren können als Anlegefühler realisiert und so platziert werden, dass sie den Boden der eMTP direkt unter der Zellkulturkammer berühren. Beim Foliensubstrat wird dadurch eine Messung in unmittelbarer Nähe der Zellen realisiert.

8.1.2 Erweiterung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte

In Abschnitt 7.7.1 wird die Notwendigkeit dargestellt, das Messsystem auf mindestens 96 Zellkulturkammern zu erweitern. Hierfür sind zusätzliche Operationsverstärker nötig. Um eine übermäßige Erwärmung zu vermeiden, müssen Operationsverstärker mit einer geringeren Leistungsaufnahme verwendet werden.

Die Kontaktierung mit den bisher verwendeten Federkontakten ist weiterhin möglich. Alternativ können kleinere Federkontakte entwickelt werden, um die Anpresskraft von Elektronik an die eMTP zu verringern und um Platz zu sparen. Als Material sollte erneut

galvanisch vergoldetes Kupferberyllium eingesetzt werden, da es sich gut für Federkontakte eignet und korrosionsbeständiger ist als ein stromlos vergoldeter Kontakt.

8.1.3 Schutz der Elektronik vor dem Zellkulturmedium

Um einen zuverlässigen Betrieb zu gewährleisten, ist es wichtig, die gesamte Elektronik vor Kontakt mit dem korrosiv wirkenden Zellkulturmedium zu schützen. Die Gefahr des Verschüttens kann bei Arbeiten mit Zellkulturen nie gänzlich ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund muss das Messsystem so ausgelegt werden, dass es kurzzeitig dem Zellkulturmedium ausgesetzt sein kann, ohne dauerhafte Schäden zu erleiden. Gleichzeitig muss verschüttetes Zellkulturmedium leicht mit Labormitteln zu entfernen sein, bevor es zu einer Beschädigung des Messsystems führt.

Elektronische Schaltungen können durch geeignete Vergussmassen effektiv vor Feuchtigkeit geschützt werden. Die Federkontakte müssen jedoch von einem solchen Verguss ausgespart werden, um weiterhin zu funktionieren. Werden die Federkontakte auf der Oberseite der Leiterplatte und alle anderen Bauelemente auf der Unterseite platziert, kann der Verguss auf der Unterseite erfolgen und so die empfindlichsten Bauelemente schützen. Zusätzlich muss verhindert werden, dass Feuchtigkeit von der Oberseite der Platine zur Unterseite gelangen kann. Dies kann durch spezielle Fertigungsverfahren bei der Herstellung der Platine erreicht werden, wie beispielsweise durch Via Plugging.

Die Federkontakte sind durch ihre Vergoldung weniger anfällig für Korrosion. Die angelegten Potentialdifferenzen zwischen den Kontakten und der hohe Salzgehalt des Zellkulturmediums können dennoch zu Korrosion führen. Zum besseren Schutz der Federkontakte sollte ein Absorber (z. B. Löschpapier) auf die Oberseite der Platine aufgelegt werden. Dieser sorgt dafür, dass größere Tropfen aufgesaugt werden. Dies verhindert einen Kurzschluss zwischen zwei Federkontakten. Wird dem Absorber ein Feuchteindikator hinzugefügt, kann der Benutzer auf das entstandene Problem aufmerksam gemacht werden und den Absorber rechtzeitig tauschen. Falls das Kulturmedium dennoch die Federkontakte erreicht, kann die Platine in destilliertem Wasser und anschließend in reinem Alkohol gereinigt werden und ist so innerhalb kürzester Zeit wieder einsatzbereit.

8.1.4 Kabelloser Betrieb des Messsystems

Die Integration eines Messsystems in einen Brutschrank wird erschwert, wenn hierfür Kabel verlegt werden müssen. Ein kabelloses Messgerät beseitigt viele Probleme, die in der Praxis

8.2 Weiterentwicklung der eMTP

entstehen. Beispielsweise kann es schnell zur Reinigung aus- und wieder eingebaut werden. Bei mehreren Messsystemen in einem Brutschrank müssen zahlreiche Kabel verlegt werden. Zur Reinigung des Inkubators müssen diese dann wieder abgebaut und separat gereinigt werden. Zu noch größeren Problemen kann es kommen, wenn das Messsystem in einen Pipettierroboter integriert werden soll. Durch die Bewegungen kann es zu Kabelbrüchen oder Ausfällen der Steckverbindungen kommen, wenn die Verbindungen nicht für diesen Zweck ausgelegt wurden.

Aus diesen Gründen ist es empfehlenswert, ein zukünftiges Messsystem kabellos auszulegen, indem ein Akkumulator zur Energieversorgung eingesetzt wird und die Datenübertragung über eine Funkschnittstelle erfolgt.

Die Messelektronik kann durch die Verwendung moderner integrierter Schaltungen auf eine niedrigere Leistungsaufnahme optimiert werden, sodass ein Akkubetrieb über mehrere Tage realistisch ist. Aktuell sind zudem zahlreiche Low-Power-Funkmodule erhältlich, die eine einfache Integration einer Funkschnittstelle erlauben. Es muss berücksichtigt werden, dass bei einem kommerziellen Produkt die Einhaltung der jeweils gültigen Funkrichtlinien gefordert wird (z. B. Richtlinie 2014/53/EU innerhalb der Europäischen Union). Dadurch können die Entwicklungs- und Zertifizierungsaufwände unter Umständen erhöht werden.

8.2 Weiterentwicklung der eMTP

Wie in der Diskussion in Abschnitt 7.5.2 dargelegt wurde, ist der Austausch des Mediums durch die Fluidik der eMTP nicht effizient umgesetzt. In Zukunft muss die Geometrie der Zellkulturkammer sowie deren Zu- und Abfluss optimiert werden, sodass keine Verwirbelungen in der Zellkulturkammer entstehen. Dadurch lassen sich die benötigte Menge an Zellkulturmedium pro Messzyklus und somit der Verbrauch von fetalem Kälberserum reduzieren.

Ob sich eine sensorbestückte Mikrotiterplatte am Markt durchsetzen kann, wird maßgeblich vom Preis der Platte mitbestimmt. Zur Herstellung der Platten wird in dieser Arbeit eine Hybridtechnologie verwendet, welche die kostengünstige Leiterplattentechnologie mit der Dünnschichttechnologie koppelt. Die Kosten der Plattenherstellung können um das Fünf- bis Zehnfache reduziert werden, wenn die Sensorelektroden komplett in Leiterplattentechnologie hergestellt werden.

Die Fertigung elektrochemischer Sensoren mit Leiterplattentechnologie erfordert die Bewältigung einiger Herausforderungen. So muss beispielsweise verhindert werden, dass Kupfer, welches als Grundmaterial für alle Leiterbahnen eingesetzt wird, an die Sensoroberfläche diffundieren kann und dort elektrochemisch reagiert. Hierfür müssen die Standardprozesse optimiert oder neu kombiniert werden. Bei der galvanischen Abscheidung von Iridiumoxid handelt es sich ebenfalls nicht um einen Standardprozess, der ohne weiteres in die Leitplattenfertigung integriert werden kann.

Eine kosteneffiziente Alternative zur galvanischen Abscheidung von Iridiumoxid könnten druckbare Metalloxidpasten liefern, die nachträglich – beispielsweise mit einem Dispenser oder Siebdrucker – auf die Elektrode der Leiterplatte aufgebracht werden. In der Literatur finden sich diverse Ansätze, die druckbare Metalloxidsensoren beschreiben:

Fog und Burke stellten einen pH-Sensor mit guter Sensitivität her, indem sie Iridiumoxidpulver in eine Polymermatrix mischten [144]. Jedoch wurden keine Details über Langzeitstabilität und Drift berichtet. Park et al. konnten 2014 mit einem ähnlichen Verfahren eine langzeitstabile und leicht regenerierbare pH-Elektrode herstellen [257].

In aktuellen Veröffentlichungen finden zunehmend Pasten aus Mischoxiden Anwendung, da sie bessere Eigenschaften zeigen [258]. Manjakkal und Zaraska untersuchten in mehreren Veröffentlichungen verschiedene Metalloxide und Mischoxide wie Rutheniumdioxid [145, 259], Titandioxid [260] Rutheniumdioxid/Zinndioxid [258], Rutheniumdioxid/Titandioxid [261] und Rutheniumdioxid/Tantalpentoxid [146, 262]. Mischoxide haben den Vorteil, dass ein Teil des teuren Rutheniumoxids durch ein günstigeres Oxid (z. B. Titanoxid) substituiert werden kann.

Als weiterer Vorteil einiger dieser Mischoxide werden die gute Langzeitstabilität und die geringe Drift genannt [258, 261]. Bei Rutheniumdioxid/Titandioxid beispielsweise führte eine fünf monatige Lagerung des gedruckten Sensors in destilliertem Wasser zu keiner feststellbaren Potentialänderung [261].

8.3 Schnittstelle zum Benutzer

Das in dieser Arbeit entwickelte Mikrophysiometer liefert multiparametrische Messdaten, deren Interpretation nicht trivial ist. Die Rohdaten des Sauerstoffsensors und der pH-Elektrode müssen zuerst in die entsprechenden Sauerstoffverbrauchsraten bzw. Ansäuerungsraten umgerechnet werden. Zusätzlich müssen die Messdaten in der Regel sinnvoll normiert werden,

8.4 Entwicklung eines zuverlässigen Gesamtsystems

um die Vergleichbarkeit sicherzustellen. Erschwerend kommt hinzu, dass Einstellungen der Polarisationsspannung, der Abtastrate und der Messfrequenz (bei ECIS) nötig sind und Auswirkungen auf die Messwerte haben.

Aus diesen Gründen muss eine Schnittstelle zwischen dem Benutzer und dem Messsystem entwickelt werden, die zwischen den Fähigkeiten von System und Benutzer vermittelt. Andernfalls besteht die Gefahr, dass die Bedienung des Systems den Benutzer überfordert und hierdurch Probleme bei der Durchführung oder der Auswertung von Assays entstehen.

Diese Schnittstelle muss von einer geeigneten Computersoftware (bzw. einer Smartphone- oder Web-App) bereitgestellt werden. Eine gute Software bietet dem Nutzer den richtigen Grad an Abstraktion, sodass sich dieser auf die Lösung seiner Fragestellung konzentrieren kann. Zum Beispiel muss die Software sowohl Messgerät als auch Pipettierroboter steuern und synchronisieren. Neben einer anwendungsspezifischen Auswertung der Messdaten müssen die korrekte Darstellung der Ergebnisse und deren Export möglich sein. Der Benutzer muss zudem auf bestimmte Parameter und Einstellungen Einfluss nehmen können, wenn dies für seine Fragestellung relevant ist.

Zusätzlich zum technischen System ist die Erstellung und Bereitstellung von Standardarbeitsanweisungen, Application Notes sowie der entsprechenden Testreagenzien nötig. Hierdurch wird für die wichtigsten Anwendungsfälle ein standardisiertes Vorgehen geliefert, um reproduzierbare Ergebnisse unabhängig vom Anwender des Systems zu erzielen. Bei neuen Anwendungsfällen dienen Standardarbeitsanweisungen als Grundlage und Gedankenanstoß für den experimentellen Aufbau sowie für die Versuchsauswertung.

8.4 Entwicklung eines zuverlässigen Gesamtsystems

Ein zuverlässiges Messsystem ist daran zu erkennen, dass es robuste Ergebnisse liefert und bei bestimmungsgemäßem Gebrauch nicht ausfällt. Bei einem komplexen Messsystem, wie der eMTP, haben zahlreiche Teilkomponenten Einfluss darauf, ob das System zuverlässig arbeitet oder nicht. Neben den technischen Komponenten, wie beispielsweise der sensorischen Mikrotiterplatte, dem Pipettierroboter, der Messelektronik und der Software, spielen Anleitungen, Arbeitsanweisungen und Testreagenzien sowie die eingesetzte Zellkultur eine erhebliche Rolle.

Um die Zuverlässigkeit zu erhöhen, muss dieser Zusammenhang beachtet und bei der Qualitätssicherung berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass neben der Überprüfung der

einzelnen Komponenten auch das gesamte System ausreichend getestet wird. Darüber hinaus muss validiert werden, ob das Gesamtsystem im angedachten Anwendungsumfeld ohne Probleme betrieben werden kann und ob für die beabsichtigten Applikationen eine einwandfreie Funktion gewährleistet wird.

Die Zuverlässigkeit des Gesamtsystems muss dem Einsatzzweck angemessen sein, für den das Gerät ausgelegt wird. So ist ein Softwareabsturz mit Datenverlust im Bereich der Grundlagenforschung sicher ärgerlich, aber nicht tragisch. Im Bereich der In-vitro-Diagnostik kann der gleiche Fehler jedoch Einfluss auf den Therapieerfolg eines Patienten haben. Beispielsweise bei der personalisierten Chemotherapie, die auf frisches Biopsiematerial angewiesen ist und eine Wiederholung des Tests erschwert oder ausschließt.

Um folgenschwere Probleme zu vermeiden, ist es wichtig, sich bei der Entwicklung an die relevanten Normen zu halten sowie die geforderten Risikoanalysen, Verifikationen und Validierungen des Gesamtsystems gewissenhaft durchzuführen.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] B. Alberts, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Place of publication not identified: John Wiley and Sons, 2014. [Online]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/3527683267>
- [2] J. E. Dumont, F. Pécasse und C. Maenhaut, „Crosstalk and specificity in signalling“, *Cellular Signalling*, Jg. 13, Nr. 7, S. 457–463, 2001, doi: 10.1016/S0898-6568(01)00168-1.
- [3] B. Wolf, M. Brischwein, H. Grothe, T. Henning und A. M. Otto, „Cell meets Silicon: Mikrosensorarrays für biomedizinische Forschung, Diagnostik und pharmazeutisches Screening“, *Bulletin SEV/VSE*, Jg. 94, Nr. 19, S. 11–15, 2003.
- [4] F. Crick, „Central Dogma of Molecular Biology“, *Nature*, Jg. 227, Nr. 5258, S. 561–563, 1970, doi: 10.1038/227561a0.
- [5] T. Müller, *Der Schneekristallforscher: Erzählung*, 1. Aufl. Asslar: Adeo, 2013.
- [6] W. A. Bentley und W. J. Humphreys, *Snow Crystals*. Newburyport: Dover Publications, 2013.
- [7] V. de Lorenzo, „From the selfish gene to selfish metabolism: revisiting the central dogma“, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 36, Nr. 3, S. 226–235, 2014, doi: 10.1002/bies.201300153.
- [8] B. Wolf und M. Kraus, „Bedeutung der zellulären Selbstorganisation für die Tumorbilogie“, *Naturwissenschaften*, Jg. 80, Nr. 8, S. 343–352, 1993, doi: 10.1007/BF01138789.
- [9] U. Nakaya, *Snow Crystals: Natural and Artificial*. [S.l.]: Harvard University Press, 1954.
- [10] M. Kraus und B. Wolf, *Structured biological modelling: A new approach to biophysical cell biology*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1995.
- [11] B. Wolf, M. Kraus, M. Brischwein, R. Ehret, W. Baumann und M. Lehmann, „Biofunctional hybrid structures—cell–silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics“, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Jg. 46, Nr. 2, S. 215–225, 1998, doi: 10.1016/S0302-4598(98)00169-X.
- [12] D. Bray, „Intracellular signalling as a parallel distributed process“, *Journal of Theoretical Biology*, Jg. 143, Nr. 2, S. 215–231, 1990, doi: 10.1016/S0022-5193(05)80268-1.
- [13] J. C. Owicki und J. Wallace Parce, „Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 7, Nr. 4, S. 255–272, 1992, doi: 10.1016/0956-5663(92)87004-9.
- [14] L. Bousse, „Whole cell biosensors“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 34, 1-3, S. 270–275, 1996, doi: 10.1016/S0925-4005(96)01906-5.
- [15] M. Brischwein und J. Wiest, „Microphysiometry“ in *Bioanalytical Reviews*, doi: 10.1007/11663_2018_2.
- [16] J. R. McKenzie, „Novel Electrochemical Techniques for Metabolic Profiling of Cellular Stress“. Ph.D. dissertation, Vanderbilt Univ., Nashville, 2011. [Online]. Verfügbar unter: <https://ir.vanderbilt.edu/bitstream/handle/1803/11115/JMcKenzie.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- [17] M. Schmidhuber, „Konzeption und Erprobung eines biohybriden nanoanalytischen Handheld Systems“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2011.
- [18] J. Wiest *et al.*, „Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring“, *Analytical Letters*, Jg. 39, Nr. 8, S. 1759–1771, 2006, doi: 10.1080/00032710600714089.
- [19] F. T. Unger, I. Witte und K. A. David, „Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives“, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, Jg. 72, Nr. 4, S. 729–757, 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1772-3.
- [20] R. Kleinhans *et al.*, „Sensor-based cell and tissue screening for personalized cancer chemotherapy“, *Med Biol Eng Comput*, Jg. 50, Nr. 2, S. 117–126, 2012, doi: 10.1007/s11517-011-0855-7.
- [21] V. Lob, „Design und Realisierung eines High-Content-Screeningsystems für lebende Zellen“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2009.
- [22] J. Reßler, „Sensorchips für die multiparametrische zelluläre Bioanalytik und für biohybride Bauelemente“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2008.
- [23] J. Wiest, „Entwicklung und Erprobung von miniaturisierten, elektrochemischen Sensoren für die Gelöst-Sauerstoff-Messung zum Einsatz in Lab-on-chip-Systemen“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2008.
- [24] C. Pfister, „Mikrofluidisch gestützte zellbasierte Assays mit gedruckter Sensorik für High-Content Analytik“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2015.
- [25] D. Weiss, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf und J. Wiest, „Label-free monitoring of whole cell vitality“, *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, Osaka, Japan, S. 1607–1610, 2013, doi: 10.1109/EMBC.2013.6609823.
- [26] J. van Houten und R. R. Preston, „Eukaryotic Unicells: How Useful in Studying Chemoreception?“, *Ann NY Acad Sci*, Jg. 510, 1 Olfaction and, S. 16–22, 1987, doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb43460.x.
- [27] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös und E. Reimhult, „Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures“, *Sensors*, Jg. 8, Nr. 3, S. 1400–1458, 2008, doi: 10.3390/s8031400.
- [28] J. Racek, *Cell-based biosensors*. Lancaster, Pa: Technomic Pub. Co, 1995.
- [29] L. C. Clark und C. Lyons, „Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery“, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jg. 102, Nr. 1, S. 29–45, 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [30] B. Mattiasson, „Biosensors“ in *Biotechnology: Vol. 4: Measuring, modelling, and control*, G. Reed, H.-J. Rehm und K. Schügerl, Hg., 2 Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 1991, S. 75–103, doi: 10.1002/9783527620852.ch3.
- [31] J. Wang, „Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges“, *Electroanalysis*, Jg. 13, Nr. 12, S. 983–988, 2001, doi: 10.1002/1616-8984(200201)10:1<107::AID-SEUP107>3.0.CO;2-Q.
- [32] E. A. H. Hall, *Biosensoren*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995.
- [33] C. A. Corcoran und G. A. Rechnitz, „Cell-based biosensors“, *Trends in Biotechnology*, Jg. 3, Nr. 4, S. 92–96, 1985, doi: 10.1016/0167-7799(85)90091-5.

