

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

Entwicklung und Erprobung von miniaturisierten,
elektrochemischen Sensoren für die Gelöst-Sauerstoff-
Messung zum Einsatz in Lab-on-chip-Systemen

Joachim Wiest

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

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Alexander W. Koch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernhard Wolf

2. Univ.-Prof. Paolo Lugli, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 03.03.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 18.07.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Kurzfassung.....	4
Abstract	5
1 Gelöst-Sauerstoff-Messung mit Lab-on-chip-Systemen.....	7
1.1 Bedeutung der Gelöst-Sauerstoff-Messung für Diagnostik und Pharmakologie.....	7
1.2 Aspekte der Gelöst-Sauerstoff-Messung in der Zellbiologie.....	9
1.2.1 Zelluläre Parameter	9
1.2.2 Hypoxie, HIF.....	10
1.2.3 Aspekte der biologischen Gelöst-Sauerstoff-Sensorik in Zellen (HIF).....	12
1.3 Physikalische Grundlagen der Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung.....	14
1.3.1 Eigenschaften von Sauerstoff.....	15
1.3.2 Sauerstoff in Gasen	15
1.3.3 Sauerstoff in Flüssigkeiten.....	16
1.3.3.1 Ostwaldscher Absorptionskoeffizient.....	16
1.3.3.2 Molenbruch bzw. Stoffmengenanteil von Gasen in Flüssigkeiten.....	17
1.3.3.3 Bunsenscher Absorptionskoeffizient.....	18
1.3.3.4 Henry-Koeffizient	18
1.3.3.5 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in reinem Wasser	19
1.3.3.6 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in isotoner Kochsalzlösung.....	20
1.3.3.7 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in anderen Lösungen.....	23
1.3.4 Sauerstoffaustausch lebender Zellen.....	23
2 Methoden zur Bestimmung der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration.....	26
2.1 Chemische Bestimmung.....	26
2.1.1 Bestimmung nach Winkler.....	27
2.1.2 Winkler-Titration	27
2.1.3 Winkler-Spektrophotometrie.....	27
2.1.4 Spektrophotometrie (Kolorimetrie, Absorptionsphotometrie).....	28
2.2 Elektrochemische Bestimmung.....	28
2.2.1 Referenzelektroden, elektrochemisches Potential, Nernst-Gleichung.....	28
2.2.2 Amperometrie.....	32
2.2.2.1 Sensoren ohne gaspermeable Membran.....	35
2.2.2.2 Sensoren mit gaspermeabler Membran.....	38
2.2.3 O ₂ -FET-Methode.....	38
2.2.3.1 pH-ISFET	40
2.2.4 Potentiometrie	41
2.2.5 Redoxpotential	42
2.3 Optische Bestimmung	43
2.3.1 Fluoreszenz, Lumineszenz	43
2.3.1.1 Intensität der Fluoreszenz.....	44
2.3.1.2 Abklingzeit der Fluoreszenz.....	44
2.4 Magnetische Bestimmung	45
2.4.1 Overhauser-Verstärkungs-Magnetresonanz-Tomographie	45
2.4.2 Elektronenparamagnetische Resonanz.....	46
2.5 Andere Methoden.....	46
2.6 Eigenschaften der Methoden zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung.....	46
2.7 Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung für zellbasierte Systeme	47
2.8 Methoden zur gezielten Variation des Gelöst-Sauerstoffs in Flüssigkeiten	48
2.8.1 Natriumsulfit	48
2.8.2 Glukoseoxidase	49
2.8.3 Veränderung des Gasgemischs (Stickstoff).....	50