- [34] P. Wang und Q. Liu, Hg., *Cell-based biosensors: Principles and applications*. Boston: Artech House, 2010.
- [35] P. Gründler, *Chemische Sensoren: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure ; mit 27 Tabellen*. Berlin: Springer, 2012.
- [36] M. Nič, J. Jirát, B. Košata, A. Jenkins und A. McNaught, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- [37] I. Karube, T. Nakahara, T. Matsunaga und S. Suzuki, „Salmonella electrode for screening mutagens“, *Anal. Chem.*, Jg. 54, Nr. 11, S. 1725–1727, 1982, doi: 10.1021/ac00248a015.
- [38] P. Banerjee, S. Kintzios und B. Prabhakarpanthian, „Biotoxin detection using cell-based sensors“, *Toxins*, Jg. 5, Nr. 12, S. 2366–2383, 2013, doi: 10.3390/toxins5122366.
- [39] P. Wang, G. Xu, L. Qin, Y. Xu, Y. Li und R. Li, „Cell-based biosensors and its application in biomedicine“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 108, 1-2, S. 576–584, 2005, doi: 10.1016/j.snb.2004.11.056.
- [40] Q. Liu, C. Wu, H. Cai, N. Hu, J. Zhou und P. Wang, „Cell-based biosensors and their application in biomedicine“, *Chemical reviews*, Jg. 114, Nr. 12, S. 6423–6461, 2014, doi: 10.1021/cr2003129.
- [41] B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret und M. Kraus, „Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 13, Nr. 5, S. 501–509, 1998, doi: 10.1016/S0956-5663(97)00136-X.
- [42] C. Ziegler, „Cell-based biosensors“, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Jg. 366, 6-7, S. 552–559, 2000, doi: 10.1007/s002160051550.
- [43] W. G. Jiang, Hg., *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis*. Dordrecht: Springer, 2012.
- [44] I. Giaever und C. R. Keese, „Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 81, Nr. 12, S. 3761–3764, 1984.
- [45] I. Giaever und C. R. Keese, „Micromotion of mammalian cells measured electrically“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 88, Nr. 17, S. 7896–7900, 1991, doi: 10.1073/pnas.88.17.7896.
- [46] I. Giaever und C. R. Keese, „A morphological biosensor for mammalian cells“, *Nature*, Jg. 366, Nr. 6455, S. 591–592, 1993, doi: 10.1038/366591a0.
- [47] J. Wegener, M. Sieber und H.-J. Galla, „Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces“, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Jg. 32, Nr. 3, S. 151–170, 1996, doi: 10.1016/0165-022X(96)00005-X.
- [48] L. Wang, H. Wang, K. Mitchelson, Z. Yu und J. Cheng, „Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell-substrate impedance sensors“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 24, Nr. 1, S. 14–21, 2008, doi: 10.1016/j.bios.2008.03.018.
- [49] L. Wang, H. Yin, W. Xing, Z. Yu, M. Guo und J. Cheng, „Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 25, Nr. 5, S. 990–995, 2010, doi: 10.1016/j.bios.2009.09.012.
- [50] S. M. Bonk *et al.*, „Design and Characterization of a Sensorized Microfluidic Cell-Culture System with Electro-Thermal Micro-Pumps and Sensors for Cell Adhesion, Oxygen, and pH on a Glass Chip“, *Biosensors*, Jg. 5, Nr. 3, S. 513–536, 2015, doi: 10.3390/bios5030513.

- [51] S. Schafer *et al.*, „Time-dependent observation of individual cellular binding events to field-effect transistors“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 24, Nr. 5, S. 1201–1208, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.07.003.
- [52] P. Lin, F. Yan, J. Yu, H. L. W. Chan und M. Yang, „The application of organic electrochemical transistors in cell-based biosensors“, *Advanced materials*, Jg. 22, Nr. 33, S. 3655–3660, 2010, doi: 10.1002/adma.201000971.
- [53] J. W. Parce *et al.*, „Detection of cell-affecting agents with a silicon biosensor“, *Science*, Jg. 246, Nr. 4927, S. 243–247, 1989, doi: 10.1126/science.2799384.
- [54] H. McConnell *et al.*, „The cytosensor microphysiometer: Biological applications of silicon technology“, *Science*, Jg. 257, Nr. 5078, S. 1906–1912, 1992, doi: 10.1126/science.1329199.
- [55] M. Adami, M. Sartore und C. Nicolini, „PAB: A newly designed potentiometric alternating biosensor system“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 10, 1-2, S. 155–167, 1995, doi: 10.1016/0956-5663(95)96803-7.
- [56] N. Hu, C. Wu, D. Ha, T. Wang, Q. Liu und P. Wang, „A novel microphysiometer based on high sensitivity LAPS and microfluidic system for cellular metabolism study and rapid drug screening“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 40, Nr. 1, S. 167–173, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.010.
- [57] C.-C. Wu, W.-C. Lin und S.-Y. Fu, „The open container-used microfluidic chip using IrO_x ultramicroelectrodes for the in situ measurement of extracellular acidification“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 26, Nr. 10, S. 4191–4197, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2011.04.034.
- [58] I. A. Ges, B. L. Ivanov, A. A. Werdich und F. J. Baudenbacher, „Differential pH measurements of metabolic cellular activity in nl culture volumes using microfabricated iridium oxide electrodes“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 22, Nr. 7, S. 1303–1310, 2007, doi: 10.1016/j.bios.2006.05.033.
- [59] J. R. McKenzie, A. C. Cognata, A. N. Davis, J. P. Wikswo und D. E. Cliffel, „Real-Time Monitoring of Cellular Bioenergetics with a Multianalyte Screen-Printed Electrode“, *Anal. Chem.*, Jg. 87, Nr. 15, S. 7857–7864, 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01533.
- [60] P. Ebbesen *et al.*, „Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies“, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24 Suppl 1, S. 1–39, 2009, doi: 10.1080/14756360902784425.
- [61] J. Park, Y. K. Pak und J. J. Pak, „A microfabricated reservoir-type oxygen sensor for measuring the real-time cellular oxygen consumption rate at various conditions“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 147, Nr. 1, S. 263–269, 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.03.069.
- [62] C.-C. Wu, H.-N. Luk, Y.-T. T. Lin und C.-Y. Yuan, „A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells“, *Talanta*, Jg. 81, 1-2, S. 228–234, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2009.11.062.
- [63] J. Kieninger, A. Dannenberg, K. Aravindalochanan, G. Jobst, E. O. Pettersen und G. A. Urban, „Amperometric Oxygen Sensor Array with Novel Chronoamperometric Protocols for Hypoxic Tumor Cell Cultures“, *TRANSDUCERS 2007 - 2007 International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*, Lyon, France, S. 1907–1910, 2007, doi: 10.1109/SENSOR.2007.4300531.
- [64] R. M. Pemberton *et al.*, „Fabrication and evaluation of a micro(bio)sensor array chip for multiple parallel measurements of important cell biomarkers“, *Sensors*, Jg. 14, Nr. 11, S. 20519–20532, 2014, doi: 10.3390/s141120519.

- [65] S. E. Eklund, D. Taylor, E. Kozlov, A. Prokop und D. E. Cliffler, „A microphysiometer for simultaneous measurement of changes in extracellular glucose, lactate, oxygen, and acidification rate“, *Analytical chemistry*, Jg. 76, Nr. 3, S. 519–527, 2004, doi: 10.1021/ac034641z.
- [66] A. Weltin *et al.*, „Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem“, *Lab on a chip*, Jg. 14, Nr. 1, S. 138–146, 2014, doi: 10.1039/c3lc50759a.
- [67] E. Noiri, Y. Hu, W. F. Bahou, C. R. Keese, I. Giaever und M. S. Goligorsky, „Permissive Role of Nitric Oxide in Endothelin-induced Migration of Endothelial Cells“, *Journal of Biological Chemistry*, Jg. 272, Nr. 3, S. 1747–1752, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.3.1747.
- [68] D. Waldenmaier, „Rapid in vitro chemosensitivity analysis of human colon tumor cell lines“, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Jg. 192, Nr. 3, S. 237–245, 2003, doi: 10.1016/S0041-008X(03)00257-6.
- [69] F. Demmel, „Korrelative Sensorik und Bildgebung für die funktionale Tumor-Analytik“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2016. [Online]. Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20160714-1277722-1-3>
- [70] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley und C. B. Thompson, „Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation“, *Science*, Jg. 324, Nr. 5930, S. 1029–1033, 2009, doi: 10.1126/science.1160809.
- [71] F. Hafner, „Cytosensor® Microphysiometer: Technology and recent applications“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 15, 3-4, S. 149–158, 2000, doi: 10.1016/S0956-5663(00)00069-5.
- [72] K. Wille, L. A. Paige und A. J. Higgins, „Application of the Cytosensor™ Microphysiometer to Drug Discovery“, *Receptors and Channels*, Jg. 9, Nr. 2, S. 125–131, 2011, doi: 10.3109/10606820308246.
- [73] J. W. Harbell, R. Osborne, G. J. Carr und A. Peterson, „Assessment of the Cytosensor Microphysiometer Assay in the COLIPA In Vitro Eye Irritation Validation Study“, *Toxicology in Vitro*, Jg. 13, Nr. 2, S. 313–323, 1999, doi: 10.1016/S0887-2333(98)00090-3.
- [74] J. Dunlop, Y. Zhang, D. L. Smith und L. E. Schechter, „Characterization of 5-HT1A receptor functional coupling in cells expressing the human 5-HT1A receptor as assessed with the cytosensor microphysiometer“, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Jg. 40, Nr. 1, S. 47–55, 1998, doi: 10.1016/S1056-8719(98)00035-5.
- [75] R. E. Jordan, D. Smart, P. Grimson, N. Suman-Chauhan und A. T. McKnight, „Activation of the cloned human NK3 receptor in Chinese Hamster Ovary cells characterized by the cellular acidification response using the Cytosensor microphysiometer“, *British journal of pharmacology*, Jg. 125, Nr. 4, S. 761–766, 1998, doi: 10.1038/sj.bjp.0702156.
- [76] M. J. Brown, M. D. Wood, M. C. Coldwell und D. R. Bristow, „Measurement of GABAA receptor function in rat cultured cerebellar granule cells by the Cytosensor microphysiometer“, *British journal of pharmacology*, Jg. 121, Nr. 1, S. 71–76, 1997, doi: 10.1038/sj.bjp.0701106.
- [77] M. Richards, P. van Giersbergen, A. Zimmermann, B. Lesur und J. Hoflack, „Activation of neurotensin receptors and purinoceptors in human colonie adenocarcinoma cells detected with the microphysiometer“, *Biochemical Pharmacology*, Jg. 54, Nr. 7, S. 825–832, 1997, doi: 10.1016/S0006-2952(97)00258-X.

- [78] R. M. Johnson, P. A. McNeeley, K. DeMoor, G. R. Stewart, B. S. Glaeser und S. Pitchford, „Recombinant human ciliary neurotrophic factor stimulates the metabolic activity of SH-SY5Y cells as measured by a cytosensor microphysiometer“, *Brain Research*, Jg. 646, Nr. 2, S. 327–331, 1994, doi: 10.1016/0006-8993(94)90100-7.
- [79] S. Alegret und A. Merkoçi, *Electrochemical sensor analysis*, 1. Aufl. Amsterdam, London: Elsevier, 2007.
- [80] P. Kurzweil, „Metal Oxides and Ion-Exchanging Surfaces as pH Sensors in Liquids: State-of-the-Art and Outlook“, *Sensors*, Jg. 9, Nr. 6, S. 4955–4985, 2009, doi: 10.3390/s90604955.
- [81] M. Wang, S. Yao und M. Madou, „A long-term stable iridium oxide pH electrode“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 81, 2-3, S. 313–315, 2002, doi: 10.1016/S0925-4005(01)00972-8.
- [82] I. A. Ges, I. A. Dzhura und F. J. Baudenbacher, „On-chip acidification rate measurements from single cardiac cells confined in sub-nanoliter volumes“, *Biomedical microdevices*, Jg. 10, Nr. 3, S. 347–354, 2008, doi: 10.1007/s10544-007-9142-7.
- [83] M. W. Shinwari, D. Zhitomirsky, I. A. Deen, P. R. Selvaganapathy, M. J. Deen und D. Landheer, „Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications“, *Sensors*, Jg. 10, Nr. 3, S. 1679–1715, 2010, doi: 10.3390/s100301679.
- [84] H. Yang *et al.*, „An iridium oxide reference electrode for use in microfabricated biosensors and biochips“, *Lab on a chip*, Jg. 4, Nr. 1, S. 42–46, 2004, doi: 10.1039/b309899k.
- [85] R. M. Pemberton *et al.*, „Microfabricated glucose biosensor for culture well operation“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 42, S. 668–677, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.11.032.
- [86] M. Cerejido, E. S. Robbins, W. J. Dolan, C. A. Rotunno und D. D. Sabatini, „Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support“, *The Journal of cell biology*, Jg. 77, Nr. 3, S. 853–880, 1978, doi: 10.1083/jcb.77.3.853.
- [87] T. M. Curtis *et al.*, „A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water“, *Lab on a chip*, Jg. 9, Nr. 15, S. 2176–2183, 2009, doi: 10.1039/b901314h.
- [88] A. Susloparova, D. Koppenhöfer, J. K. Y. Law, X. T. Vu und S. Ingebrandt, „Electrical cell-substrate impedance sensing with field-effect transistors is able to unravel cellular adhesion and detachment processes on a single cell level“, *Lab on a chip*, Jg. 15, Nr. 3, S. 668–679, 2015, doi: 10.1039/c4lc00593g.
- [89] A. Mucha, M. Schienle und D. Schmitt-Landsiedel, „Sensing cellular adhesion with a CMOS integrated impedance-to-frequency converter“, *2011 IEEE Sensors Applications Symposium*, San Antonio, TX, USA, S. 12–17, 2011, doi: 10.1109/SAS.2011.5739770.
- [90] A. Mucha, M. Schienle und D. Schmitt-Landsiedel, „A CMOS integrated impedance-to-frequency converter for sensing cellular adhesion“, *Adv. Radio Sci.*, Jg. 9, S. 281–287, 2011, doi: 10.5194/ars-9-281-2011.
- [91] A. Mucha, „CMOS Integrated Impedance Sensor Arrays for Cell Adhesion Measurement“. Dissertation, Lehrstuhl für Technische Elektronik, TU München, München, 2012. [Online]. Verfügbar unter: <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1095405/1095405.pdf>
- [92] A. Offenhäusser, C. Sprössler, M. Matsuzawa und W. Knoll, „Field-effect transistor array for monitoring electrical activity from mammalian neurons in culture“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 12, Nr. 8, S. 819–826, 1997, doi: 10.1016/S0956-5663(97)00047-X.
- [93] C. H. Hamann und W. Vielstich, *Elektrochemie*, 4. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

- [94] N. Hu *et al.*, „Comparison between ECIS and LAPS for establishing a cardiomyocyte-based biosensor“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 185, S. 238–244, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.04.093.
- [95] W. Baumann, M. Lehmann, A. Schwinde, R. Ehret, M. Brischwein und B. Wolf, „Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 55, Nr. 1, S. 77–89, 1999, doi: 10.1016/S0925-4005(99)00116-1.
- [96] M. Lehmann *et al.*, „Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 16, Nr. 3, S. 195–203, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00123-3.
- [97] T. F. Shinawi, D. W. Kimmel und D. E. Cliffel, „Multianalyte microphysiometry reveals changes in cellular bioenergetics upon exposure to fluorescent dyes“, *Analytical chemistry*, Jg. 85, Nr. 24, S. 11677–11680, 2013, doi: 10.1021/ac402764x.
- [98] S. E. Eklund *et al.*, „Metabolic discrimination of select list agents by monitoring cellular responses in a multianalyte microphysiometer“, *Sensors*, Jg. 9, Nr. 3, S. 2117–2133, 2009, doi: 10.3390/s90302117.
- [99] E. A. Lima *et al.*, „Multichamber Multipotentiostat System for Cellular Microphysiometry“, *Sensors and actuators. B, Chemical*, Jg. 204, S. 536–543, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.07.126.
- [100] W. Yicong *et al.*, „A novel microphysiometer based on MLAPS for drugs screening“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 16, 4-5, S. 277–286, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00138-5.
- [101] C. Wu, J. Zhou, N. Hu, D. Ha, X. Miao und P. Wang, „Cellular impedance sensing combined with LAPS as a new means for real-time monitoring cell growth and metabolism“, *Sensors and Actuators A: Physical*, Jg. 199, S. 136–142, 2013, doi: 10.1016/j.sna.2013.05.010.
- [102] K. Su *et al.*, „Integrated multifunctional cell-based biosensor system for monitoring extracellular acidification and cellular growth“, *Sensors and Actuators A: Physical*, Jg. 220, S. 144–152, 2014, doi: 10.1016/j.sna.2014.10.005.
- [103] I. Burdallo und C. Jiménez-Jorquera, „Microelectrodes for the measurement of cellular metabolism“, *Procedia Chemistry*, Jg. 1, Nr. 1, S. 289–292, 2009, doi: 10.1016/j.proche.2009.07.072.
- [104] D. J. Adlam und D. E. Woolley, „A Multiwell Electrochemical Biosensor for Real-Time Monitoring of the Behavioural Changes of Cells in Vitro“, *Sensors*, Jg. 10, Nr. 4, S. 3732–3740, 2010, doi: 10.3390/s100403732.
- [105] J. Kieninger, „Electrochemical Microsensor System for Cell Culture Monitoring“. Dissertation, Tech. Fac., Univ. of Freiburg, Freiburg, 2011.
- [106] S. Buehler *et al.*, „Cell Monitoring and Manipulation Systems (CMMSs) based on Glass Cell-Culture Chips (GC3s)“, *Micromachines*, Jg. 7, Nr. 7, S. 106, 2016, doi: 10.3390/mi7070106.
- [107] M. Stubbe, M. Holtappels und J. Gimsa, „A new working principle for ac electrohydrodynamic on-chip micro-pumps“, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Jg. 40, Nr. 21, S. 6850–6856, 2007, doi: 10.1088/0022-3727/40/21/055.
- [108] A. Moya *et al.*, „Flexible microfluidic bio-lab-on-a-chip multi-sensor platform for electrochemical measurements“, *SENSORS, 2014 IEEE*, Valencia, Spain, S. 1018–1021, 2014, doi: 10.1109/ICSENS.2014.6985176.

- [109] B. Becker, „Automatisierung eines Cell-Based-Assay Systems zur prädiktiven Tumorklassifikation“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2011.
- [110] M. Wu *et al.*, „Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells“, *American journal of physiology. Cell physiology*, Jg. 292, Nr. 1, C125-36, 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00247.2006.
- [111] F. Demmel, M. Brischwein, P. Wolf, F. Huber, C. Pfister und B. Wolf, „Nutrient depletion and metabolic profiles in breast carcinoma cell lines measured with a label-free platform“, *Physiological measurement*, Jg. 36, Nr. 7, S. 1367–1381, 2015, doi: 10.1088/0967-3334/36/7/1367.
- [112] O. Pollen, *bioREACTOR* 48. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.2mag.de/de/produkte/bioreactor/bioreactor-48.html> (Zugriff am: 6. Januar 2019).
- [113] M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, M. Kraus, M. Lehmann und B. Wolf, „The Physiocontrol-Microsystem (PCM): Analysis of Cellular Behaviour for Biomedical Research“ in *Microreaction Technology: Proceedings of the First International Conference on Microreaction Technology*, W. Ehrfeld, Hg., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, S. 251–258, doi: 10.1007/978-3-642-72076-5_29.
- [114] R. Kubisch, U. Bohrn, M. Fleischer und E. Stutz, „Cell-based sensor system using L6 cells for broad band continuous pollutant monitoring in aquatic environments“, *Sensors*, Jg. 12, Nr. 3, S. 3370–3393, 2012, doi: 10.3390/s120303370.
- [115] U. Bohrn, E. Stütz, M. Fleischer, M. J. Schöning und P. Wagner, „Using a cell-based gas biosensor for investigation of adverse effects of acetone vapors in vitro“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 40, Nr. 1, S. 393–400, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.08.029.
- [116] U. Bohrn *et al.*, „A critical comparison of cell-based sensor systems for the detection of Cr(VI) in aquatic environment“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 182, S. 58–65, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.02.105.
- [117] E. Thedinga *et al.*, „Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects“, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Jg. 220, Nr. 1, S. 33–44, 2007, doi: 10.1016/j.taap.2006.12.027.
- [118] W. G. Jiang, Hg., *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis*. Dordrecht: Springer, 2012.
- [119] C. Bot *et al.*, „Cardiotoxicity screening using the CardioExcyte 96: A noninvasive methodology of combining extracellular field potential and impedance measurements“, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Jg. 75, S. 192–193, 2015, doi: 10.1016/j.vascn.2015.08.117.
- [120] L. Doerr *et al.*, „New easy-to-use hybrid system for extracellular potential and impedance recordings“, *Journal of laboratory automation*, Jg. 20, Nr. 2, S. 175–188, 2015, doi: 10.1177/2211068214562832.
- [121] I. Wadsö, D. Hallén, M. Jansson, J. Suurkuusk, T. Wenzler und O. Braissant, „A well-plate format isothermal multi-channel microcalorimeter for monitoring the activity of living cells and tissues“, *Thermochimica Acta*, Jg. 652, S. 141–149, 2017, doi: 10.1016/j.tca.2017.03.010.
- [122] O. Braissant *et al.*, „Isothermal microcalorimetry accurately detects bacteria, tumorous microtissues, and parasitic worms in a label-free well-plate assay“, *Biotechnology journal*, Jg. 10, Nr. 3, S. 460–468, 2015, doi: 10.1002/biot.201400494.