2.8.4	Veränderung des Umgebungsdrucks.....	50
3	Neue Ansätze zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung für Lab-on-chip-Systeme	52
3.1	Elektrochemische Bezugssysteme.....	55
3.1.1	Silber/Silberchlorid-Referenzelektroden.....	55
3.1.2	Platinierter Platindraht als Bezugssystem	55
3.2	O ₂ -FET	56
3.2.1	Amperometrie + ISFET.....	57
3.2.2	Modellierung	58
3.3	Kohlenstoff-Nanoröhrchen.....	62
3.4	Modulares Lab-on-chip-System.....	63
3.4.1	Kontaktierung.....	64
3.4.2	Fluidiksystem, Modularer Aufbau	64
4	Ergebnisse der neuen Ansätze für Lab-on-chip-Systeme	66
4.1	Elektrochemische Bezugssysteme.....	66
4.1.1	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode.....	66
4.1.2	Platinierter Platindraht als Bezugssystem	68
4.2	O ₂ -FET	69
4.2.1	Amperometrie + ISFET.....	69
4.2.2	Modellierung	71
4.2.3	Messung mit Kalibrierflüssigkeit.....	72
4.2.4	Messung an lebenden Zellen.....	73
4.3	Kohlenstoff-Nanoröhrchen.....	74
4.4	Modulares Lab-on-chip-System.....	78
4.4.1	Kontaktierung.....	82
4.4.2	Fluidiksystem, Modularer Systemaufbau.....	84
4.4.3	Funktionstest durch Messungen an lebenden Zellen.....	87
5	Bedeutung der neuen Ansätze für Lab-on-chip-Systeme.....	94
5.1	Elektrochemische Bezugssysteme.....	94
5.2	O ₂ -FET	95
5.3	Kohlenstoff-Nanoröhrchen.....	96
5.4	Modulares Lab-on-chip-System.....	97
5.4.1	Kontaktierung.....	97
5.4.2	Fluidsystem, modularer Aufbau	97
5.5	Resümee und Ausblick.....	98
A.1	Publikationsliste	102
A.2	Symbole, Konstanten und Abkürzungen.....	106
A.3	Danksagung.....	112
A.4	Literatur.....	113

Kurzfassung

Die Messung des Gelöst-Sauerstoffs (DO) im Mikromilieu lebender Zellen hat eine besondere Bedeutung in der Zellbiologie und insbesondere in der Onkologie. Es besteht daher ein großes Interesse an Lab-on-chip-Systemen die den DO messen. In dieser Arbeit wird die Gelöst-Sauerstoff-Messung (DO-Messung) mit elektrochemischen Sensoren zum Einsatz in Lab-on-chip-Systemen wissenschaftlich abgehandelt. Es wird die Relevanz der DO-Messung in der Zellbiologie erörtert und die Bedeutung für die Onkologie abgeleitet. Zudem werden die physiologischen und physikalischen Hintergründe der DO-Messung erklärt und die bisher verfügbaren Methoden beschrieben. Schließlich werden neue Ansätze für Lab-on-chip-Systeme vorgestellt. Dabei handelt es sich um ein neues Bezugssystem für elektrochemische Messungen, einen neuartigen DO-Sensor auf Basis von Kohlenstoff-Nanoröhrchen, eine Erweiterung des Detektionsspektrums des bereits bestehenden O₂-FETs sowie eine Modellierung der elektrochemischen Vorgänge am O₂-FET und einer kompletten modularen Systemlösung für Lab-on-chip-Systeme. Beispielmessungen zeigen die Richtigkeit der neuen sensorischen Ansätze und der theoretischen Annahmen. Messungen aus den Bereichen Umweltmonitoring und Chemosensitivitätsanalytik weisen die Einsatzfähigkeit der modularen Lab-on-chip Lösung nach. Damit steht nun erstmals ein modulares Lab-on-chip-System bereit, dessen DO-Sensorik umfassend beschrieben wurde. Im hinteren Teil werden die Ergebnisse diskutiert und deren Bedeutung für zukünftige zellbiologische Untersuchungen, sowie für die Systembiologie dargestellt. Dabei ist die Kostensituation in der pharmakologischen Wirkstoffforschung und die Entwicklung der Förderlandschaft in der Systembiologie ein zu berücksichtigender Faktor.

Abstract

The measurement of dissolved oxygen (DO) with electrochemical microsensors for use in lab-on-chip-systems is a powerful means in cell biology and oncology to obtain information on their vitality and viability. The state of the art of DO-measurement in cell biology is described and the relevance for oncology is derived. This requires an understanding of the physiological and physical properties. New concepts for DO-measurement with lab-on-chip-systems were thus developed namely a new biocompatible and miniaturized reference electrode, a new carbon nano-tube based DO sensor, an extension of the so called O₂-FET sensor as a Redox sensor and a modular system approach for cell based assays are presented. Results from experiments in the field of environmental monitoring and chemosensitivity testing show that the concepts provide reliable and reproducible measurements. Now, a modular lab-on-chip-system is available where the DO-properties are described accurately. The results and their impact for the field of cell biology research are discussed and an outlook toward future work in the field of biotechnical engineering is given. A short overview at the expense situation in pharmacology and the development of the governmental sponsorship in system biology is stated.

... Ja, ich rede von einem Ort, wo einen das Lesen in den Wahnsinn treiben kann. Wo Bücher verletzen, vergiften, ja sogar töten können. Nur wer wirklich bereit ist, für die Lektüre dieses Buches derartige Risiken in Kauf zu nehmen, wer sein Leben auf's Spiel setzen will, um an meiner Geschichte teilzuhaben, der sollte mir folgen. Allen anderen gratuliere ich zu ihrer feigen, aber gesunden Entscheidung, zurückzubleiben. Macht's gut, ihr Memmen! Ich wünsche euch ein langes und sterbenslangweiliges Dasein und winke euch in diesem Satz Adieu! ...

Walter Moers – Die Stadt der träumenden Bücher

1 Gelöst-Sauerstoff-Messung mit Lab-on-chip-Systemen

„Lab-on-chip“ bezeichnet mikrofluidische Systeme, die die Funktionalität eines kompletten Analyselabors auf einer miniaturisierten Plattform unterbringen. Seit den 90er Jahren wird in diesem Bereich an der Integration von Biosensoren geforscht. Hierbei werden die unterschiedlichsten Detektionssysteme untersucht. Im vorliegenden Kapitel dieser Arbeit werden die Bedeutung der Gelöst-Sauerstoff-Messung (DO-Messung nach englisch dissolved oxygen (DO)) für Lab-on-chip-Systeme und die physikalischen Grundlagen der DO-Messung erläutert.

1.1 Bedeutung der Gelöst-Sauerstoff-Messung für Diagnostik und Pharmakologie

Zum besseren Verständnis des Aufbaus und der Funktionsweise biologischer Zellen sowie zur Funktionalisierung von Zellen als Biosensoren werden die Stoffwechselfparameter der Zellen untersucht^{1,2}.

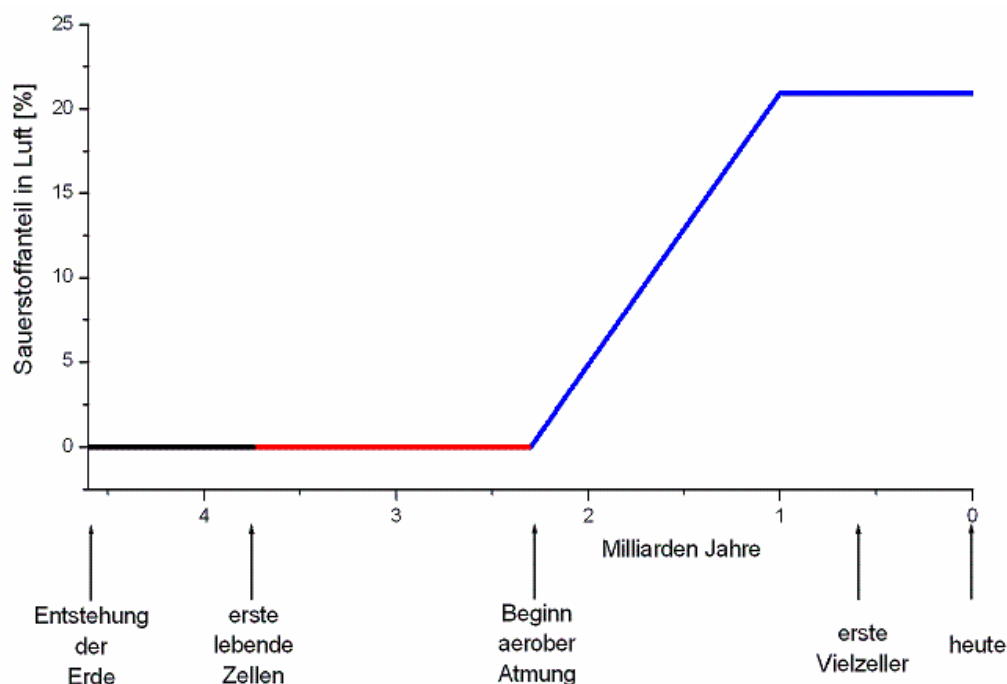


Abbildung 1-1: Wichtige Ereignisse während der Evolution der Lebewesen auf der Erde (nach Alberts³). Rot entspricht anaerobem Stoffwechsel, Blau entspricht aerobem (und anaerobem) Stoffwechsel.