- [123] E. Cabala, „Monitoring multiparametrischer komplexer Mikrosensorarrays für zelluläre Analytik“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2007. [Online]. Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20070424-620614-0-4>
- [124] C. Stepper, „Entwurf, Herstellung und Charakterisierung von Biosensorchips“. Dissertation, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2005. [Online]. Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss2005031616362>
- [125] N. Mzoughi *et al.*, „Characterization of novel impedimetric pH-sensors based on solution-processable biocompatible thin-film semiconducting organic coatings“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172, S. 537–543, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2012.05.029.
- [126] S. Głab, A. Hulanicki, G. Edwall und F. Ingman, „Metal-Metal Oxide and Metal Oxide Electrodes as pH Sensors“, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Jg. 21, Nr. 1, S. 29–47, 1989, doi: 10.1080/10408348908048815.
- [127] J. Janata, „Do optical sensors really measure pH?“, *Anal. Chem.*, Jg. 59, Nr. 9, S. 1351–1356, 1987, doi: 10.1021/ac00136a019.
- [128] H.-D. Belitz *et al.*, Hg., *Analytik der Lebensmittel: Physikalische und Physikalisch-Chemische Untersuchungsmethoden*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1965.
- [129] A. J. Bard und L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 2. Aufl. New York: Wiley, 2001.
- [130] E. Nilsson und G. Edwall, „Continuous pH monitoring with monocrystalline antimony electrodes: Toxicity considerations from studies on heparinized human plasma“, *Scand J Clin Lab Invest*, Jg. 43, Nr. 6, S. 539–542, 1983, doi: 10.1080/00365518309168442.
- [131] A. Adami, C. Röss, C. Collini, S. Pedrotti und L. Lorenzelli, „Development of an integrated electrochemical system for in vitro yeast viability testing“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 40, Nr. 1, S. 315–322, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.070.
- [132] S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin und M. Zen, „Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 16, 9-12, S. 1043–1050, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00202-0.
- [133] P. Bergveld, „Thirty years of ISFETOLOGY“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 88, Nr. 1, S. 1–20, 2003, doi: 10.1016/S0925-4005(02)00301-5.
- [134] D. E. Yates, S. Levine und T. W. Healy, „Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface“, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, Jg. 70, Nr. 0, S. 1807, 1974, doi: 10.1039/F19747001807.
- [135] P. Bergveld, J. Hendrikse und W. Olthuis, „Theory and application of the material work function for chemical sensors based on the field effect principle“, *Meas. Sci. Technol.*, Jg. 9, Nr. 11, S. 1801–1808, 1998, doi: 10.1088/0957-0233/9/11/003.
- [136] J. Hendrikse, W. Olthuis und P. Bergveld, „Characterization of the EMOSFET, a novel one-electrode chemical transducer for redox measurements“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 458, 1-2, S. 23–29, 1998, doi: 10.1016/S0022-0728(98)00348-9.
- [137] J. Hendrikse, W. Olthuis und P. Bergveld, „A method of reducing oxygen induced drift in iridium oxide pH sensors“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 53, 1-2, S. 97–103, 1998, doi: 10.1016/S0925-4005(98)00298-6.
- [138] J. Hendrikse, W. Olthuis und P. Bergveld, „A drift free nernstian iridium oxide pH sensor: Digest of technical papers“, S. 1367–1370, 1997, doi: 10.1109/SENSOR.1997.635491.

- [139] G. Scheiblin *et al.*, „Screen-printed organic electrochemical transistors for metabolite sensing“, *MRC*, Jg. 5, Nr. 03, S. 507–511, 2015, doi: 10.1557/mrc.2015.52.
- [140] W.-S. Han, K.-C. Chung, M.-H. Kim, H.-B. Ko, Y.-H. Lee und T.-K. Hong, „A Hydrogen Ion-Selective Poly(aniline) Solid Contact Electrode Based on Dibenzylpyrenemethylamine Ionophore for Highly Acidic Solutions“, *Anal. Sci.*, Jg. 20, Nr. 10, S. 1419–1422, 2004, doi: 10.2116/analsci.20.1419.
- [141] X. Zhang, B. Ogorevc und J. Wang, „Solid-state pH nanoelectrode based on polyaniline thin film electrodeposited onto ion-beam etched carbon fiber“, *Analytica chimica acta*, Jg. 452, Nr. 1, S. 1–10, 2002, doi: 10.1016/S0003-2670(01)01435-0.
- [142] N. Zine *et al.*, „All-solid-state hydrogen sensing microelectrodes based on novel PPy[3,3'-Co(1,2-C2B9H11)2] as a solid internal contact“, *Materials Science and Engineering: C*, Jg. 26, 2-3, S. 399–404, 2006, doi: 10.1016/j.msec.2005.10.073.
- [143] T. Lindfors und A. Ivaska, „pH sensitivity of polyaniline and its substituted derivatives“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 531, Nr. 1, S. 43–52, 2002, doi: 10.1016/S0022-0728(02)01005-7.
- [144] A. Fog und R. P. Buck, „Electronic semiconducting oxides as pH sensors“, *Sensors and Actuators*, Jg. 5, Nr. 2, S. 137–146, 1984, doi: 10.1016/0250-6874(84)80004-9.
- [145] L. Manjakkal, B. Synkiewicz, K. Zaraska, K. Cvejcin, J. Kulawik und D. Szwagierczak, „Development and characterization of miniaturized LTCC pH sensors with RuO₂ based sensing electrodes“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 223, S. 641–649, 2016, doi: 10.1016/j.snb.2015.09.135.
- [146] L. Manjakkal, K. Zaraska, K. Cvejcin, J. Kulawik und D. Szwagierczak, „Potentiometric RuO₂-Ta₂O₅ pH sensors fabricated using thick film and LTCC technologies“, *Talanta*, Jg. 147, S. 233–240, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.09.069.
- [147] J. E. Baur und T. W. Spaine, „Electrochemical deposition of iridium (IV) oxide from alkaline solutions of iridium(III) oxide“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 443, Nr. 2, S. 208–216, 1998, doi: 10.1016/S0022-0728(97)00532-9.
- [148] S. Kakooei, M. C. Ismail und B. Ari-Wahjoedi, „An overview of pH Sensors Based on Iridium Oxide: Fabrication and Application“, *International Journal of Material Science Innovations*, Jg. 1, Nr. 1, S. 62–72, 2013.
- [149] I. Song, K. Fink und J. H. Payer, „Metal Oxide/Metal pH Sensor: Effect of Anions on pH Measurements“, *CORROSION*, Jg. 54, Nr. 1, S. 13–19, 1998, doi: 10.5006/1.3284823.
- [150] S. A. M. Marzouk, S. Ufer, R. P. Buck, T. A. Johnson, L. A. Dunlap und W. E. Cascio, „Electrodeposited Iridium Oxide pH Electrode for Measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute Ischemia“, *Anal. Chem.*, Jg. 70, Nr. 23, S. 5054–5061, 1998, doi: 10.1021/ac980608e.
- [151] C. M. Nguyen, S. Rao, Y.-S. Seo, K. Schadt, Y. Hao und J.-C. Chiao, „Micro pH Sensors Based on Iridium Oxide Nanotubes“, *IEEE Trans. Nanotechnology*, Jg. 13, Nr. 5, S. 945–953, 2014, doi: 10.1109/TNANO.2014.2332871.
- [152] S. R. Ng und D. O'Hare, „An iridium oxide microelectrode for monitoring acute local pH changes of endothelial cells“, *The Analyst*, Jg. 140, Nr. 12, S. 4224–4231, 2015, doi: 10.1039/c5an00377f.
- [153] J. Kieninger, A. Marx, F. Spies, A. Weltin, G. A. Urban und G. Jobst, „pH micro sensor with micro-fluidic liquid-junction reference electrode on-chip for cell culture applications“, *SENSORS, 2009 IEEE*, Christchurch, New Zealand, S. 2009–2012, 2009, doi: 10.1109/ICSENS.2009.5398297.

- [154] L. D. Burke, J. K. Mulcahy und D. P. Whelan, „Preparation of an oxidized iridium electrode and the variation of its potential with pH“, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Jg. 163, 1-2, S. 117–128, 1984, doi: 10.1016/S0022-0728(84)80045-5.
- [155] Y. Lu, T. Wang, Z. Cai, Y. Cao, H. Yang und Y. Y. Duan, „Anodically electrodeposited iridium oxide films microelectrodes for neural microstimulation and recording“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 137, Nr. 1, S. 334–339, 2009, doi: 10.1016/j.snb.2008.11.036.
- [156] R. D. Meyer, S. F. Cogan, T. H. Nguyen und R. D. Rauh, „Electrodeposited iridium oxide for neural stimulation and recording electrodes“, *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, Jg. 9, Nr. 1, S. 2–11, 2001, doi: 10.1109/7333.918271.
- [157] S. Yao, M. Wang und M. Madou, „A pH Electrode Based on Melt-Oxidized Iridium Oxide“, *J. Electrochem. Soc.*, Jg. 148, Nr. 4, S. H29, 2001, doi: 10.1149/1.1353582.
- [158] K. Yamanaka, „Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Films (AEIROF) from Alkaline Solutions for Electrochromic Display Devices“, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Jg. 28, Part 1, No. 4, S. 632–637, 1989, doi: 10.1143/JJAP.28.632.
- [159] T. Katsube, I. Lauks und J. N. Zemel, „pH-sensitive sputtered iridium oxide films“, *Sensors and Actuators*, Jg. 2, S. 399–410, 1981, doi: 10.1016/0250-6874(81)80060-1.
- [160] K. G. Kreider, M. J. Tarlov und J. P. Cline, „Sputtered thin-film pH electrodes of platinum, palladium, ruthenium, and iridium oxides“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 28, Nr. 3, S. 167–172, 1995, doi: 10.1016/0925-4005(95)01655-4.
- [161] D. Midgley, „A review of pH measurement at high temperatures“, *Talanta*, Jg. 37, Nr. 8, S. 767–781, 1990, doi: 10.1016/0039-9140(90)80118-Y.
- [162] L. D. Burke und D. P. Whelan, „A voltammetric investigation of the charge storage reactions of hydrous iridium oxide layers“, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Jg. 162, 1-2, S. 121–141, 1984, doi: 10.1016/S0022-0728(84)80159-X.
- [163] T. Y. Kim und S. Yang, „Fabrication method and characterization of electrodeposited and heat-treated iridium oxide films for pH sensing“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 196, S. 31–38, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.02.004.
- [164] G. M. da Silva, S. G. Lemos, L. A. Pocrifka, P. D. Marreto, A. V. Rosario und E. C. Pereira, „Development of low-cost metal oxide pH electrodes based on the polymeric precursor method“, *Analytica chimica acta*, Jg. 616, Nr. 1, S. 36–41, 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.03.019.
- [165] J. Hendrikse, W. Olthuis und P. Bergveld, „The EMOSFET as a potentiometric transducer in an oxygen sensor“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 47, 1-3, S. 1–8, 1998, doi: 10.1016/S0925-4005(98)00047-1.
- [166] P. Steegstra und E. Ahlberg, „Influence of oxidation state on the pH dependence of hydrous iridium oxide films“, *Electrochimica Acta*, Jg. 76, S. 26–33, 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.04.143.
- [167] W. Olthuis, M. Robben, P. Bergveld, M. Bos und W. E. van der Linden, „pH sensor properties of electrochemically grown iridium oxide“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 2, Nr. 4, S. 247–256, 1990, doi: 10.1016/0925-4005(90)80150-X.
- [168] W. M. Haynes und D. R. Lide, Hg., *CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data*, 96. Aufl. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2015.

- [169] S. A. M. Marzouk, „Improved Electrodeposited Iridium Oxide pH Sensor Fabricated on Etched Titanium Substrates“, *Anal. Chem.*, Jg. 75, Nr. 6, S. 1258–1266, 2003, doi: 10.1021/ac0261404.
- [170] T. Y. Kim, S. A. Hong und S. Yang, „A solid-state thin-film Ag/AgCl reference electrode coated with graphene oxide and its use in a pH sensor“, *Sensors*, Jg. 15, Nr. 3, S. 6469–6482, 2015, doi: 10.3390/s150306469.
- [171] E. Prats-Alfonso, L. Abad, N. Casañ-Pastor, J. Gonzalo-Ruiz und E. Baldrich, „Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 39, Nr. 1, S. 163–169, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.022.
- [172] S. Carroll und R. P. Baldwin, „Self-calibrating microfabricated iridium oxide pH electrode array for remote monitoring“, *Analytical chemistry*, Jg. 82, Nr. 3, S. 878–885, 2010, doi: 10.1021/ac9020374.
- [173] H. A. Elsen, C. F. Monson und M. Majda, „Effects of Electrodeposition Conditions and Protocol on the Properties of Iridium Oxide pH Sensor Electrodes“, *J. Electrochem. Soc.*, Jg. 156, Nr. 1, S. F1, 2009, doi: 10.1149/1.3001924.
- [174] C. C. Mayorga Martinez, R. E. Madrid und C. J. Felice, „A pH Sensor Based on a Stainless Steel Electrode Electrodeposited With Iridium Oxide“, *IEEE Trans. Educ.*, Jg. 52, Nr. 1, S. 133–136, 2009, doi: 10.1109/TE.2008.921451.
- [175] A. N. Bezbaruah und T. C. Zhang, „Fabrication of Anodically Electrodeposited Iridium Oxide Film pH Microelectrodes for Microenvironmental Studies“, *Anal. Chem.*, Jg. 74, Nr. 22, S. 5726–5733, 2002, doi: 10.1021/ac020326l.
- [176] I. A. Ges, B. L. Ivanov, D. K. Schaffer, E. A. Lima, A. A. Werdich und F. J. Baudenbacher, „Thin-film IrOx pH microelectrode for microfluidic-based microsystems“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 21, Nr. 2, S. 248–256, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.09.021.
- [177] M. L. Hitchman und S. Ramanathan, „A field-induced poisoning technique for promoting convergence of standard electrode potential values of thermally oxidized iridium pH sensors“, *Talanta*, Jg. 39, Nr. 2, S. 137–144, 1992, doi: 10.1016/0039-9140(92)80008-2.
- [178] S. Ardizzone, A. Carugati und S. Trasatti, „Properties of thermally prepared iridium dioxide electrodes“, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Jg. 126, 1-3, S. 287–292, 1981, doi: 10.1016/S0022-0728(81)80437-8.
- [179] M. L. Hitchman und S. Ramanathan, „Evaluation of iridium oxide electrodes formed by potential cycling as pH probes“, *Analyst*, Jg. 113, Nr. 1, S. 35, 1988, doi: 10.1039/AN9881300035.
- [180] P. Steegstra und E. Ahlberg, „In situ pH measurements with hydrous iridium oxide in a rotating ring disc configuration“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 685, S. 1–7, 2012, doi: 10.1016/j.jelechem.2012.07.040.
- [181] J. Kanwisher, „Polarographic oxygen electrode“, *Limnol. Oceanogr.*, Jg. 4, Nr. 2, S. 210–217, 1959, doi: 10.4319/lo.1959.4.2.0210.
- [182] H. Danneel, „Über den durch diffundierende Gase hervorgerufenen Reststrom“, *Z. Elektrotech. Elektrochem.*, Jg. 4, Nr. 9, S. 227–232, 1897, doi: 10.1002/bbpc.18970040903.
- [183] J. W. Severinghaus und P. B. Astrup, „History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode“, *J Clin Monitor Comput*, Jg. 2, Nr. 2, S. 125–139, 1986, doi: 10.1007/BF01637680.

- [184] G. Jobst *et al.*, „Thin-film Clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications“, *Biosensors and Bioelectronics*, Jg. 8, 3-4, S. 123–128, 1993, doi: 10.1016/0956-5663(93)85024-I.
- [185] G. W. McLaughlin, K. Braden, B. Franc und G. T. Kovacs, „Microfabricated solid-state dissolved oxygen sensor“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 83, 1-3, S. 138–148, 2002, doi: 10.1016/S0925-4005(02)00021-7.
- [186] F. J. Del Campo, O. Ordeig, N. Vigués, N. Godino, J. Mas und F. X. Muñoz, „Continuous measurement of acute toxicity in water using a solid state microrespirometer“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 126, Nr. 2, S. 515–521, 2007, doi: 10.1016/j.snb.2007.03.038.
- [187] J. Orozco, C. Fernández-Sánchez und C. Jiménez-Jorquera, „Ultramicroelectrode array based sensors: a promising analytical tool for environmental monitoring“, *Sensors*, Jg. 10, Nr. 1, S. 475–490, 2010, doi: 10.3390/s100100475.
- [188] F. van Rossem *et al.*, „Sensing oxygen at the millisecond time-scale using an ultramicroelectrode array (UMEA)“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 238, S. 1008–1016, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.06.156.
- [189] C. Belmont, M.-L. Tercier, J. Buffle, G. C. Fiaccabrino und M. Koudelka-Hep, „Mercury-plated iridium-based microelectrode arrays for trace metals detection by voltammetry: Optimum conditions and reliability“, *Analytica chimica acta*, Jg. 329, Nr. 3, S. 203–214, 1996, doi: 10.1016/0003-2670(96)00116-X.
- [190] P.-A. Jöngren und G. Edwall, „Evaluation of the influence of impurities on the oxygen sensitivity of monocrystalline antimony electrodes“, *Electrochimica Acta*, Jg. 25, Nr. 12, S. 1585–1590, 1980, doi: 10.1016/0013-4686(80)80009-0.
- [191] S. Zhuiykov, D. O'Brien und M. Best, „Water quality assessment by an integrated multi-sensor based on semiconductor RuO₂ nanostructures“, *Meas. Sci. Technol.*, Jg. 20, Nr. 9, S. 95201, 2009, doi: 10.1088/0957-0233/20/9/095201.
- [192] R. Martínez-Mañez *et al.*, „New potentiometric dissolved oxygen sensors in thick film technology“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 101, Nr. 3, S. 295–301, 2004, doi: 10.1016/j.snb.2004.03.008.
- [193] S. Zhuiykov, „Solid-state sensors monitoring parameters of water quality for the next generation of wireless sensor networks“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 161, Nr. 1, S. 1–20, 2012, doi: 10.1016/j.snb.2011.10.078.
- [194] B.-K. Sohn und C.-S. Kim, „A new pH-ISFET based dissolved oxygen sensor by employing electrolysis of oxygen“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 34, 1-3, S. 435–440, 1996, doi: 10.1016/S0925-4005(97)80017-2.
- [195] C.-S. Kim, D.-H. Kwon und B.-K. Sohn, „A New Ph-isfet Based Dissolved Oxygen Sensor“, *Proceedings of the International Solid-State Sensors and Actuators Conference - TRANSDUCERS '95*, Stockholm, Sweden, S. 913–916, 1995, doi: 10.1109/SENSOR.1995.721988.
- [196] Y. Eminaga, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf und J. Wiest, „3.5.4 Multiparametric Microsensors on Labonchip Systems for the Detection of Dissolved Substances“, *14th International Meeting on Chemical Sensors - IMCS 2012*, Nürnberg, Germany, 2012, doi: 10.5162/IMCS2012/3.5.4.
- [197] G. Inzelt, A. Lewenstam und F. Scholz, *Handbook of Reference Electrodes*. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. [Online]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-36188-3>