Detaillierte Kenntnisse über den Stoffwechsel sind nötig zur Entwicklung wirksamer Therapien gegen Krankheiten wie Krebs^{4,5}, zur Erprobung, Optimierung und Entwicklung

neuer Medikamente⁶ oder Kosmetika⁷ – und somit zu einer Verringerung der Tierversuche⁸ –, aber auch zur Entwicklung neuartiger Biosensoren³, bei denen biologische Zellen als Signalwandler agieren⁹⁻¹².

Unter den Stoffwechselfparametern von eukaryotischen Zellen¹ nimmt die zelluläre Atmung eine herausragende Stellung ein, da sie die mitochondriale Aktivität – also den aeroben Energieumsatz – der Zelle widerspiegelt. Die Bedeutung der zellulären Atmung ergibt sich aus der Evolution der eukaryotischen Zellen. Bei Entstehung des Lebens auf der Erde vor mehr als drei Milliarden Jahren gab es noch keine Sauerstoffatmosphäre. Diese bildete sich erst vor ca. 1,5 Milliarden Jahren durch photosynthetisch aktive Zellen (siehe Abbildung 1-1). Dadurch entsteht eine Bifurkation der Energiegewinnung von Zellen, weil aerobe Stoffwechselprozesse eine vielfache Menge an Adenosintriphosphat (ATP) im Vergleich zu anaerobem Stoffwechsel erzeugen. Aufgrund dieser evolutiven Entwicklung können viele Zellen sowohl mit als auch ohne Sauerstoff Stoffwechsel betreiben³. So kann bei Hefen der so genannte Pasteur-Effekt^{II} beobachtet werden. Hefen können sowohl aerob als auch anaerob Stoffwechsel betreiben. Wie in Abbildung 1-2 dargestellt können Hefen unter Sauerstoffmangel ihren Stoffwechsel auf die weniger energieeffiziente alkoholische Gärung umstellen.