- [198] U. Guth, F. Gerlach, M. Decker, W. Oelßner und W. Vonau, „Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors“, *J Solid State Electrochem*, Jg. 13, Nr. 1, S. 27–39, 2009, doi: 10.1007/s10008-008-0574-7.
- [199] E. Bakker, „Electroanalysis with Membrane Electrodes and Liquid-Liquid Interfaces“, *Analytical chemistry*, Jg. 88, Nr. 1, S. 395–413, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04034.
- [200] A. Michalska, „All-Solid-State Ion Selective and All-Solid-State Reference Electrodes“, *Electroanalysis*, Jg. 24, Nr. 6, S. 1253–1265, 2012, doi: 10.1002/elan.201200059.
- [201] H. Ha und J. Payer, „The Effect of Silver Chloride Formation on the Kinetics of Silver Dissolution in Chloride Solution“, *Electrochimica Acta*, Jg. 56, Nr. 7, S. 2781–2791, 2011, doi: 10.1016/j.electacta.2010.12.050.
- [202] P. Ehrismann und W. Haller, „Polymer- Elektrolyt, Halbzelle für elektrochemische Messungen sowie deren Verwendung.“ EP1560019B1 04100299.9, Aug 3, 2005.
- [203] H. H. van den Vlekkert, N. F. de Rooij, A. van den Berg und A. Grisel, „Multi-ion sensing system based on glass-encapsulated pH-ISFETs and a pseudo-REFET“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 1, 1-6, S. 395–400, 1990, doi: 10.1016/0925-4005(90)80237-T.
- [204] N. Abramova und A. Bratov, „Photocurable polymers for ion selective field effect transistors. 20 years of applications“, *Sensors*, Jg. 9, Nr. 9, S. 7097–7110, 2009, doi: 10.3390/s90907097.
- [205] J. Melai, C. Salm, S. Smits, J. Visschers und J. Schmitz, „The electrical conduction and dielectric strength of SU-8“, *J. Micromech. Microeng.*, Jg. 19, Nr. 6, S. 65012, 2009, doi: 10.1088/0960-1317/19/6/065012.
- [206] J. Carlier *et al.*, „Integrated microfluidics based on multi-layered SU-8 for mass spectrometry analysis“, *J. Micromech. Microeng.*, Jg. 14, Nr. 4, S. 619–624, 2004, doi: 10.1088/0960-1317/14/4/024.
- [207] S. Bystrova, R. Luttge und A. van den Berg, „Study of crack formation in high-aspect ratio SU-8 structures on silicon“, *Microelectronic Engineering*, Jg. 84, 5-8, S. 1113–1116, 2007, doi: 10.1016/j.mee.2007.01.091.
- [208] W. Oelßner *et al.*, „Encapsulation of ISFET sensor chips“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 105, Nr. 1, S. 104–117, 2005, doi: 10.1016/j.snb.2004.05.009.
- [209] F. Liu, A. N. Nordin, F. Li und I. Voiculescu, „A lab-on-chip cell-based biosensor for label-free sensing of water toxicants“, *Lab on a chip*, Jg. 14, Nr. 7, S. 1270–1280, 2014, doi: 10.1039/c3lc51085a.
- [210] F. Liu, F. Li, A. N. Nordin und I. Voiculescu, „A novel cell-based hybrid acoustic wave biosensor with impedimetric sensing capabilities“, *Sensors*, Jg. 13, Nr. 3, S. 3039–3055, 2013, doi: 10.3390/s130303039.
- [211] K. Kiilerich-Pedersen und N. Rozlosnik, „Cell-Based Biosensors: Electrical Sensing in Microfluidic Devices“, *Diagnostics*, Jg. 2, Nr. 4, S. 83–96, 2012, doi: 10.3390/diagnostics2040083.
- [212] Y. S. Zhang *et al.*, „Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 114, Nr. 12, E2293-E2302, 2017, doi: 10.1073/pnas.1612906114.
- [213] P. R. Unwin, A. J. Bard und M. Stratmann, Hg., *Instrumentation and electroanalytical chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

- [214] E. T. Hilliard, „Design of a Micro-scale pH sensor“. B.S. thesis, Swanson Sch. of Eng., Univ. of Pittsburgh, Pittsburgh, 2009.
- [215] H. Kaden, „Geschichte der pH-Glaselektrode und der pH-MesstechnikHistory of the pH glass electrode and the electrometric pH measurement“, *tm - Technisches Messen*, Jg. 77, Nr. 3, 2010, doi: 10.1524/teme.2010.0048.
- [216] Texas Instruments Inc., Hg., „INA116: Ultra Low Input Bias Current Instrumentation Amplifier“, 1995.
- [217] National Instruments, Hg., „Field Wiring and Noise Considerations for Analog Signals“, 21. Apr. 2016. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ni.com/whitepaper/3344/en/>.
- [218] B. E. Horton, S. Schweitzer, A. J. DeRouin und K. G. Ong, „A Varactor-Based, Inductively Coupled Wireless pH Sensor“, *IEEE Sensors J.*, Jg. 11, Nr. 4, S. 1061–1066, 2011, doi: 10.1109/JSEN.2010.2062503.
- [219] M. Roknsharifi, „A Low-Power, Highly Stabilized Three-Electrode Potentiostat Using Subthreshold Techniques“. Ph.D. dissertation, Electr. Eng., Univ. of Tennessee, Knoxville, 2012. [Online]. Verfügbar unter: http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/1557
- [220] D. Britz, „iR elimination in electrochemical cells“, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Jg. 88, Nr. 3, S. 309–352, 1978, doi: 10.1016/S0022-0728(78)80122-3.
- [221] C. Amatore, E. Maisonhaute und G. Simonneau, „Ohmic drop compensation in cyclic voltammetry at scan rates in the megavolt per second range: Access to nanometric diffusion layers via transient electrochemistry“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 486, Nr. 2, S. 141–155, 2000, doi: 10.1016/S0022-0728(00)00131-5.
- [222] D. O. Wipf, „Ohmic drop compensation in voltammetry: Iterative correction of the applied potential“, *Anal. Chem.*, Jg. 68, Nr. 11, S. 1871–1876, 1996, doi: 10.1021/ac951209b.
- [223] R. M. Souto, „Electronic configurations in potentiostats for the correction of ohmic losses“, *Electroanalysis*, Jg. 6, Nr. 7, S. 531–542, 1994, doi: 10.1002/elan.1140060702.
- [224] S. K. Arya, C. C. Wong, Y. J. Jeon, T. Bansal und M. K. Park, „Advances in complementary-metal-oxide-semiconductor-based integrated biosensor arrays“, *Chemical reviews*, Jg. 115, Nr. 11, S. 5116–5158, 2015, doi: 10.1021/cr500554n.
- [225] A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. New York, NY: Springer, 2014. [Online]. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-8933-7>
- [226] F. Asphahani und M. Zhang, „Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection“, *The Analyst*, Jg. 132, Nr. 9, S. 835–841, 2007, doi: 10.1039/b704513a.
- [227] Zurich Instruments AG, Hg., „Principles of lock-in detection and the state of the art“, Nov. 2016. [Online]. Verfügbar unter: https://www.zhinst.com/sites/default/files/li_primer/zi_whitepaper_principles_of_lock-in_detection.pdf. Zugriff am: 14. Mai 2017.
- [228] D. A. Brokholder, „Cell based biosensors using microelektrodes“. Ph.D. dissertation, Electr. Eng., Stanford University, Stanford, 1998.
- [229] A. Susloparova, D. Koppenhöfer, X. T. Vu, M. Weil und S. Ingebrandt, „Impedance spectroscopy with field-effect transistor arrays for the analysis of anti-cancer drug action on individual cells“, *Biosensors & bioelectronics*, Jg. 40, Nr. 1, S. 50–56, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.006.

- [230] U. Pliquet, M. Schönfeldt, A. Barthel, D. Frense, T. Nacke und D. Beckmann, „Front end with offset-free symmetrical current source optimized for time domain impedance spectroscopy“, *Physiol. Meas.*, Jg. 32, Nr. 7, S. 927–944, 2011, doi: 10.1088/0967-3334/32/7/S15.
- [231] W. Vonau, F. Gerlach und S. Herrmann, „Conception of a new technique in cell cultivation using a lab-on-chip aided miniaturised device with calibratable electrochemical sensors“, *Microchim Acta*, Jg. 171, 3-4, S. 451–456, 2010, doi: 10.1007/s00604-010-0427-9.
- [232] U. Guth, W. Vonau und J. Zosel, „Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review“, *Meas. Sci. Technol.*, Jg. 20, Nr. 4, S. 42002, 2009, doi: 10.1088/0957-0233/20/4/042002.
- [233] F. Gerlach, D. Seitz, S. Herrmann, H. Mayr und W. Vonau, „Konzeption für ein kompatibles Sensorarray-System mit Schnellankopplungsmechanismus für eine Online-Messung in der Zellkulturtechnik“, *Dresdner Beiträge zur Sensorik*, Nr. 29, S. 245–248, 2007.
- [234] J. A. Illingworth, „A common source of error in pH measurements“, *Biochem. J.*, Jg. 195, Nr. 1, S. 259–262, 1981, doi: 10.1042/bj1950259.
- [235] o.V., „Seven Months After Launching Extracellular Flux Analyzer, Seahorse Bioscience Exits 'Stealth Mode'“, o.O., 22. Sep. 2006. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.genomeweb.com/cbanews/seven-months-after-launching-extracellular-flux-analyzer-seahorse-bioscience-exi>. Zugriff am: 8. September 2016.
- [236] „Agilent Buying Seahorse Bio for \$235M“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.genomeweb.com/business-news/agilent-buying-seahorse-bio-235m>. Zugriff am: 29. Dezember 2019.
- [237] „Agilent Completes Acquisition of ACEA Biosciences“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.businesswire.com/news/home/20181114005957/en/Agilent-Completes-Acquisition-ACEA-Biosciences>. Zugriff am: 29. Dezember 2019.
- [238] „Agilent to Acquire ACEA Biosciences“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.genomeweb.com/business-news/agilent-acquire-acea-biosciences>. Zugriff am: 29. Dezember 2019.
- [239] K. Loza, C. Sengstock, S. Chernousova, M. Köller und M. Epple, „The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride“, *RSC Adv.*, Jg. 4, Nr. 67, S. 35290, 2014, doi: 10.1039/C4RA04764H.
- [240] M. Hefe, W. Wirths, M. Brischwein, H. Grothe, F. Kreupl und B. Wolf, „Measuring fluorescence-lifetime and bio-impedance sensors for cell based assays using a network analyzer integrated circuit“, *Biosensors & bioelectronics*, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.09.053.
- [241] H. W. Ott, *Electromagnetic Compatibility Engineering*. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2009. [Online]. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/9780470508510>
- [242] M. Hefe, „Entwicklung eines Pikoamperemeters“. BA, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2014.
- [243] M. Roos, „Hydrogele für implantierbare Sauerstoff-Sensoren“. MA, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2014.
- [244] A. Zubak, „Auslesesystem für die 24-fache elektrochemische Multiwellplatte“. BA, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2014.

- [245] R. Tutunaru, „Testkammer zur Einstellung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen“. BA, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, München, 2016.
- [246] A. Gencoglu und A. Minerick, „Chemical and morphological changes on platinum microelectrode surfaces in AC and DC fields with biological buffer solutions“, *Lab on a chip*, Jg. 9, Nr. 13, S. 1866–1873, 2009, doi: 10.1039/b820126a.
- [247] USB Implementers Forum Inc., „Universal Serial Bus Specification Revision 2.0“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.usb.org/document-library/usb-20-specification>. Zugriff am: 14. März 2021.
- [248] Eppendorf AG, *Technical Data Sheet: Eppendorf Deepwell Plate 96/1000 µL*. [Online]. Verfügbar unter: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/117218/Eppendorf_Consumables_Technical-data_Deepwell-Plate-96-1000_Deepwell-Plate-96-1000-uL.pdf?_ga=2.158621171.837743876.1587835499-354371747.1587835499 (Zugriff am: 25. April 2020).
- [249] J. Wegener, Hg., *Label-Free Monitoring of Cells in vitro*, 1. Aufl. Cham: Springer International Publishing, 2019. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.doi.org/10.1007/978-3-030-32433-9>
- [250] Y. Fang, „The development of label-free cellular assays for drug discovery“, *Expert opinion on drug discovery*, Jg. 6, Nr. 12, S. 1285–1298, 2011, doi: 10.1517/17460441.2012.642360.
- [251] J. W. Scannell, A. Blanckley, H. Boldon und B. Warrington, „Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency“, *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 11, Nr. 3, S. 191–200, 2012, doi: 10.1038/nrd3681.
- [252] J. Eder, R. Sedrani und C. Wiesmann, „The discovery of first-in-class drugs: Origins and evolution“, *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 13, Nr. 8, S. 577–587, 2014, doi: 10.1038/nrd4336.
- [253] D. C. Swinney und J. Anthony, „How were new medicines discovered?“, *Nat Rev Drug Discov*, Jg. 10, Nr. 7, S. 507–519, 2011, doi: 10.1038/nrd3480.
- [254] R. Halai und M. A. Cooper, „Using label-free screening technology to improve efficiency in drug discovery“, *Expert opinion on drug discovery*, Jg. 7, Nr. 2, S. 123–131, 2012, doi: 10.1517/17460441.2012.651121.
- [255] J. van der Valk *et al.*, „Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future“, *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, Jg. 35, Nr. 1, S. 99–118, 2018, doi: 10.14573/altex.1705101.
- [256] P. Réu *et al.*, „A 61% lighter cell culture dish to reduce plastic waste“, *PloS one*, Jg. 14, Nr. 4, e0216251, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0216251.
- [257] J. Park, M. Kim und S. Kim, „Surface renewable nano-iridium oxide polymeric composite pH electrodes“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 204, S. 197–202, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.07.104.
- [258] L. Manjakkal, K. Cvejic, J. Kulawik, K. Zaraska, D. Szwagierczak und G. Stojanovic, „Sensing mechanism of RuO₂–SnO₂ thick film pH sensors studied by potentiometric method and electrochemical impedance spectroscopy“, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Jg. 759, S. 82–90, 2015, doi: 10.1016/j.jelechem.2015.10.036.
- [259] L. Manjakkal, E. Djurdjic, K. Cvejic, J. Kulawik, K. Zaraska und D. Szwagierczak, „Electrochemical Impedance Spectroscopic Analysis of RuO₂ Based Thick Film pH Sensors“, *Electrochimica Acta*, Jg. 168, S. 246–255, 2015, doi: 10.1016/j.electacta.2015.04.048.

- [260] M. Simic, L. Manjakkal, K. Zaraska, G. M. Stojanovic und R. Dahiya, „TiO₂-Based Thick Film pH Sensor“, *IEEE Sensors J.*, Jg. 17, Nr. 2, S. 248–255, 2017, doi: 10.1109/JSEN.2016.2628765.
- [261] L. Manjakkal, K. Cvejic, J. Kulawik, K. Zaraska, D. Szwagierczak und R. P. Socha, „Fabrication of thick film sensitive RuO₂-TiO₂ and Ag/AgCl/KCl reference electrodes and their application for pH measurements“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Jg. 204, S. 57–67, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.07.067.
- [262] L. Manjakkal, K. Cvejic, J. Kulawik, K. Zaraska, R. P. Socha und D. Szwagierczak, „X-ray photoelectron spectroscopic and electrochemical impedance spectroscopic analysis of RuO₂-Ta₂O₅ thick film pH sensors“, *Analytica chimica acta*, Jg. 931, S. 47–56, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.05.012.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht der Interaktionen zwischen fünf verschiedenen zellulären Signalkaskaden, die in einem Zeitraum von zwei Jahren publiziert wurden. Nachgeruckt aus [2], Copyright (2001), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. Übersetzt von [3].	3
Abbildung 2: Schneeflocken bestehen alle aus demselben chemischen Element, dem Wasser und dennoch zeigen sie sehr unterschiedliche Formen [6].	5
Abbildung 3: Ähnlich wie ein technisches System besitzt eine Zelle Eingänge für diverse Signale und kann auch über Ausgänge mit der Umgebung wechselwirken. Die interne Struktur kann sehr komplex sein, muss jedoch nicht bekannt sein, um das Verhalten der systemischen Zelle zu beschreiben [10].	7
Abbildung 4: Die Aktivierung eines Membranrezeptors löst eine Signalkette aus. Die Energie für diesen Vorgang muss über metabolische Prozesse generiert werden. Die Produkte der metabolischen Prozesse können mit Sensoren detektiert werden; in diesem Fall handelt es sich um einen lichtadressierbaren pH-Sensor. Nachgedruckt aus [13], Copyright (1992), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.	9
Abbildung 5: Der typische Aufbau eines Biosensors besteht aus einer biologischen Komponente (Bioreceptor), einer elektrischen Schnittstelle (Electrical Interface) und der Messelektronik (Electronic System). Die Abbildung zeigt, dass es auf der Transducer-Seite verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von biologischer Komponente und elektronischer Schnittstelle gibt [27].	17
Abbildung 6: Eine Sauerstoffelektrode nach Clark kann mit einer Membran, die mit Mikroben besiedelt ist, zu einem Biosensor modifiziert werden. Eine Dialysemembran erlaubt es dem Analyten zu den Mikroben zu diffundieren, verhindert jedoch gleichzeitig das Ausspülen der mikrobiellen Zellen [35]. Nachgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Springer Nature, Chemische Sensoren von Peter Gründler, Copyright (2012).	20
Abbildung 7: Eine Zellkulturflasche ausgestattet mit einem Sensorelement für die Sauerstoffmessung. Hierzu wurde eine Öffnung in eine Standardflasche geschnitten und der Sensor mit biokompatiblen Kleber dicht eingeklebt [60].	26
Abbildung 8: a) Elektrodenstrukturen des Sauerstoffsensors auf einem Glassubstrat b) Sensorchip mit aufgeklebtem Kulturgefäß aus PDMS [61].	27
Abbildung 9: a) Zeigt die Messkammer des Cytosensors mit Mikroreaktionskammer (1), LAPS-Arbeits Elektrode (2), LED (3), Gegenelektrode (4), Anschlüsse für den Zu- und Ablauf des Nährmediums (5). b) Das Gesamtsystem für die Vermessung und Versorgung einer Zellkulturkammer besteht aus dem Vorratsgefäß für Nährmedium (6), einer Schlauchpumpe (7), einer Luftblasenfalle (8), einem Ventilsystem (9) für die Wirkstoffzugabe, der Messkammer (10 bzw. a), einer Referenzelektrode (11) im Mediumabfluss und der Messtechnik (12) [54].	29

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 10: a) Zeigt einen Querschnitt durch die Messkammer des Mikrophysiometers von Hu et al. Wie beim Cytosensor befinden sich hier die Gegenelektrode (CE) in der Messkammer und die Referenzelektrode (RE) im Abfluss des Mediums. b) Messkammer im zusammengebauten Zustand; c) Die eingesetzte Messtechnik ist wesentlich größer als die Messkammer [56].	30
Abbildung 11: Die offene Zellkulturkammer besteht aus einem Glaswafer mit Iridiumoxid beschichteten Mikroelektroden (4), einer Zellkulturkammer (2) mit einem Mikrozufluss (3) aus PDMS und einer Referenzelektrode (1). Eine Klemmvorrichtung (5) sorgt für die nötige Abdichtung zwischen Glas und PDMS [57].....	31
Abbildung 12: Ein koffergroßes ECIS-System mit Lebenserhaltungsvorrichtung für Zellkulturen kann autark in Feldversuchen zur Untersuchung von Trinkwasser auf Schadstoffe eingesetzt werden [87].	36
Abbildung 13: CMOS-basierter Sensorchip mit integrierten Elektroden und Messschaltung für ECIS-Messungen. Die aufgebrauchte Siliziumnitrid-Schicht ist biokompatibel und ermöglicht die Zelladhäsion. Die Elektroden wurden in einem zusätzlichen Backend-Prozess aufgebracht [91].	37
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Open-Gate-Feldeffekttransistors mit einer einzelnen Zelle. Das System kann mit resistiven und kapazitiven Elementen modelliert werden: Widerstand der Referenzelektrode R_{Re} , Widerstand der Messlösung R_{sol} , Widerstand der Zellmembran R_{FM}/R_{JM} , Widerstand des Zellplasmas R_{in} , Bypass-Widerstand des Mediums vorbei an der Zelle R_j , Kapazität der Zellmembran C_{FM}/C_{JM} , Kapazität des Gateoxids C_{ox} und Kapazität der Isolationsschicht C_{CL} [51].	38
Abbildung 15: Gegenüberstellung von zwei Systemen zur Messung der Pulsation von Kardiomyozyten: a) Beim ECIS-basierten System wird eine Impedanzmessung bei einer festen Frequenz an einer Goldelektrode durchgeführt. b) Beim LAPS-basierten System erzeugt die sinusförmig modulierte LED einen sinusförmigen Fotostrom, dessen Amplitude sich mit der Impedanz der Zellschicht über dem LAPS ändert [94].	40
Abbildung 16: System zur multiparametrischen Messung an Zellkulturen. Von links nach rechts: Computer und Programm zur Steuerung; Zellkulturkammer mit Sensorchip, Halte- und Kontaktvorrichtung; Mikroskop; Messtechnik [41].	42
Abbildung 17: Das Oncoprobe misst die Leerlaufspannung von drei Goldelektroden bezüglich einer gemeinsamen Silberchlorid-Elektrode. Das System unterstützt die simultane Messung in bis zu acht separaten Zellkulturkammern (Culture Wells) [104].	45
Abbildung 18: a) und b) Aufbau des von Weltin et. al entwickelten Sensorchips. Die Zellkulturkammer befindet sich in der Mitte und kann über eine Fluidik mit Kulturmedium versorgt werden. Die Sensoren befinden sich entweder in der Kulturkammer, im Ablauf- oder Zuflusskanal. c) Der Sensorchip wird von dem gezeigten Halter aufgenommen und mit Federkontakten elektrisch angeschlossen. Um die metabolische Aktivität der Zellen messen zu können, wird das Volumen der Zellkulturkammer mit einem Stopfen reduziert. d) Die mikroskopische Aufnahme zeigt vitale Zellen in der Kulturkammer und deutet auf ausreichende Biokompatibilität der verwendeten Materialien hin [66].	47

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Auf der linken Seite ist die Umschalte-Einheit mit Drehschaltern für die Sensorauswahl zu sehen. Die Sensorchips (rot eingekreist) werden direkt in dieses Gerät eingesetzt. Auf der rechten Seite sind der verwendete Potentiostat und ein Notebook zur Messdatenaufzeichnung abgebildet [64].	48
Abbildung 20: a) Über dem Sensorchip wird eine Mikrofluidik platziert. Die Elektroden wurden mit einem angelöteten Flachbandkabel kontaktiert (unten Mitte). b) Sensorchip und Fluidik wurden mit gefärbter Flüssigkeit befüllt und von unten fotografiert. Die thermoelektrischen Pumpen sind rot markiert [50].	49
Abbildung 21: Aufbau eines Sensorchips mit Gehäuse: Ein Sensorchip wird über Draht-Bonden mit der Trägerplatine verbunden. Das Chipgehäuse und die Vergussmasse schützen die Bond-Verbindungen vor Feuchtigkeit und bilden die Zellkulturkammer (angelehnt an [22]).	56
Abbildung 22: Weiterentwicklung des von Reßler [22] vorgestellten Sensorchips. Der gezeigte Chip wird üblicherweise auf Keramiksubstrat gefertigt und hat eine Kantenlänge von 7,65 x 7,65 mm (Forschungsgruppe Bernhard Wolf, LME).	57
Abbildung 23: Schematische Nachbildung einer der 24 Kavitäten der intelligenten Mikrotiterplatte (angelehnt an [69]). In der Hauptkavität (Mitte) werden Zellen angesiedelt, die das Medium ansäuern und Sauerstoff verbrauchen. Das Volumen der Hauptkavität wird mittels eines Verdrängungskörpers reduziert, um diesen Effekt zu verstärken. Über die Nebenkammern (rechts und links) kann das Nährmedium in der Hauptkammer ausgetauscht werden.	59
Abbildung 24: Die pH-Empfindlichkeit des Iridiumoxids variiert mit dem Oxidationszustand der Elektrode. Dies wird aus dem Zusammenhang zwischen dem Standardpotential bei Extrapolation auf pH 0 (blaue Kurve) und der pH-Empfindlichkeit (rote Kurve) deutlich. Besonders auffällig ist, dass die Empfindlichkeit in beiden Bereichen mit hoher Redox-Pufferkapazität jeweils ein lokales Maximum erreicht und dann wieder abfällt [166].	68
Abbildung 25: Bildliche Darstellung der Diffusion bei einer unendlich ausgedehnten Elektrode (a) und einer Mikroelektrode (b).	74
Abbildung 26: Typischer Aufbau eines miniaturisierten elektrochemischen Sensors. Auf einem Substratmaterial werden Sensorstrukturen (1) sowie entsprechende Zuleitungen aufgebracht. Eine dünne Isolationsschicht (2) verhindert, dass die Zuleitungen chemisch mit der Testlösung interagieren. Die Sensorik wird mittels geeigneter Verbindungstechnik, in diesem Beispiel Draht-Bonden (3), mit einem PCB (4) verbunden. Eine Vergussmasse (5) schützt diese Verbindung sowie die restliche Elektronik vor Kontakt mit der Messlösung.	82
Abbildung 27: Schaltbild einer Dreielektrodenanordnung mit der Gegenelektrode (GE), der Arbeitselektrode (AE) und der Referenzelektrode (RE).	87
Abbildung 28: Kategorisierung von Potentiostaten nach der Messmethode für den Zellstrom: a) resistive Messung basierend auf einem Transimpedanzverstärker; b) kapazitive Messung auf Basis eines Integrierers; c) kapazitive Messung mit zusätzlicher Entkopplung durch einen Stromspiegel; in Anlehnung an [219].	88

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: a) Potentiostaten mit einem differentiellen Eingang basieren auf der Spannungsfolgerschaltung; b) Potentiostaten mit additivem Eingang sind von der Addierer-Schaltung abgeleitet; in Anlehnung an [213, 220].	89
Abbildung 30: Eine einfache Potentiostatenschaltung lässt sich mit einem einzelnen Operationsverstärker aufbauen. Wendet man das Nullor-Modell des idealen OPV an, so wird deutlich, dass die Spannung zwischen Referenzelektrode (RE) und Arbeitselektrode (AE) der Eingangsspannung (E_{in}) gleicht. Die Spannung der Gegenelektrode (GE) kann jedoch beliebige Werte annehmen und wird durch den Strom der Arbeitselektrode und den Widerstand (R_c) definiert.	90
Abbildung 31: Einfaches Ersatzschaltbild einer Elektrode nach Randles: R_s beschreibt das annähernd rein resistive Verhalten des Elektrolyten, C_{dl} das kapazitive Verhalten der elektrochemischen Doppelschicht bei konstanter Elektrolytzusammensetzung an der Elektrode, R_{ct} beschreibt den (im allgemeinen nicht linearen) Ladungstransfer-widerstand des Reaktionsedukts an die Elektrode, Z_w (Warburg-Impedanz) modelliert an der Reaktion beteiligte Diffusionsprozesse und tritt als komplexwertige Impedanz mit konstantem Phasenwinkel in Erscheinung.	94
Abbildung 32: Simulierter Nyquist-Plot (oben) und Bode-Plot (unten) eines Randles-Circuit mit den Elementen $R_s = R_{ct} = 100 \Omega$, $C_{dl} = 100 \text{ nF}$, $A_w = 300 \Omega \cdot \text{s}^{-1/2}$. Die Simulation erfolgte mit der Software EC-Lab V11.16 (ZSim-Modul) der Firma Bio-Logic Science Instruments Ltd.	95
Abbildung 33: Ein Multikanal-Interface zur multiparametrischen Messung in sechs verschiedenen Probekammern [233].	102
Abbildung 34: Die gezeigte Schaltung ermöglicht eine potentiometrische Messung in Verbindung mit einer Potentiostatenschaltung. Im Gegensatz zur amperometrischen Messung wird ein Stromfluss durch die Arbeitselektrode mit dem Spannungsfolger OPV2 verhindert. OPV1 stellt sicher, dass das Potential der Referenzelektrode auf E_{in1} geregelt wird. Das gemessene Potential der Arbeitselektrode kann dadurch auf die Referenzelektrode bezogen werden.	110
Abbildung 35: Die gezeigte Potentiostatenschaltung basiert auf vier Operationsverstärkern und erlaubt neben zwei potentiometrischen Messungen simultan eine amperometrische Messung. OPV1 regelt hierbei die Spannung der Referenzelektrode auf ein definiertes Potential (E_{in1}). Die als Spannungsfolger geschalteten OPV2 und OPV3 dienen als Impedanzwandler und stellen sicher, dass unabhängig von der weiteren Signalkette kein Strom durch die Arbeitselektroden fließt. OPV4 ist als Transimpedanzverstärker beschaltet. Er regelt das Potential der angeschlossenen Arbeitselektrode auf E_{in2} und wandelt den Elektrodenstrom (I_{Amp}) in eine proportionale Spannung (E_{Amp}) um.	111
Abbildung 36: Die sinusförmige Polarisierung der Arbeitselektrode erfolgt bei dieser Schaltung über die Addition einer Sinusspannung am nichtinvertierenden Eingang des Transimpedanzverstärkers OPV2. Im Gegensatz zur üblichen Methode (Einprägen der Sinusspannung an OPV1) bleibt die Referenzelektrode gegenüber der Messschaltung auf einem konstanten Potential.	114

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 37: Die Explosionsdarstellung des Mikrophysiometers zeigt folgende Komponenten: 1. Mikrotiterplatte mit Zellkulturkammern und Durchflusssystem; 2. Sensoren auf einem Substrat; 3. Messelektronik mit Federkontakten; 4. Elektronikmodul für ECIS; 5. Spannvorrichtung zur Verbindung von Sensorik (2) und Messelektronik (3).	126
Abbildung 38: Die Messelektronik lässt sich schematisch in einen analogen, einen digitalen und einen Mixed-Signal-Teil untergliedern. Jeder Schaltungsteil besitzt eine eigene Spannungsversorgung sowie eigene Referenzspannungsquellen. Alle Elektroden der eMTP werden direkt an das analoge Front-End angebunden. Im Mixed-Signal-Teil werden die analogen Signale gemultiplext und in digitale Signale gewandelt. Das digitalisierte Signal wird von einem Mikrocontroller (MCU) empfangen, verrechnet und per USB-Schnittstelle an einen Computer übertragen.....	128
Abbildung 39: Das analoge Front-End der Messschaltung basiert auf der in Abbildung 35 gezeigten Potentiostatenschaltung. Die Kondensatoren C1 und C2 dienen der Kompensation des kapazitiven Charakters der elektrochemischen Messzelle und verhindern eine Instabilität der Operationsverstärkerschaltung	130
Abbildung 40: Das analoge Front-End für die ECIS-Messung basiert auf einem Transimpedanzverstärker (U_1), an dessen nichtinvertierendem Eingang eine sinusförmige Spannung eingeprägt wird. Die Kapazität C_1 verbessert die Stabilität der Schaltung bei hohen kapazitiven Lasten am invertierenden Eingang. Der restliche Schaltungsteil (U_2, C_2, R_2, R_3) dient dazu, die sinusförmige Anregungsspannung (E_{sin}) auf ein nicht zellschädigendes Niveau zu dämpfen und um einen Offset (E_{DC}) zu verschieben. Der Offset wird so gewählt, dass kein DC-Strom durch die ECIS-Elektrode fließt.	131
Abbildung 41: Die gezeigte Schaltung stellt ein Modell der eingesetzten elektrochemischen Messzellen dar. Das Modell basiert auf der Randles-Schaltung (vgl. Abschnitt 3.8.4.1), die durch das Weglassen der Warburg-Impedanz vereinfacht wurde. Die Schaltung ist sowohl zur Simulation der Sauerstoff- als auch der ECIS-Messschaltung geeignet, wenn die Bauteilparameter entsprechend Tabelle 4-3 angepasst werden. Die Verbindung zur jeweiligen Messschaltung erfolgt an den drei Anschlussstellen AE (Arbeitselektrode), GE (Gegenelektrode) und RE (Referenzelektrode).	133
Abbildung 42: Die zur Simulation der Sauerstoffmessung verwendete Schaltung wurde auf Basis der in Abbildung 39 gezeigten Messschaltung erstellt. Das Schaltungsmodell der elektrochemischen Messzelle (siehe Abbildung 42) wird an den entsprechenden drei Anschlussstellen AE, GE und RE mit der Schaltung verbunden. Die Bewertung der Stabilität der Schaltung erfolgt, indem eine Sprungfunktion durch den Generator VG1 erzeugt und die Sprungantwort an den Messstellen E_{GE} und E_{O2} gemessen wird.	134
Abbildung 43: Befindet sich keine Kapazität zur Frequenzkompensation im Rückkopplungspfad des Transimpedanzverstärkers U_4 (Abbildung 42), zeigt die Sprungantwort – gemessen an der Messstelle E_{O2} – eine gedämpfte Oszillation.	135

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 44: Der Graph zeigt eine Gegenüberstellung der Sprungantworten (Messstelle E_02) für unterschiedliche externe Kapazitäten zur Frequenzkompensation. Durch die geeignete Parametrisierung kann das Überschwingen auf einen akzeptablen Wert ($< 10\%$) reduziert werden. 135
- Abbildung 45: Das fertig bestückte Hauptmodul der Messelektronik besteht aus 24 analogen Front-Ends (Mitte), fünf AD-Wandlern (rechts und links), dem Digitalteil mit Mikrocontroller (rechts unten) sowie vier Spannungsreglern (unten Mitte) zur Spannungsversorgung der Module. Das Impedanzmodul kann mittels einer Stiftleiste aufgelötet werden. Der Multiplexer für die ECIS-Elektroden ist auf dem Hauptmodul integriert (links unten neben den Spannungsreglern). 138
- Abbildung 46: Die Software-Architektur veranschaulicht, wie die digitalisierten Messdaten durch die Firmware ausgelesen und über eine virtuelle serielle Schnittstelle an das Programm QtiPlot übertragen werden. Durch die Verwendung des serienmäßig integrierten Bootloaders des Mikrocontrollers kann die Firmware direkt über die USB-Schnittstelle aktualisiert werden. 139
- Abbildung 47: Nach dem Zuschnitt des Wafers verbleiben jeweils drei Sensorarrays auf demselben Glassubstrat. Die Platinstrukturen sind deutlich zu erkennen, der darüber liegende SU-8 3000 Lack ist aufgrund seiner Transparenz nicht sichtbar. 140
- Abbildung 48: Im gezeigten Bildausschnitt sind drei der vierundzwanzig Sensorarrays desselben Foliensubstrates zu sehen. Die goldenen Flächen sind freiliegende Goldstrukturen. Goldgrüne Flächen sind dort zu erkennen, wo das Gold von Lötstopplack überdeckt wurde. Der Rest des ursprünglich weißen Substrates liegt ebenfalls unter dem Lötstopplack und ist dadurch hellgrün. 142
- Abbildung 49: Das Layout der Sensoren auf Glassubstrat besteht aus vier verschiedenen Elektrodenarten: 1. Eine kleine Elektrode außerhalb der Zellkulturkammer; 2. Zwei ineinandergreifende Fingerelektroden (IDES); 3. Drei Mikroelektrodenarrays; 4. Zwei großflächige Elektroden; schwarz umrandete Flächen stellen die Platinstrukturen dar. Rot umrandete Flächen stehen für SU-8 3000-bedeckte Bereiche. Der blaue Kreis verläuft an der Stelle, an der das Innere der Zellkulturkammer endet und entspricht der Kontur der Verklebung zwischen Substrat und Kunststoffoberteil der Mikrotiterplatte. 143
- Abbildung 50: Die Darstellung des Sensorlayouts auf dem Foliensubstrat zeigt drei unterschiedliche Elektrodenarten: 1. Drei großflächige Elektroden; 2. Zwei ineinandergreifende Fingerelektroden (IDES); 3. Zwei Mikroelektrodenarrays; Die aufgedampften Goldstrukturen sind rot dargestellt. Die blauen Flächen stellen die in PCB-Technologie gefertigten Zuleitungen auf der Rückseite der Folie dar. Das Innere der grünen Umrandungen kennzeichnet die Bereiche, in denen der Lötstopplack ausgespart wurde. Der schwarze Kreis markiert den Rand der Zellkulturkammer. ... 144
- Abbildung 51: Auf der linken Seite ist das Layout des Sauerstoffsensors auf dem Glassubstrat abgebildet. Die rechte Seite zeigt das Layout, das auf dem Foliensubstrat verwendet wurde. Die Konturen der Edelmetallschicht sind schwarz dargestellt. Die Isolationsschicht ist rot gezeichnet. Beim Glassubstrat ist die Isolation nur in unmittelbarer Nähe der Elektroden, beim Foliensubstrat vollflächig aufgebracht. Das Messmedium tritt lediglich an den kreisförmigen Aussparungen der Isolationsschicht mit der Edelmetallelektrode in Kontakt. 145

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 52: Zur simultanen Abscheidung von Iridiumoxid auf verschiedenen Elektroden in unterschiedlichen Zellkulturkammern wurden jeweils die Gegen- (rot) sowie Arbeitselektroden (gelb) kurzgeschlossen und mit dem Potentiostaten verbunden. Eine einzige Referenzelektrode wurde mit dem entsprechenden Anschluss des Potentiostaten verbunden und in eine beliebige Zellkulturkammer eingeführt..... 149
- Abbildung 53: Für die simultane Abscheidung des Iridiumoxids wurden die ausgewählten Elektroden der eMTP mittels einer speziellen Vorrichtung elektrisch kontaktiert. Die Vorrichtung wurde auf einem Rüttler montiert, um die Konvektion während der Abscheidung zu verbessern. 150
- Abbildung 54: Sowohl die Goldelektrode (links) als auch die Platinelektrode (rechts) zeigen nach der Beschichtung mit Iridiumoxid eine deutliche blaue Färbung. Bei den Mikroelektroden mit 20 µm Durchmesser (rechtes Bild) kam es aufgrund winziger Luftblasen häufig zur Abschirmung einzelner Elektroden und dadurch zu einer unvollständigen Beschichtung. 151
- Abbildung 55: Das Layout des ECIS-Sensors besteht aus zwei fingerförmig ineinandergreifenden Elektroden (schwarze Linien). Die Zuleitungen zu den Fingern wurden mit der jeweils verwendeten Isolationsschicht bedeckt (rote Linien). Die Einheit aller Bemaßungen ist Millimeter..... 153
- Abbildung 56: Die Sensoren auf dem Foliensubstrat (b) wurden durch Aufdampfen auf einer flexiblen Leiterplatte hergestellt. Die Zuleitungen und Kontaktpads konnten so direkt auf dieser Leiterplatte integriert werden (a). Die Sensoren auf dem Glassubstrat wurden in eine starre Leiterplatte eingelegt, um die Kontaktierung zu ermöglichen (d), auf der neben Zuleitungen und Kontaktpads auch eine Heizstruktur integriert wurde (c)..... 155
- Abbildung 57: Der elektrische Kontakt zwischen der Metallisierung auf dem Glassubstrat und den Zuleitungen auf der Leiterplatte wurde mit leitfähigem Epoxid-Kleber hergestellt..... 156
- Abbildung 58: Der Kleber wurde in die dafür vorgesehene Nut gegeben, indem die Dosierspitze unter konstanter Abgabe von Klebstoff der roten Linie folgte. Zur Vermeidung von Fehlstellen beginnt und endet die Fahrt in der Ausbuchtung, die mit einem roten Punkt markiert wurde..... 157
- Abbildung 59: Die Nahaufnahme zeigt die Federkontakte, die sich auf der Rückseite des Hauptmoduls der Messelektronik (vgl. Abbildung 45) befinden. Sie sind für die elektrische Verbindung zu den Kontaktpads der eMTP verantwortlich. Die Bohrung in der Mitte des Bildes dient der Aufnahme eines Führungsbolzens, auf dem die Anpressfedern gelagert werden. Das Hauptmodul wird mit sechs Anpressfedern gegen die eMTP gedrückt, um die nötige Anpresskraft zwischen Kontaktfeder und Pad sicherzustellen. 159
- Abbildung 60: Die sechs Stützpunkte des Hauptmoduls liegen im Kraftschwerpunkt der ihnen zugeordneten Federkontakte, um die Durchbiegung des Moduls beim Anpressen an die eMTP zu verhindern. An jedem dieser Stützpunkte drückt eine Feder gegen das Hauptmodul und gleicht damit die Kräfte der Federkontakte aus..... 160