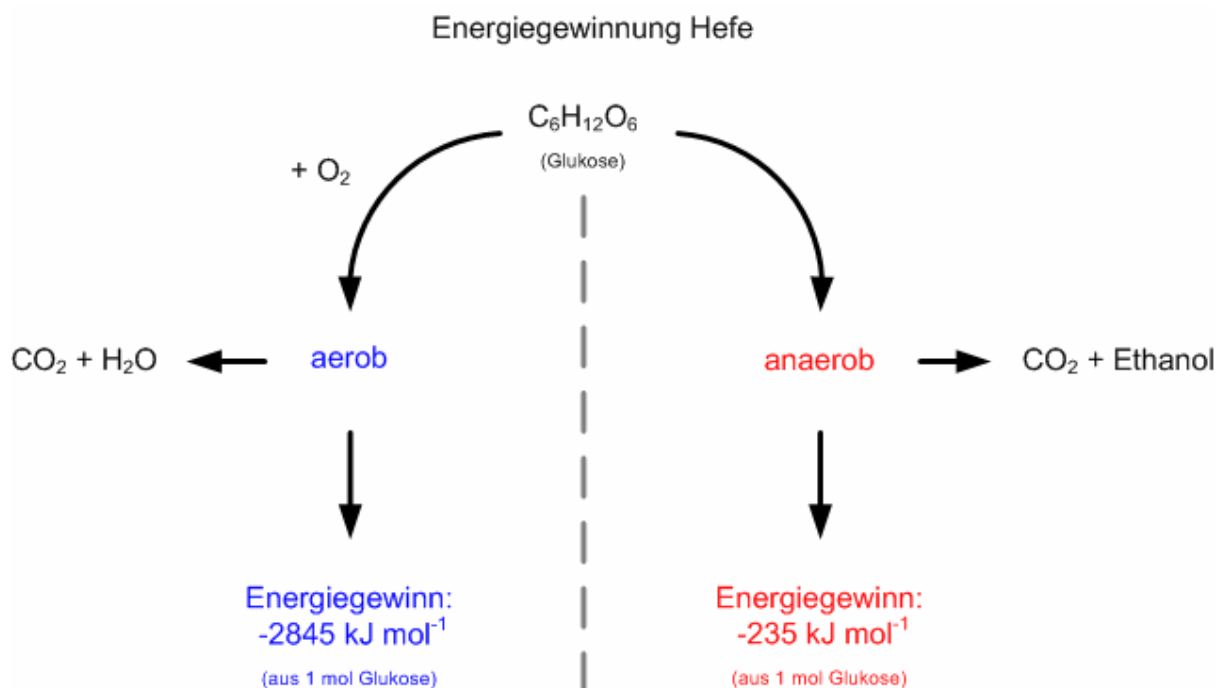


Abbildung 1-2: Aerobe und anearobe Energiegewinnung von Hefen (nach Bannwarth et al.¹).

¹ Eukaryoten sind Organismen, die aus Zellen mit Zellkern bestehen.

^{II} Das Phänomen, dass Hefen unter Sauerstoffentzug mehr Glukose verbrauchen als mit Sauerstoff wird als Pasteur-Effekt bezeichnet.

Auch menschliche Zellen besitzen die Fähigkeit sowohl aerob als auch anaerob Energie zu gewinnen. Die Untersuchung des Stoffwechsels von malignen Zellen gewinnt hierbei in der modernen Tumorforschung zunehmend an Bedeutung (siehe 1.2.2 Hypoxie, HIF). Es zeigt sich, dass sowohl Art als auch Aktivität des zellulären Metabolismus in engem Zusammenspiel mit den Umgebungsbedingungen von Tumoren stehen und somit für einen erfolgreichen Therapieverlauf ein systemischer Ansatz notwendig ist¹⁴⁻¹⁸.

Zur Untersuchung und Aufzeichnung der zellulären Atmung werden vor allem DO-Sensoren verwendet, die den Betrag des im Zellkulturmedium gelösten Sauerstoffs bestimmen. Die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen Sensortypen in Bezug auf Langzeitstabilität, Sensitivität, Miniaturisierbarkeit und Ansprechzeit wurden jedoch noch nicht systematisch untersucht. Des Weiteren gibt es keine flexiblen mobilen Systeme zur mobilen Probenanalyse, mit denen es möglich ist, Umweltanalytik oder Nahrungsmittel-Qualitätsbestimmungen – mit Zellen als Signalwandler – durchzuführen. Schließlich ist die Entwicklung von Sensoren zur DO-Bestimmung noch nicht an ihrem Ende angekommen.

1.2 Aspekte der Gelöst-Sauerstoff-Messung in der Zellbiologie

Die DO-Sättigung im Mikromilieu lebender Zellen hat starken Einfluss auf die biologischen Vorgänge auf zellulärer Ebene. Sie ermöglicht einen effizienten Stoffwechsel der Zelle und hat zudem einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen. Nachstehend wird kurz auf den Stoffwechsel biologischer Zellen eingegangen und der Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Tumorgewebe und der DO-Sättigung erläutert. Schließlich wird der aktuelle Wissenstand zu den Mechanismen der zellulären DO-Sensorik wiedergegeben.

1.2.1 Zelluläre Parameter

In der Mikroumgebung von lebenden Zellen verändert sich ständig die Zusammensetzung des Zellmilieus¹⁹. Dies wird sowohl durch die Stoffwechselaktivität der Zellen (z.B. Sauerstoffverbrauch) als auch durch externe Milieuveränderungen (z.B. durch den Blutkreislauf) verursacht. Das Zellmilieu variiert somit seine Konzentrationen an Ionen, Proteinen und Gelöst-Gasen. Durch die Beobachtung des Zellmilieus unter Verwendung von miniaturisierten Sensoren lässt sich auf die Vitalität der untersuchten Zellen schließen²⁰. Die

besondere Bedeutung der DO-Bestimmung im Zellmilieu gegenüber anderen zellphysiologischen Parametern wurde in Kapitel 1.1 beschrieben. Die mitochondriale Aktivität der Zellen moduliert, wie oben erwähnt, die DO-Konzentration im Zellmilieu. Abbildung 1-3 nach Hoinkis et al.²¹ zeigt vereinfacht die Energieübertragung in einer Zelle unter Sauerstoffverbrauch.

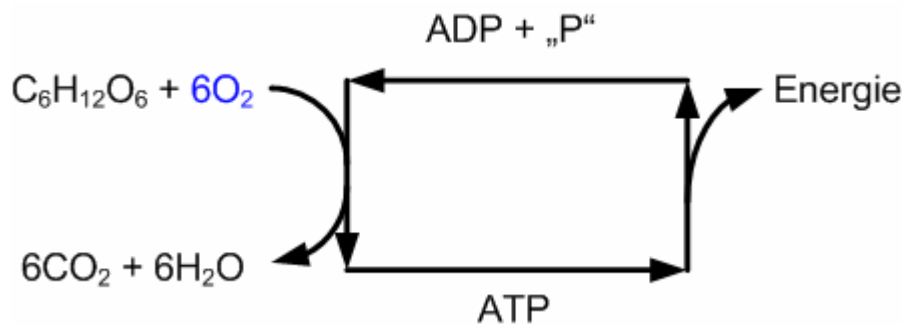


Abbildung 1-3: Vereinfachte Darstellung der aeroben Energiegewinnung aus Glukose und Sauerstoff in einer Zelle (nach Hoinkis et al.²¹).

Nährstoffe werden unter Energiegewinnung zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert. Die gewonnene Energie wird im Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert. Dieses kann die Energie unter Abgabe einer Phosphatgruppe wieder abgeben. Das dabei entstandene Adenosindiphosphat (ADP) kann in den Mitochondrien wieder in ATP gewandelt werden. Durch Bestimmung der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration im Mikromilieu von lebenden Zellen wird versucht, auf die mitochondriale Aktivität der Zellen zu schließen.

1.2.2 Hypoxie, HIF

Unter Hypoxie^{22,23} versteht man einen DO-Mangel im Blut oder in Gewebe. Die gestiegene Relevanz der DO-Messung an lebenden Zellen lässt sich an der Anzahl der Publikationen im Bereich der Hypoxie ablesen. Das „ISI Web of KnowledgeSM“ liefert über 4600 Artikel zum Begriff Hypoxie (englisch: *hypoxia*) im Jahr 2007 gegenüber 2839 Artikeln in 2000 und 2156 Artikeln in 1995. Hypoxie in Tumoren erhöht sowohl die Metastasierung als auch die Angiogenese^{III} und verringert die Wirksamkeit verschiedener Behandlungsmethoden²⁴. „Hypoxie induzierbare Faktoren“ (englisch: *hypoxia inducible factors (HIFs)*)^{2,25,26} sind Proteine, die unter anderem die Transkription der genetischen Information einer Zelle

^{III} Als Angiogenese wird das Wachstum von Blutgefäßen bezeichnet.

regulieren. Speziell die Konzentration von HIF in der zellulären Mikroumgebung hängt von der dortigen DO-Konzentration (siehe Kapitel 1.2.3) ab.