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 61: Die erste Vorrichtung zur Kontaktierung (a) basiert auf Haken, die in das Kunststoffteil der eMTP geklebt werden können (d). Diese Haken rasten in eine integrierte Druckverriegelung (c) ein und können über erneuten Druck wieder gelöst werden. Im eingerasteten Zustand sinken die auf der Platine befestigten Bolzen (b) in die dafür vorgesehenen Führungen ein und die Federn werden gespannt. Dadurch werden die Kontaktfedern auf der Rückseite des Hauptmoduls an die Kontaktpads der eMTP gepresst..... 161
- Abbildung 62: In der überarbeiteten Version der Kontaktiervorrichtung drücken Kugelspannschrauben (1) die Bolzen (2) gegen das Hauptmodul (3) der Messelektronik. Hierdurch wird der für den elektrischen Kontakt nötige Anpressdruck für die Federkontakte aufgebracht. Die eMTP (4) wird mit einem Schnellspanverschluss (5) eingespannt und anschließend fixiert..... 162
- Abbildung 63: Das komplett aufgebaute Messsystem besteht aus der Vorrichtung zur Kontaktierung (1), die mit Gewindestiften (2) parallel zum Pipettierkopf des Roboters ausgerichtet werden kann. Auf der Vorrichtung (1) sind zwei Schnellspanverschlüsse (3) befestigt, mit denen die eMTP (4) nach unten gedrückt und eingespannt wird. Das Hauptmodul (5) der Messelektronik wird mit Kugelspannschrauben an die eMTP (4) gepresst. Das Impedanzmodul (6) ist über Stiftleisten mit dem Hauptmodul (5) verlötet. Die Stromversorgung erfolgt über einen Board-to-Board-Stecker (7). Für die Datenübertragung wird ein Standard USB-Kabel mit Mini-USB-Stecker (8) verwendet..... 163
- Abbildung 64: (a) Zur Untersuchung der Isolationsschicht wird die Metallisierung (grau) auf dem Substrat (blau) komplett mit der Isolationsschicht (grün) überdeckt. Eine Kammer aus Polyurethan (rot) befindet sich auf dem Substrat und wird mit PBS (hellblau) gefüllt. Zwischen der Metallisierung und der Gegenelektrode (grauer Zylinder) wird eine Spannung von 2,5 V angelegt. Der resultierende Stromfluss wird von einem Picoamperemeter gemessen. (b) Der reale Messaufbau zur Untersuchung der Isolationsschicht besteht aus der Spannungsquelle (links), dem Picoamperemeter (rechts) und einem digitalen USB-Mikroskop (Mitte) zur optischen Kontrolle der Probe..... 164
- Abbildung 65: (a) Die schematische Darstellung des Testaufbaus für die Sauerstoffmessung zeigt, wie der Sauerstoffgehalt innerhalb der Messkammer mit einem Arduino gesteuert wird. Hierzu werden die Sensoren in der Messkammer ausgelesen und abhängig von diesen Messwerten die Schaltzeiten von zwei Ventilen bestimmt, die wahlweise Sauerstoff oder Stickstoff in die Messkammer leiten. Ventilatoren in der Messkammer sorgen für eine gute Durchmischung der eingeleiteten Gase. (b) Der reale Messaufbau besteht aus der Messkammer und einem Notebook, das die Messungen an der eMTP steuert. Ein weiteres Notebook wurde mit dem Arduino verbunden, um den Sauerstoffgehalt in der Messkammer kontinuierlich aufzuzeichnen. (c) Die Detailansicht der Sensoren, die in der Messkammer verbaut wurden, zeigt den Temperatur- und Luftfeuchtesensor (oben) und den Sauerstoffsensor (unten). Rechts und links sind jeweils Ventilatoren befestigt. (d) Im inneren der Messkammer befinden sich das Messsystem und die eMTP. Die Gase werden durch eine Waschflasche geleitet und so befeuchtet..... 166

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 66: Das Messsystem wurde so konstruiert, dass es mit dem eMTP in einen Pipettierroboter integriert werden kann. Um eine Kompatibilität zu den 24-fach-Platten zu erreichen wurden nur vier der acht Kanäle des Roboters mit Pipettenspitzen bestückt.	169
Abbildung 67: Die Höhe des gemessenen Leckstroms korreliert mit der Fläche der Metallisierung. Bedingt durch die Verdunstung des Elektrolyten erreicht der Messstrom nach etwa 30 Stunden seinen Höchstwert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Verdunstung durch Zugabe von destilliertem Wasser kompensiert.....	177
Abbildung 68: In den ersten zehn Stunden steigt der gemessene Strom durch die Isolierung schneller an als in den darauffolgenden 15 Stunden. Dieser Effekt ist bei den breiteren Strukturen ausgeprägter als bei den schmalen. Der Leckstrom nimmt mit der Fläche der Metallisierung zu. Der Zusammenhang ist linear, wenn die kleinste Struktur (SU8_1) nicht berücksichtigt wird. ..	178
Abbildung 69: NPR-80 hat im Vergleich zu SU-8 3000 anfangs einen wesentlich geringeren Leckstrom. Im weiteren Verlauf der Messung kommt es zu einer zufällig einsetzenden Erhöhung des gemessenen Stroms. Der Leckstrom erhöht sich dabei mit einer konstanten Steigung, bis das Ende des Messbereichs des Picoamperemeters erreicht ist.....	179
Abbildung 70: Die abgebildeten Kurven stellen den Verlauf des Leckstroms der vermessenen Probe dar. Qualitativ zeigen die Kurven den gleichen Verlauf. Die Höhe des gemessenen Stromes unterscheidet sich zwischen den drei Proben jedoch wesentlich, obwohl die Geometrie der Metallisierungen die gleiche ist.	180
Abbildung 71: Bei der Messung des Sauerstoffgehalts mit Sensoren auf Glassubstrat ist eine hohe Streuung zwischen den 22 ausgewerteten Sensoren zu erkennen. Vor allem im Bereich niedriger Sauerstoffkonzentrationen weichen die Sensoren vom linearen Verhalten ab.....	182
Abbildung 72: Die Sauerstoffsensoren auf dem Foliensubstrat zeigen eine geringe Streuung und verhalten sich über den gesamten Messbereich linear.....	183
Abbildung 73: Bei der Analyse der Rohdaten der Sensoren auf Glassubstrat sind wiederkehrende Sprünge in den Stromverläufen zu beobachten. Die Sprünge entsprechen im Mittel einem Dreizehntel des Sensorstromes.....	184
Abbildung 74: Die Strommessung der Sauerstoffsensoren auf Foliensubstrat zeigen bei steigendem Sauerstoffgehalt einen stufenartigen Anstieg des Stromes ohne erkennbare Ausreißer. Die mit Hydromed™ D4 beschichteten Elektroden (rot) liefern einen betragsmäßig kleineren Strom als die unbeschichteten Elektroden (schwarz).	185
Abbildung 75: Bei abnehmender Sauerstoffkonzentration fällt der Messstrom stufenartig ab. Die Instabilitäten nach circa 30 Minuten sind durch die Zugabe des destillierten Wassers zu erklären. Die mit Hydromed™ D4 beschichteten Sensoren (rot) zeigen – wie im Versuch mit steigender Sauerstoffkonzentration – niedrigere Ströme als die unbeschichteten Sensoren (schwarz).	186
Abbildung 76: Der Messstrom durch den Sauerstoffsensor unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob die Messelektrode mit Hydromed™ D4 bedeckt wurde (rot) oder nicht (schwarz). Die Standardabweichungen der beiden Gruppen verhalten sich ähnlich. Die Auswertung basiert auf den Rohdaten des zweiten Teilversuchs.	187

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 77: Der Graph zeigt den Vergleich zwischen dem ersten und dem zweiten Teilversuch für die unbeschichteten Sensoren. Im ersten Teilversuch (steigender Sauerstoffgehalt, blau) fließt bei gleichem Sauerstoffgehalt ein etwas geringerer Strom als beim zweiten Teilversuch (fallender Sauerstoffgehalt, schwarz).....	188
Abbildung 78: Auch die mit dem Hydrogel Hydromed™ D4 beschichteten Sensoren zeigen bei gleichem Sauerstoffgehalt einen Anstieg des Stroms vom ersten Teilversuch (steigender Sauerstoffgehalt, blau) zum zweiten (fallender Sauerstoffgehalt, schwarz).....	188
Abbildung 79: Die Rohdaten der pH-Messung zeigen, dass der Spannungsverlauf des Sensors mit dem pH-Wert des PBS-Puffers korreliert. Jeder Austausch des Messmediums durch den Pipettierroboter erzeugt einen Spannungssprung zwischen 1 und 2 mV.....	189
Abbildung 80: Für die bessere Gegenüberstellung des pH-sensitiven Verhaltens der untersuchten Messelektroden dient eine bereinigte Darstellung der Messdaten, aus der alle Artefakte entfernt wurden.....	190
Abbildung 81: Die Bestimmung der Sensitivität der pH-Sensoren zeigt ein positionsabhängiges Phänomen. Während die Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) eine sehr konstante Sensitivität zeigten, verringerte sich die Sensitivität der Sensoren in den Spalten 2, 4 und 6 mit jedem Durchlauf.	191
Abbildung 82: Während sich im ersten Durchlauf alle Sensoren ähnlich verhalten, verändern die Sensoren aus den Spalten 2, 4 und 6 (rot) ihre Sensitivität in den folgenden Durchläufen. Gleichzeitig nimmt die Standardabweichung der Sensitivität zu, während die Sensoren der Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) eine weitgehend konstante Sensitivität und Standardabweichung haben.	192
Abbildung 83: Die Sensitivität der Referenzsensoren in den Spalten 1, 3 und 5 (schwarz) ist über die vier Durchläufe konstanter als bei den Referenzsensoren aus den Spalten 2, 4 und 6 (rot). Bei den Referenzsensoren sind, unabhängig von der Position des Sensors, stärkere Standardabweichungen zu beobachten.....	192
Abbildung 84: Elektrochemisch abgeschiedenes Silber mit anschließender Chlorierung wirkt sich negativ auf die Zellen in der Nähe der Elektrode aus (linkes Bild). Zellen, die sich näher als 1 mm an der Elektrode befinden, sind bereits abgestorben. Die restlichen Zellen auf dem Bild sind ebenfalls auffällig. Wird eine derartig hergestellte Silberchlorid-Elektrode mit pHEMA bedeckt, reduziert sich der toxische Effekt auf die Zellen deutlich (rechtes Bild). Der gesamte Bereich, in dem pHEMA aufgebracht ist, wird nicht von Zellen bewachsen.....	193
Abbildung 85: Die zytotoxische Wirkung der aufgetragenen silberchloridhaltigen Paste ist auf einen Abstand von etwa 0,5 mm zur Kante der Paste beschränkt (linkes Bild). Wird die Paste zusätzlich mit pHEMA bedeckt, sind die Zellen bis zum Rand der pHEMA-Schicht morphologisch unauffällig.	194
Abbildung 86: Durch das Absaugen kommt es beim Wechsel der Leitfähigkeitslösung zu hohen Schwankungen des gemessenen Widerstandes. Die eigentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Messlösungen gehen dadurch in der Darstellung der Rohdaten unter.....	195

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 87: Für eine bessere Darstellung der Messdaten wurden die Artefakte, die im Zusammenhang mit dem Medienwechsel stehen, aus den Messdaten entfernt. Im neuen Graphen ist deutlich zu erkennen, dass der am Sensor gemessene Widerstand mit der Erhöhung der Leitfähigkeit sinkt.....	195
Abbildung 88: Ein Teil der Sensoren zeigte zu Beginn der Messung eine verstärkte Drift. Um dies darzustellen, wurden die gemessenen Widerstände für dieselbe Leitfähigkeitslösung LF1 an zwei verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt. Sensoren, die um mehr als 10 Ω gedriftet sind, wurden rot eingefärbt. Es fällt auf, dass es sich dabei ausschließlich um Sensoren aus den Spalten 1, 2 und 3, also der linken Seite der eMTP, handelt.	196
Abbildung 89: Für die Bestimmung der Sensitivität wird die am Sensor gemessene Impedanz gegen den berechneten spezifischen Widerstand der jeweiligen Leitfähigkeitslösung aufgetragen. Dazu werden die Messpunkte verwendet, die in der zweiten Hälfte des Versuchs (LF4 – LF3 – LF2 – LF1) aufgenommen wurden.....	197
Abbildung 90: Mittelwert und Standardabweichung der an den Sensoren gemessenen Impedanzen werden gegen den berechneten spezifischen Widerstand aufgetragen. Es werden die Messwerte der zweiten Hälfte des Versuchs verwendet. Die Darstellung zeigt, dass sich die Sensoren erwartungsgemäß linear verhalten und es eine von der Messlösung unabhängige Offsetverschiebung gibt.	198
Abbildung 91: Die Zellkonstante und der Elektrodenwiderstand werden für jeden einzelnen Sensor aufgetragen. Hierfür werden die in Tabelle 6-5 gegebene Steigung als Zellkonstante und der Achsenabschnitt als Elektrodenwiderstand interpretiert.....	200
Abbildung 92: Aus dem Verlauf des Messstroms durch den Sauerstoffsensoren ist zu erkennen, wie dieser periodisch an- und abgeschaltet wird. Eine Beeinflussung der Messspannung am pH-Sensoren ist zu den Umschaltzeitpunkten zu erkennen, in denen der Stromfluss besonders hoch ist. Der Signalpegel der Interferenz ist mit 40 μV sehr gering. Bei der gezeigten Messung wurden Sensoren auf Glassubstrat verwendet.	202
Abbildung 93: Die Messung zeigt die Beeinflussung des pH-Sensors durch die Sauerstoffmessung bei Sensoren auf Foliensubstrat. Die Interferenz ist mit einem Signalpegel von 20 μV sehr gering und tritt nur während der Schaltvorgänge auf.	203
Abbildung 94: Die Abbildung zeigt eine Langzeitmessung eines pH- und Sauerstoffsensors auf Foliensubstrat. Das verwendete Medium war PBS. Der Sauerstoffgehalt wurde während der Messung variiert, was sich im Verlauf des Messstroms durch den Sauerstoffsensoren (schwarze Kurve, linke Skala) widerspiegelt. Der pH-Sensoren (rote Kurve, rechte Skala) ist über die gesamte Dauer des Versuchs sehr stabil und schwankt um weniger als 1,3 mV.....	203
Abbildung 95: Es ist zu erkennen, dass nach der Aktivierung der Sauerstoffmessung (schwarze Kurve, linke Skala) der Messwert des Impedanzsensors (rote Kurve, rechte Skala) auf höhere Widerstandswerte steigt. Der Effekt beläuft sich auf ungefähr 0,4 Ω und ist somit gering, aber dennoch messbar.	204

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 96: Während die Impedanzmessung periodisch ein- und ausgeschaltet wurde, zeigten sich weder der pH-Sensor (schwarze Kurve, linke Skala) noch der Sauerstoffsensor (blaue Kurve, rechte Skala) vom Schaltzyklus beeinflusst. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, da die bei der Messung verwendete Wechselspannung keinen polarisierenden Einfluss auf das Elektrodensystem hat und auch kein DC-Strom fließt, der zu einem iR-Fehler führen könnte. 205
- Abbildung 97: Die mit Iridiumoxid beschichteten Sensoren (schwarz) zeigen das typische Sägezahnmuster. Der zelluläre Metabolismus führt zum Absinken des pH-Wertes. Während des Austauschs des Mediums steigt der pH-Wert wieder an. Die von oben betrachtet ersten fünf Sensoren ohne Iridiumoxid (rot) zeigen ebenfalls das Sägezahnmuster, was auf eine unbeabsichtigte Abscheidung von Iridiumoxid auf diesen Sensoren hindeutet. 206
- Abbildung 98: Auf alle abgebildeten Sensoren wurde Iridiumoxid abgeschieden. Sensoren, die nachträglich mit Hydromed™ D4 bedeckt wurden (schwarz), haben im Vergleich zu unbeschichteten Sensoren (rot) einen tendenziell gedämpften Spannungsverlauf mit geringerer Amplitude. 207
- Abbildung 99: Durch eine nachträgliche Beschichtung der Iridiumoxidelektrode mit Hydromed™ D4, reagiert der Referenzsensor (rot) langsamer als der pH-Sensor auf Änderungen des pH-Wertes. Wie ein Tiefpass-gefiltertes Signal folgt die rote Kurve dem Trend bzw. der Drift der schwarzen Kurve. 209
- Abbildung 100: In der dritten Phase des Versuchs wird die Frequenz des Mediumwechsels verdoppelt. Dadurch reduzieren sich die Amplituden von pH- und Referenzsensor. Der Trend des pH-Sensors weicht vom Verhalten des Referenzsensors ab. Die genauen Ursachen dafür konnten nicht geklärt werden. 209
- Abbildung 101: Zu Beginn der Phase 4 wird der Pipettierroboter nach einer Pause von etwa sieben Minuten reaktiviert. Durch das frische Zellkulturmedium kommt es zum Anstieg des pH-Wertes in der Messkammer. Der pH-Sensor reagiert mit einem Spannungsabfall von 22 mV (entspricht einer pH-Änderung von ca. 0,3 pH). Die Spannung des mit Hydrogel bedeckten Referenzsensors ändert sich hingegen um weniger als 2 mV (entspricht ca. 0,029 pH)..... 210
- Abbildung 102: Durch die Zugabe von Triton™ X-100 in Phase 5 kommt es zum Auflösen der Zellmembranen sowie zu einem Abfall des pH-Wertes (Spannungsanstieg). Dies ist im Verlauf des pH-Sensors (schwarz) deutlich zu sehen. Auch der Referenzsensor (rot) folgt der schwarzen Kurve mit seinem charakteristisch gedämpften Verhalten. Nachdem sich der pH-Sensor stabilisiert hat, ist das für die zelluläre Ansäuerung charakteristische Sägezahnsignal nicht mehr zu erkennen und beide Messkurven haben einen sehr ähnlichen Verlauf..... 211
- Abbildung 103: Die extrazelluläre Ansäuerungsrate wurde durch lineare Regression der Messkurve des pH-Sensors berechnet. Durch die hohe Signalqualität der pH-Sensoren sind die berechneten Ansäuerungsraten kaum verrauscht. 212
- Abbildung 104: Die Auswertung der Ansäuerungsrate in Phase 5 zeigt, dass die Auflösung der Zellen durch Zugabe von Triton™ X-100 zum Abfall der Ansäuerungsrate führt. 213

Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 105: Die Gegenüberstellung der Mittelwerte der Ansäuerungsraten aus Phase 2 und Phase 5 zeigt, dass die Ansäuerungsraten der Phase 5 vor Zugabe von Triton™ X-100 in einem ähnlichen Bereich wie in Phase 2 liegen. Nachdem die Zellen aufgelöst wurden, fällt die Ansäuerungsrate erwartungsgemäß deutlich unter diese Werte..... 213
- Abbildung 106: Im oberen Bild wird der Messstrom des Sauerstoffsensors in Phase 2 abgebildet. Der untere Graph zeigt den Messstrom in Phase 3. Durch den zeitlichen Versatz beim Mediumwechsel ergibt sich ein zeitlicher Versatz zwischen den einzelnen Kavitäten. Das Signal in Phase 3 hat eine geringere Amplitude und einen niedrigeren Offset als in Phase 2, dies ist durch die unterschiedliche Dauer zwischen den Pipettiervorgängen zu erklären. 215
- Abbildung 107: Nach Ausbleiben des Medienwechsels in den Zellkulturkammern 4 und 5 kommt es zu einer raschen Verknappung des Sauerstoffgehalts. Der Messstrom sinkt gegen null. Nachdem der Medienwechsel nach 30 Minuten wieder aufgenommen wurde, zeigt das Messsignal eine erhöhte Amplitude, die sich nach vier Zyklen normalisiert. 216
- Abbildung 108: Die Ableitung des Messstroms zeigt, dass der Sauerstoffgehalt in der Zellkulturkammer ab der dritten Minute nach Tausch des Mediums linear abfällt. Fällt der Sauerstoffgehalt in der Kammer weiter ab, endet das lineare Verhalten wieder. Hieraus wird deutlich, dass neben dem zellulären Einfluss auch die Störung der Diffusionsschicht durch den Pipettiervorgang berücksichtigt werden muss. 216
- Abbildung 109: Durch die Zugabe von Triton™ X-100 werden die Zellen in der Kulturkammer aufgelöst. Daraus resultiert eine deutliche Abnahme der Amplitude des Messsignals. Bedingt durch die Konvektion des Mediums beim Pipettiervorgang bleibt die Sägezahnform des Messsignals auch nach Lyse der Zellen bestehen. 217
- Abbildung 110: Die Steigung des Messstroms wird durch lineare Regression über die einzelnen Messperioden berechnet und für jede Zellkulturkammer aufgetragen. Mittelwert und Standardabweichung der Steigungen aller Kammern werden ebenfalls gezeigt. Die Zugabe von Triton™ X-100 bewirkt eine klar erkennbare Verringerung der Steigung. 218
- Abbildung 111: Das Messsignal der ECIS-Messung setzt sich aus einer niederfrequenten Änderung der gemessenen Impedanz sowie einem überlagerten periodischen Signal zusammen. Die Frequenz des periodischen Signals wird durch das Intervall des Mediumwechsels bestimmt. 219
- Abbildung 112: Der Mediumwechsel wurde in den Zellkulturkammern 4 und 5 innerhalb der ersten 30 Minuten ausgesetzt und danach normal fortgeführt. Das Messsignal zeigt beim Wiedereinsetzen der Nährstoffversorgung eine deutliche Änderung im Verlauf. Dies deutet auf Änderungen der Zellmorphologie oder der Struktur der Zellmembran in dieser Phase hin. 220

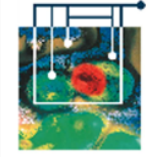
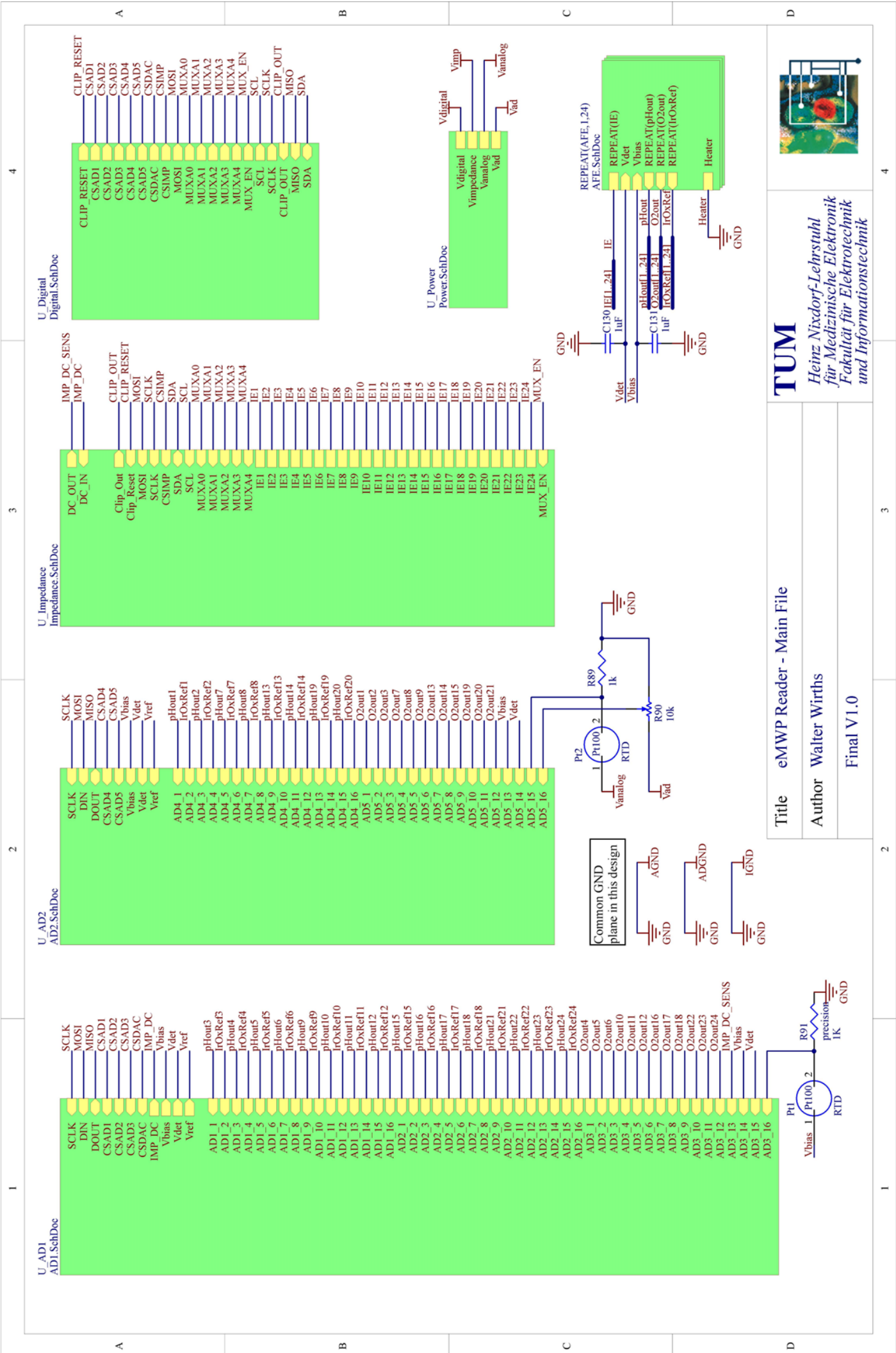
Kapitel 10: Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 113: In Phase 4 findet in der dargestellten Kavität (Nr. 4) in den ersten 30 Minuten kein Mediumwechsel statt. In dieser Zeit steigt die gemessene Spannung des pH-Sensors (schwarze Kurve, rechte Skala) um 10 mV an. Dies entspricht beim verwendeten pH-Sensor einem Abfall von ca. 0,14 pH. Der Betrag der Impedanz (grüne Kurve, linke Skala) steigt zu Beginn ebenfalls an und stagniert dann. Nachdem der Mediumwechsel wieder aufgenommen wurde, fällt die Spannung des pH-Sensors kontinuierlich ab. Nach drei Zyklen ist das typische Sägezahnmuster wieder zu erkennen. Der gemessene Widerstand fällt nach dem ersten Austausch des Zellkulturmediums kurz ab und steigt dann wieder über den Ursprungswert hinaus an..... 221
- Abbildung 114: Die Zugabe von Triton™ X-100 führt zur Lyse der Zellen und somit zum Abfall des Betrags der gemessenen Impedanz. Der Pipettiervorgang wurde nach Zugabe periodisch weitergeführt, dennoch verschwindet der periodische Anteil nach Zerstörung der Zellen aus dem Messsignal..... 222
- Abbildung 115: Nach dem Auflösen der Zellen durch Triton™ X-100 fällt der Betrag der Impedanz auf etwa 30 Ω ab und hält diesen Wert auf 0,3 Ω genau. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Impedanz- und Sauerstoffmessung ist nicht zu erkennen. 222
- Abbildung 116: Für einen direkten Vergleich zwischen μ LA (blaue Kurve, entnommen aus [17]) und eMTP (rote Kurve) wurden die Messdaten der eMTP offset bereinigt und mit dem Faktor acht multipliziert. Auch nach dieser Normierung liegt das Rauschen der eMTP weit unter dem des μ LA..... 241
- Abbildung 117: Direkter Vergleich der Messung der zellulären Ansäuerung mit den fotochemischen Sensoren des IMR (schwarz) und den elektrochemischen Sensoren der eMTP (rot). Es handelt sich um zwei unterschiedliche Versuche, die so ausgewählt wurden, dass sie annähernd die gleiche Amplitude der pH-Änderung zeigen. Die unterschiedlichen Zeitskalen bedeuten, dass das Medium im IMR-Versuch mit einer niedrigeren Frequenz getauscht wurde. 242

11 ANHÄNGE

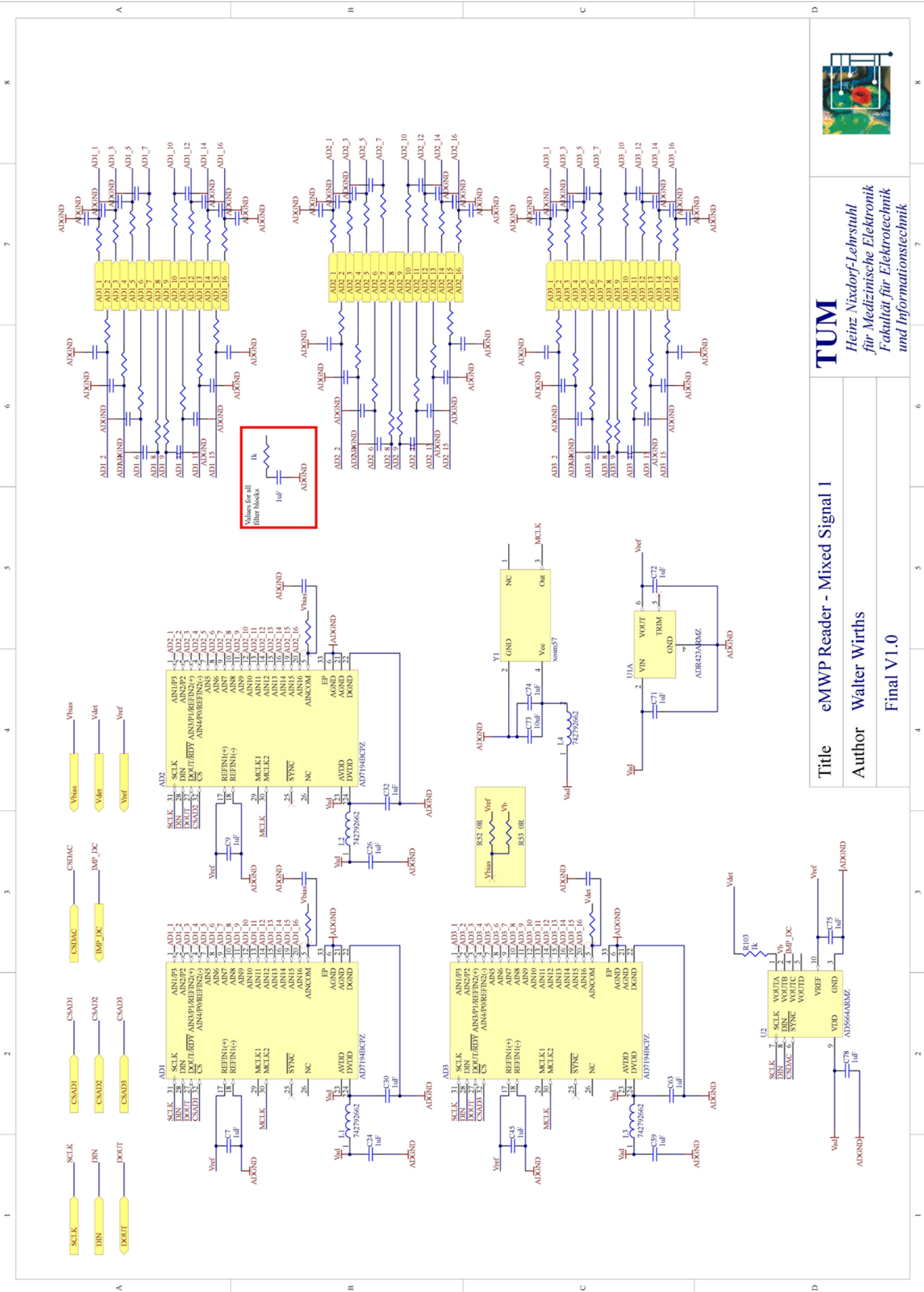
Anhang 1: Schaltpläne	288
Anhang 2: Zeichnung der Spannvorrichtung.....	298

ANHANG 1: SCHALTPLÄNE



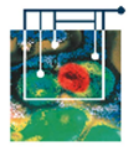
TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik

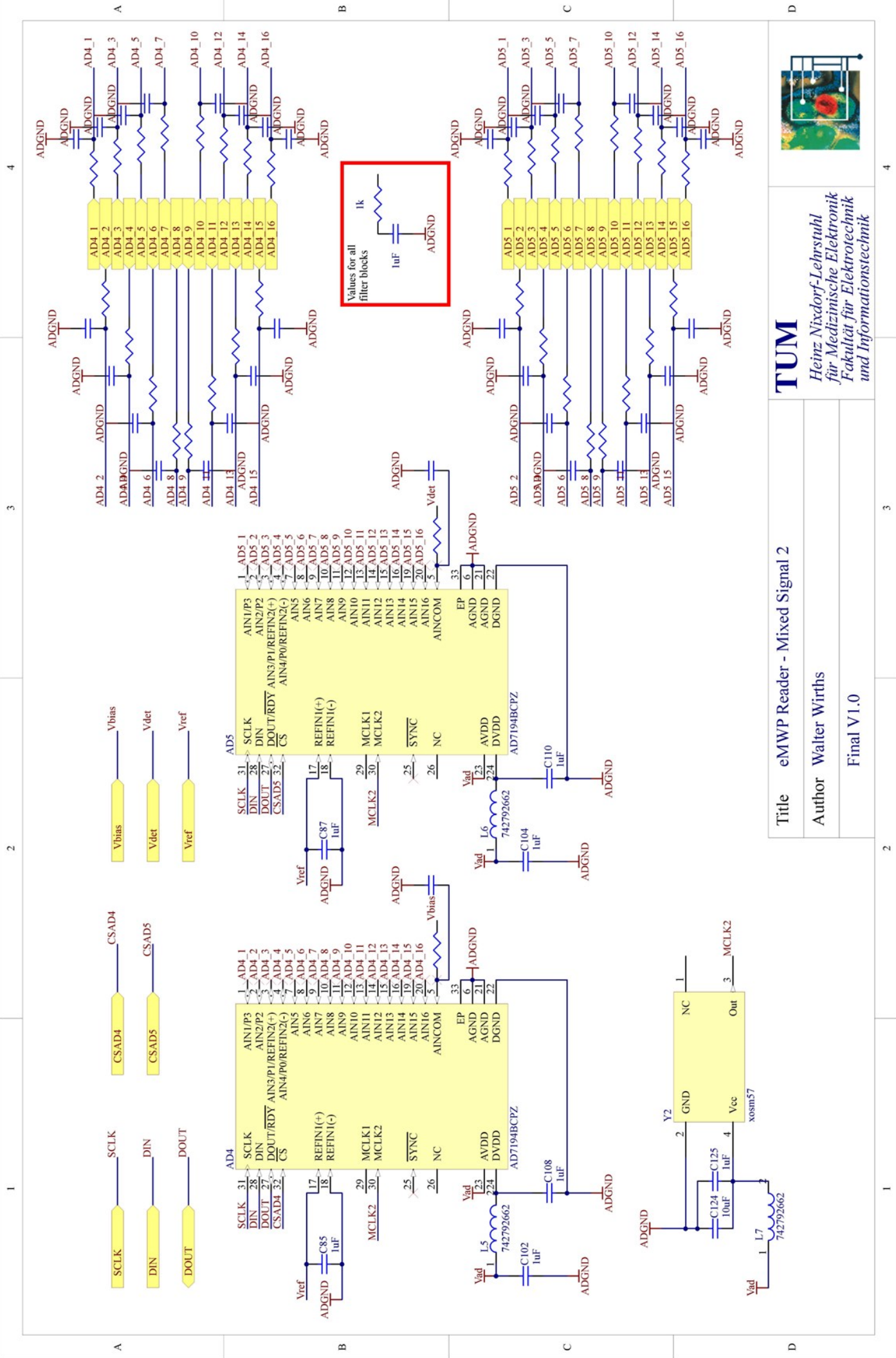
Title eMWP Reader - Main File
 Author Walter Wirths
 Final V1.0



Title eMWP Reader - Mixed Signal I
Author Walter Wirths
Final V1.0

TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 und Informationstechnik





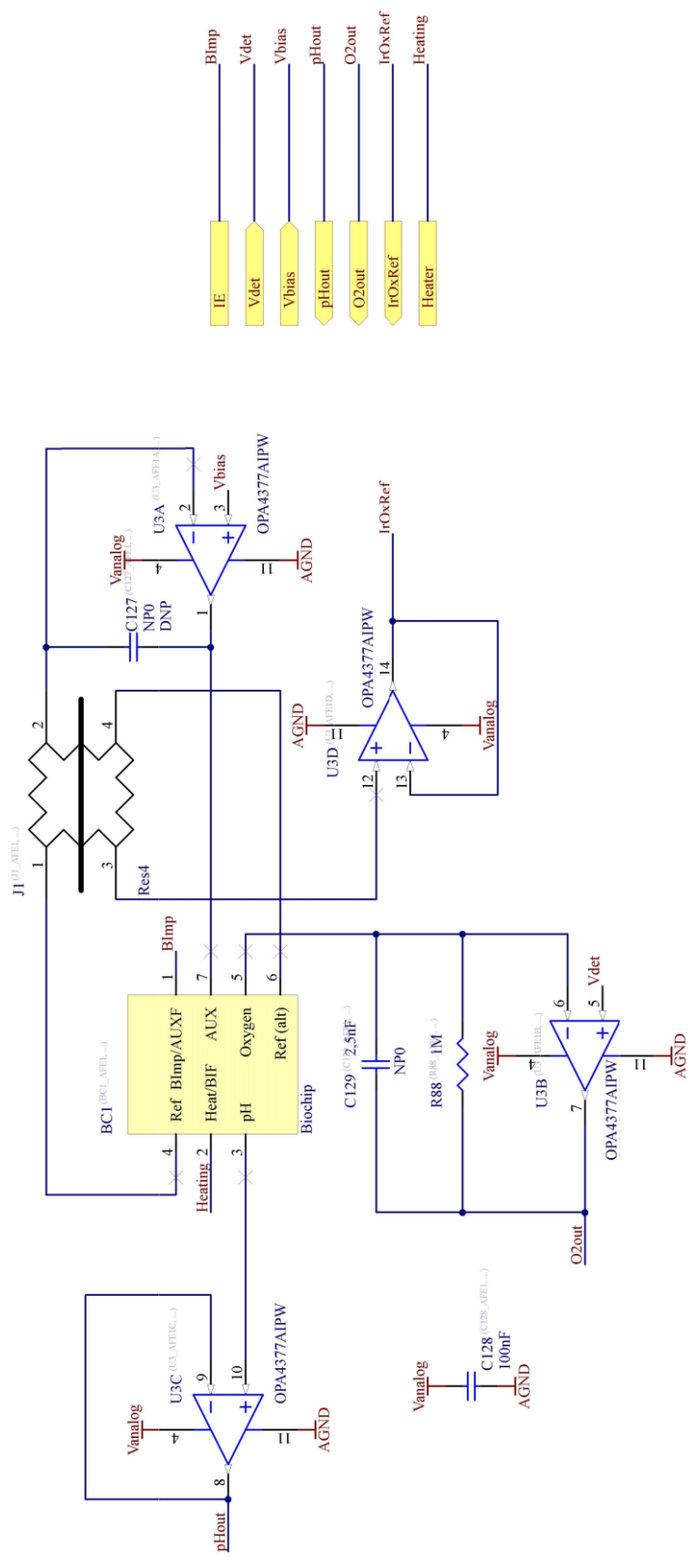
Title eMWP Reader - Mixed Signal 2
 Author Walter Wirths
 Final V1.0

TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik



A B C D

J1 connects either
 1 to 2 and 3 to 4 (standard config)
 or
 1 to 3 and 2 to 4 (IrOx Ref config)