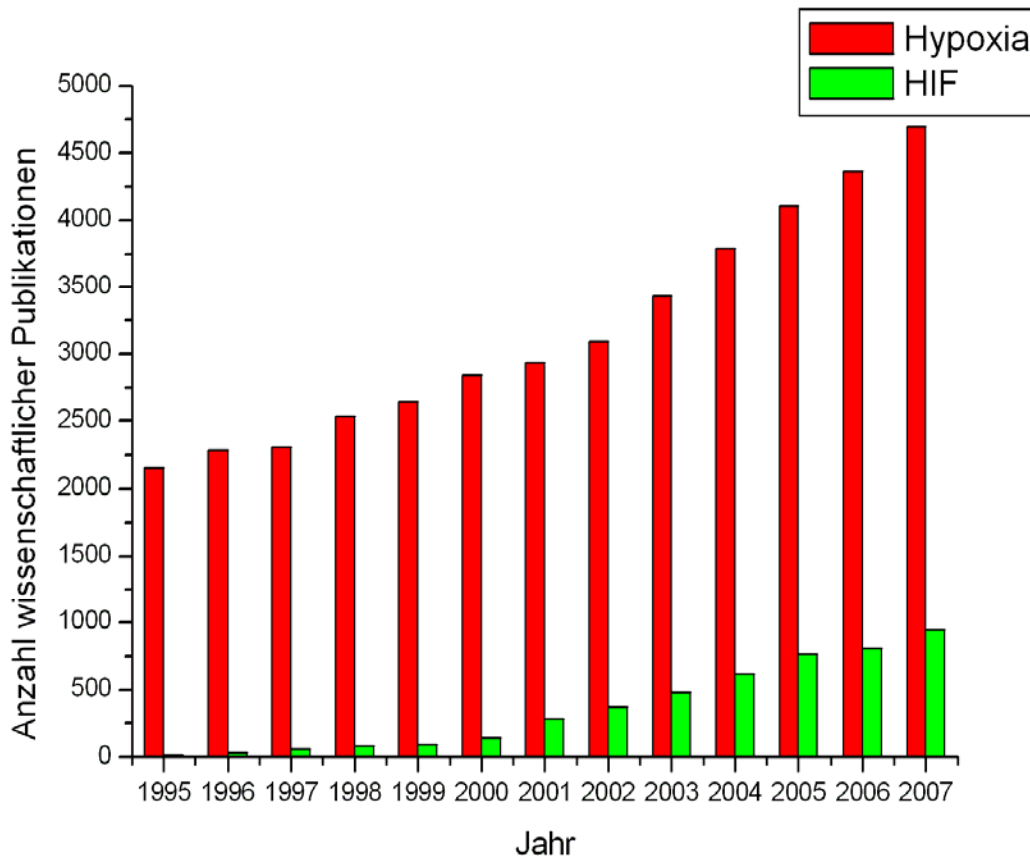
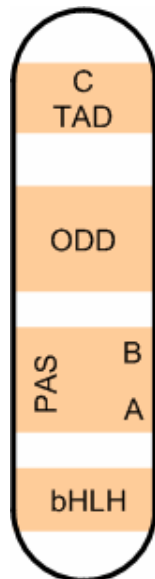


Abbildung 1-4: Entwicklung der Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen nach „ISI web of KnowledgeSM“ in den Bereichen Hypoxie und HIF seit 1995.

Das „ISI web of KnowledgeSM“ liefert über 660 Artikel zum Begriff HIF im Jahr 2007 gegenüber 105 Artikeln in 2000 und 11 Artikeln in 1995. Allerdings wurde bereits 1993 ein System vorgestellt mit dem der DO-Gehalt des Mediums eingestellt werden kann²⁷. Nicht nur die DO-Konzentration im Mikromilieu der Zellen wird durch die mitochondriale Aktivität^{3,21} der Zellen verändert, auch die Genexpression und Transkriptionsrate der Zellen selbst hängt wiederum von der DO-Konzentration ab²⁸. Die Bestimmung der DO-Konzentration im Mikromilieu von lebenden Zellen gewinnt somit zunehmend an Bedeutung im Bereich der Zellbiologie, hier im Speziellen im Bereich der Tumorforschung²⁹.

1.2.3 Aspekte der biologischen Gelöst-Sauerstoff-Sensorik in Zellen (HIF)

Der detaillierte Mechanismus der DO-Sensorik von Säugetieren wurde noch nicht umfassend verstanden³⁰. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass HIF eine zentrale Rolle in der zellulären DO-Detektion spielt³¹. HIF ist ein Heterodimer^{IV}, das aus einem α - und einem β -Monomer besteht. Drei Arten von HIF- α sind bekannt (HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α), wobei speziell HIF-1 α und HIF-2 α in malignen Tumoren erhöht auftreten²⁶. Abbildung 1-5 zeigt den Aufbau von HIF-1 α ² und Abbildung 1-6 dessen Quartärstruktur³².