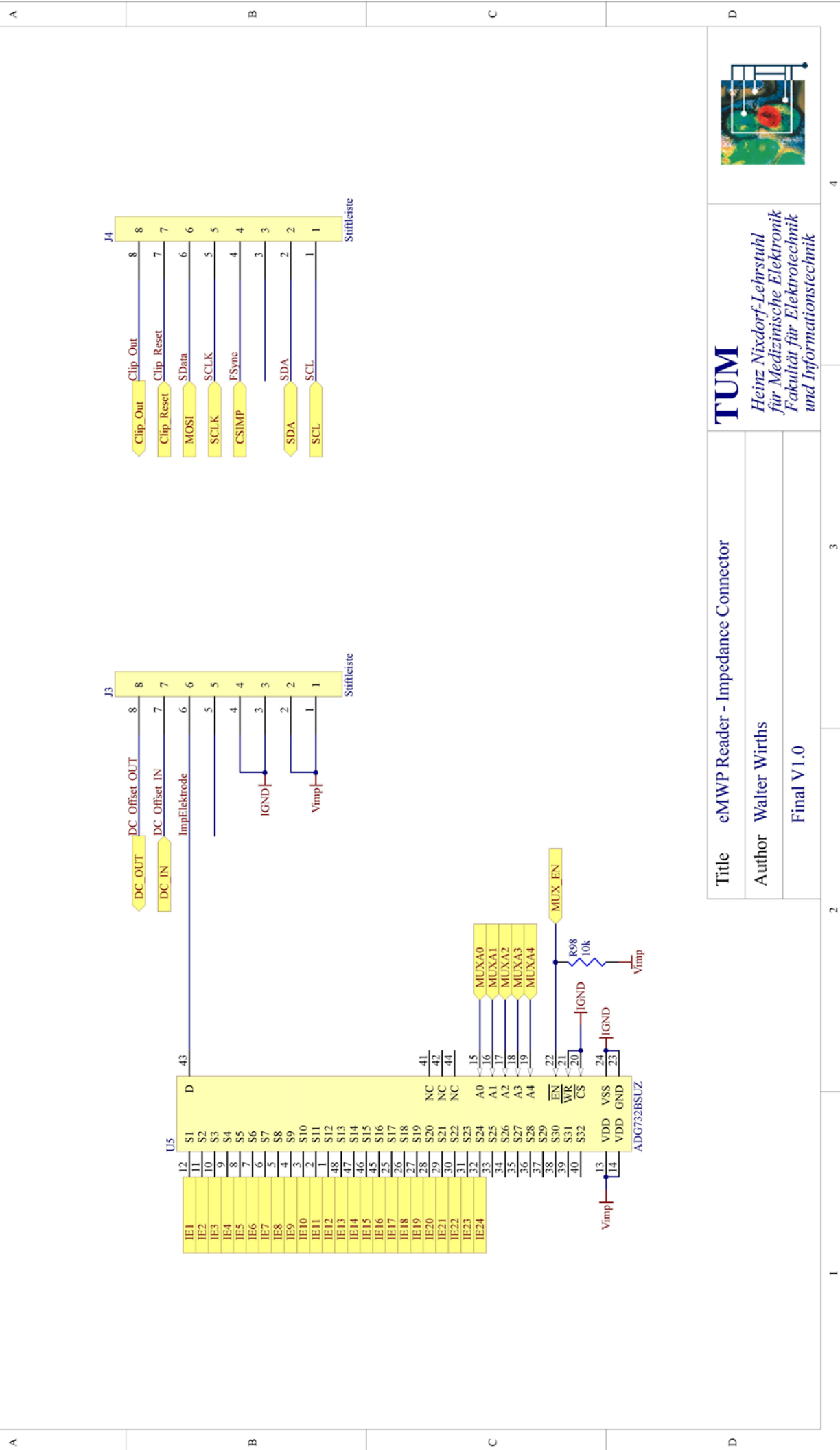


- IE
- Vdet
- Vbias
- pHout
- O2out
- IrOxRef
- Heater

Title	eMWP Reader - Analog Front End
Author	Walter Wirths
	Final V1.0

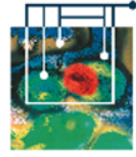
TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik

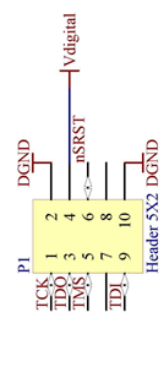
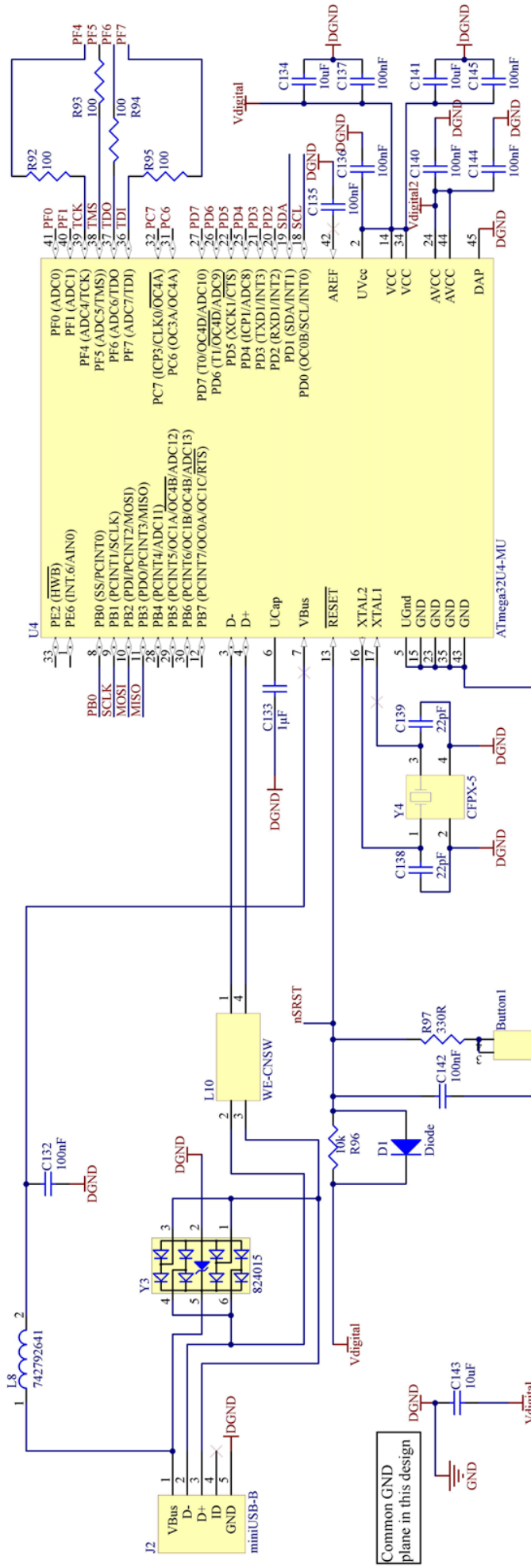
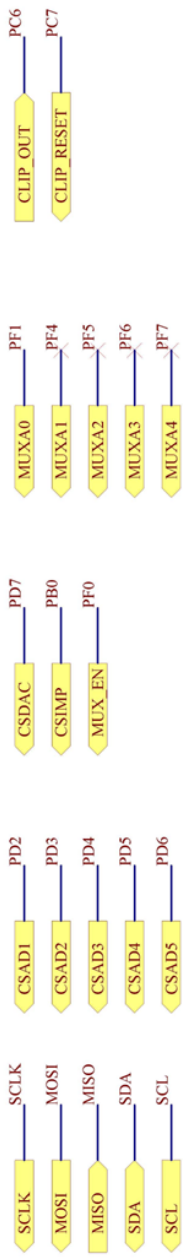




Title eMWP Reader - Impedance Connector
Author Walter Wirths
Final V1.0

TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik

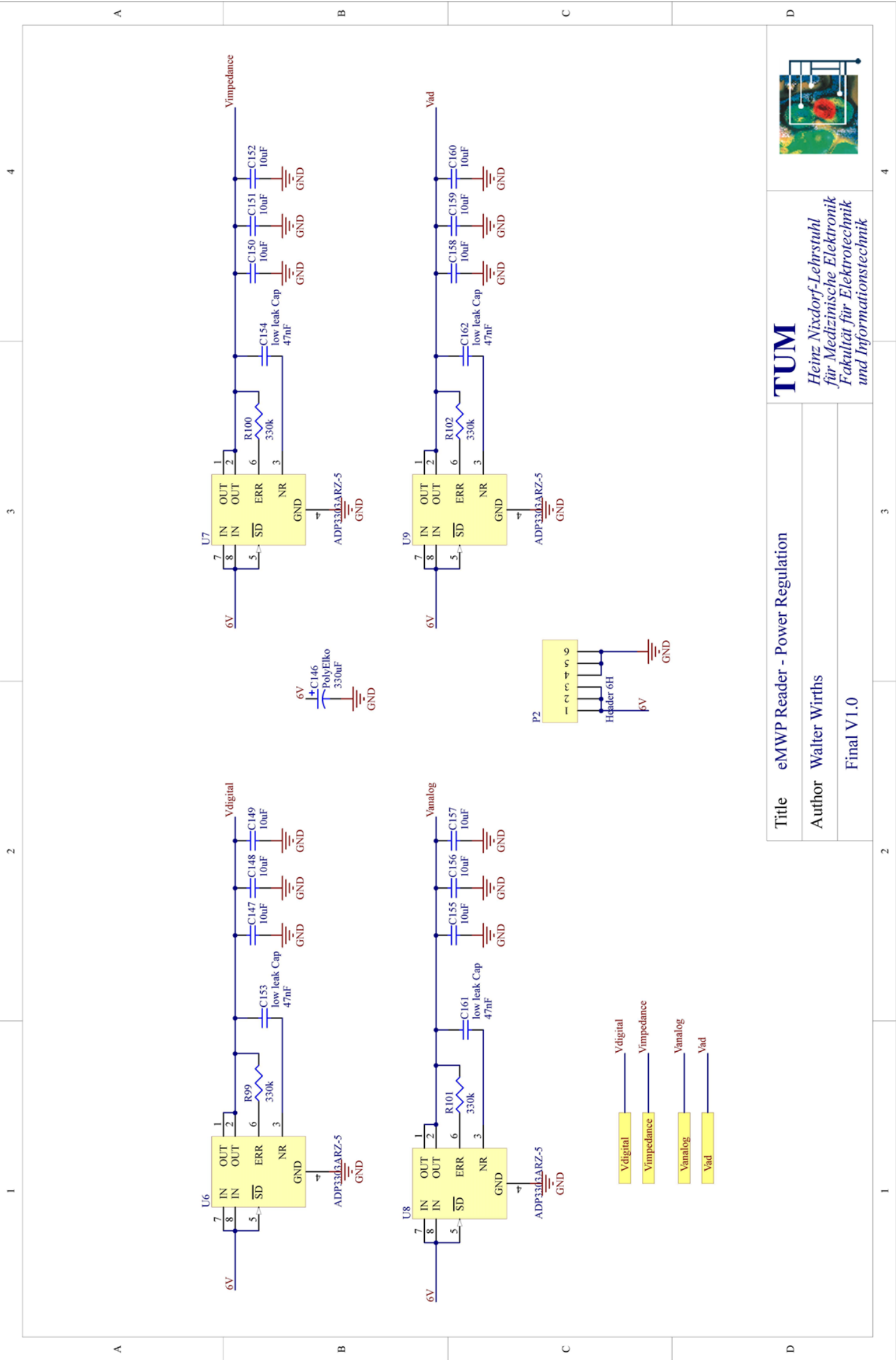




TUM
Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
für Medizinische Elektronik
Fakultät für Elektrotechnik
und Informationstechnik

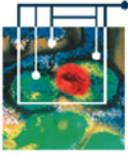
Title eMWP Reader - Digital
Author Walter Wirths
Final V1.0

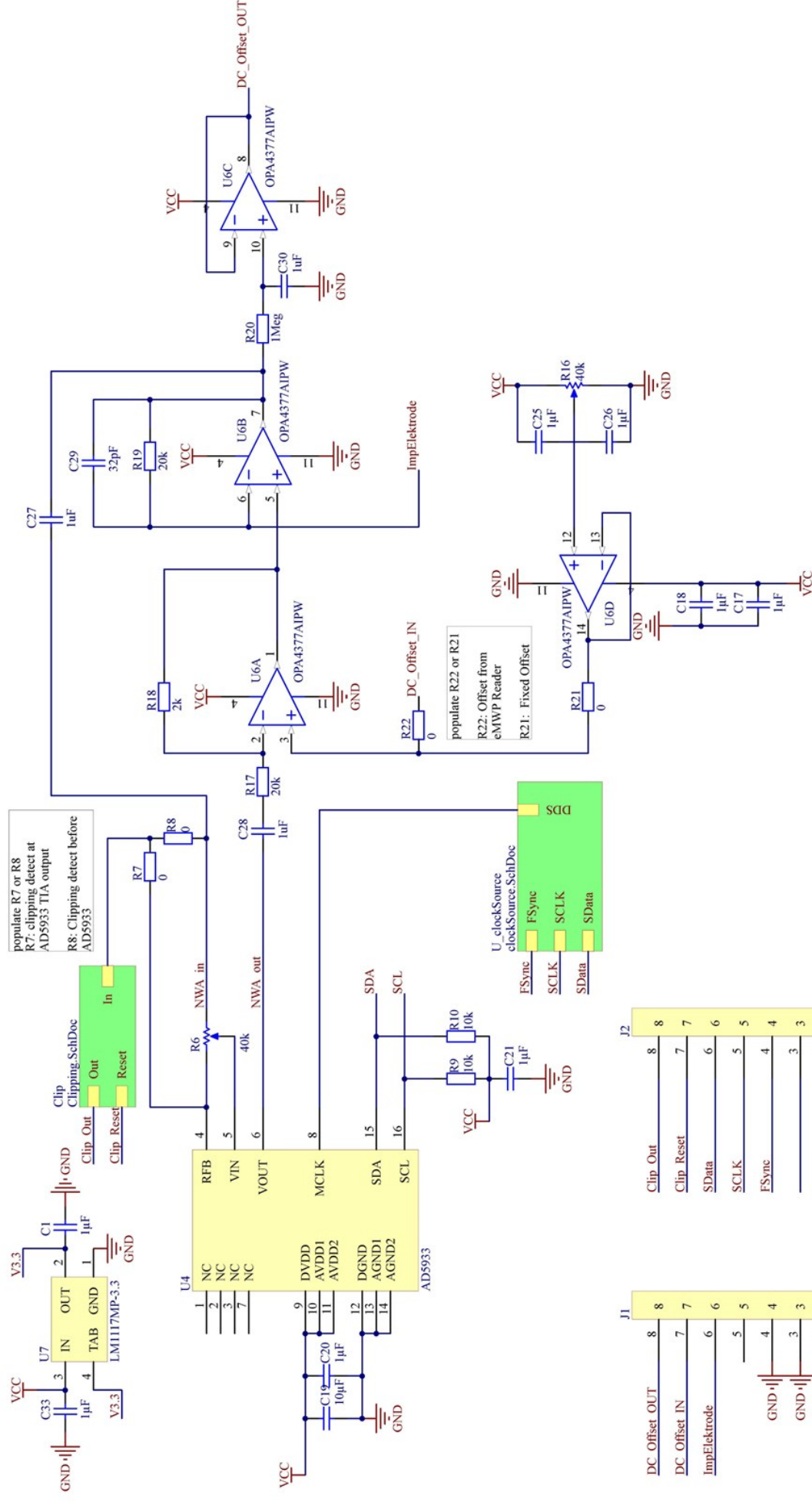




Title eMWP Reader - Power Regulation
 Author Walter Wirths
 Final V1.0

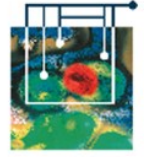
TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik





Title Impedance Module - Network Analyzer
 Author Walter Wirths
 V1.0

TUM
 Heinz Nixdorf-Lehrstuhl
 für Medizinische Elektronik
 Fakultät für Elektrotechnik
 und Informationstechnik



J1

8	DC_Offset_OUT
7	DC_Offset_IN
6	ImpElektrode
5	
4	GND
3	GND
2	VCC
1	VCC

Stiftleiste

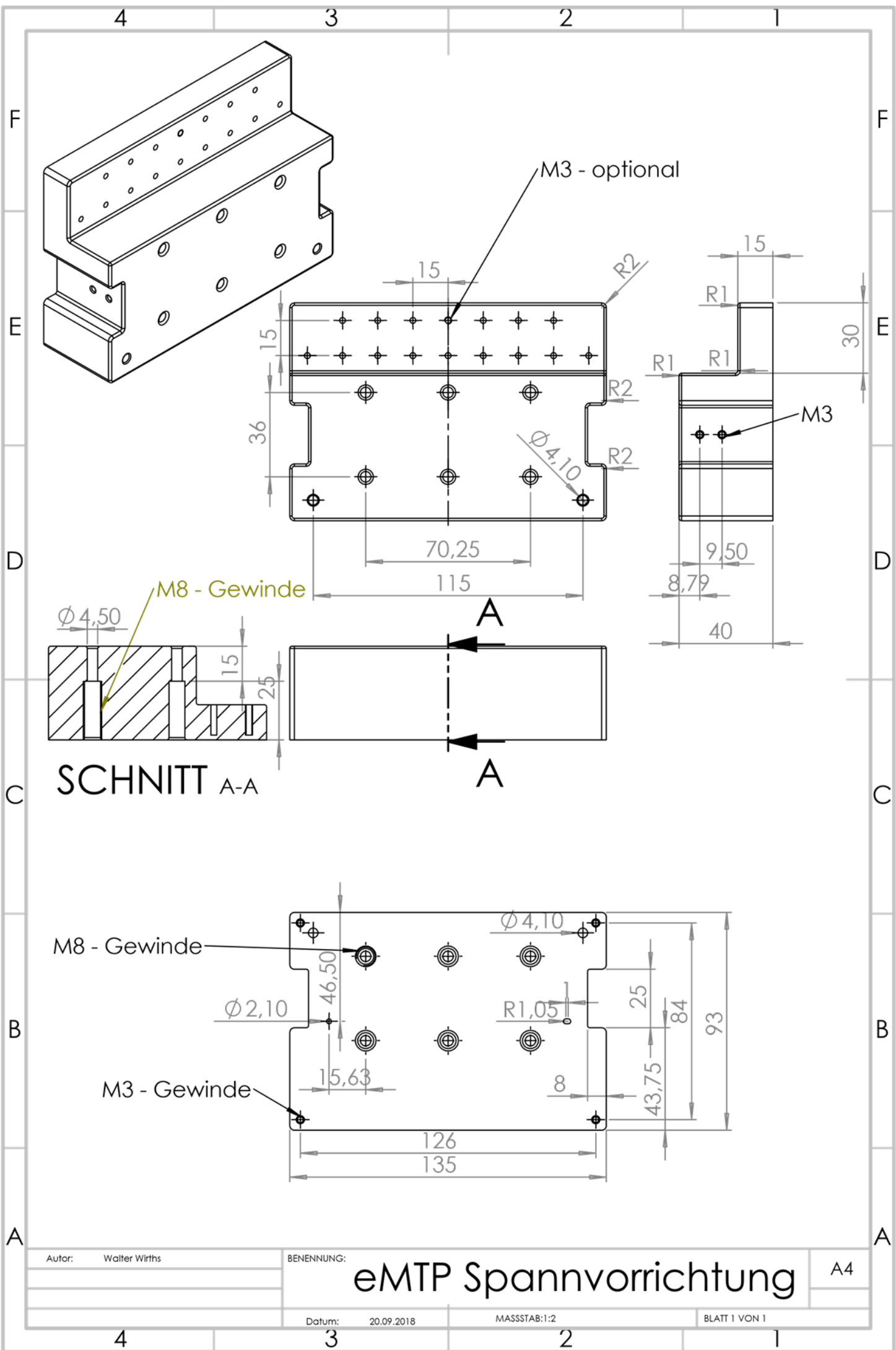
J2

8	Clip_Out
7	Clip_Reset
6	SData
5	SCLK
4	FSync
3	
2	SDA
1	SCL

Stiftleiste

Kapitel 11: Anhänge

ANHANG 2: ZEICHNUNG DER SPANNVORRICHTUNG



SCHNITT A-A

eMTP Spannvorrichtung

A4

Autor: Walter Wirths

BENENNUNG:

Datum: 20.09.2018

MASSSTAB:1:2

BLATT 1 VON 1