C-TAD (C-terminale transaktivierende Domäne) und **ODD** (*oxygen dependent degradation domain*): zur Inaktivierung von HIF-1 α bei Normoxie

PAS (PER-ARNT-SIM [period-aryl-hydrocarbon-nuclear-translocator-single-minded]): zur Zusammenlagerung der Untereinheiten

bHLH (*basic helix-loop-helix*): sind Transkriptionsfaktoren zur Bindung an ein hypoxieresponsives Element

Abbildung 1-5: Aufbau der HIF-1 α Untereinheit (nach Fandrey²).

Eine Quartärstruktur entsteht, wenn sich mehrere Proteinmoleküle zu einer funktionalen Einheit zusammenschließen. Im Fall von HIF-1 α sind dies 17 Unterstrukturen³². Eine detaillierte Beschreibung der HIF-1 α Regulation und eine Liste Sauerstoff-Regulierter Gene findet sich in der Dissertation von Linden²⁸.

^{IV} Ein Heterodimer ist ein Makromolekül, das aus zwei ungleichen Untereinheiten (Monomeren) zusammengesetzt ist.

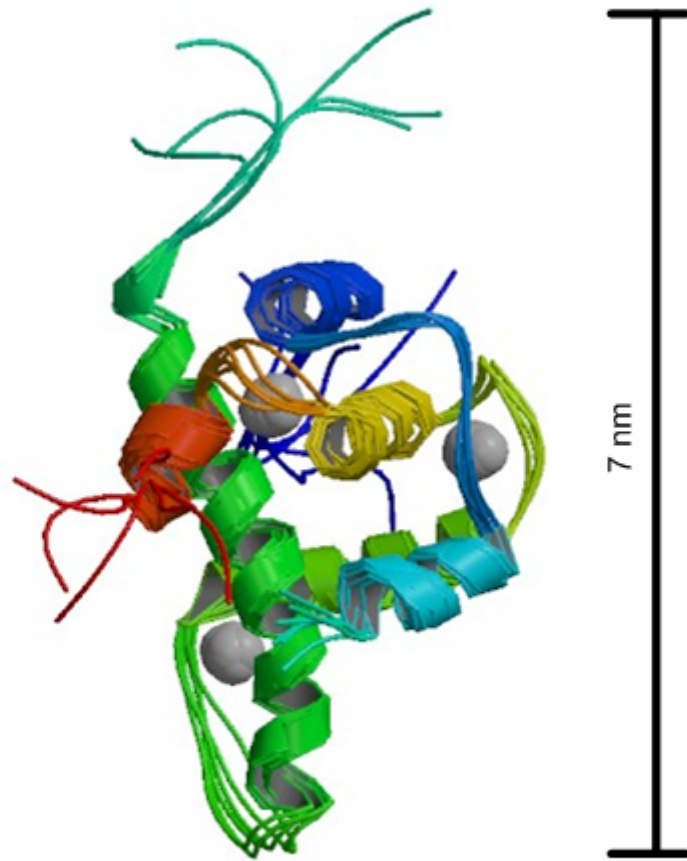


Abbildung 1-6: Quartärstruktur der HIF-1 α Untereinheit (PDB ID: 1L3E³², Freedman et al.³³), ein molekularer Sauerstoff-Sensor.

HIF- β ist identisch mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor^V (*englisch: aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT)*)³⁴. Es wird angenommen, dass HIF- α kontinuierlich im Zytosol gebildet, aber unter Normoxie^{VI} innerhalb weniger Minuten wieder vom Proteasom^{VII} abgebaut wird². Unter Hypoxie wird dieser Abbau jedoch verhindert. Damit stabilisiert sich HIF- α und es kommt unter Bindung mit ARNT zur Bildung von HIF. HIF transloziert dann in den Kern der Zelle und aktiviert dort ein Hypoxie-Responsives Element (HRE)³⁵.
 Nachstehende Abbildung verdeutlicht den Vorgang:

^V Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor ist ein Protein in Säugetierzellen, das für die Regulierung des Zellwachstums und der Zellteilung verantwortlich ist.

^{VI} Normoxie bedeutet eine ausreichende DO-Versorgung von Zellen (vgl. Kapitel 1.2.2).

^{VII} Das Proteasom zerlegt Proteine in dessen Bestandteile.

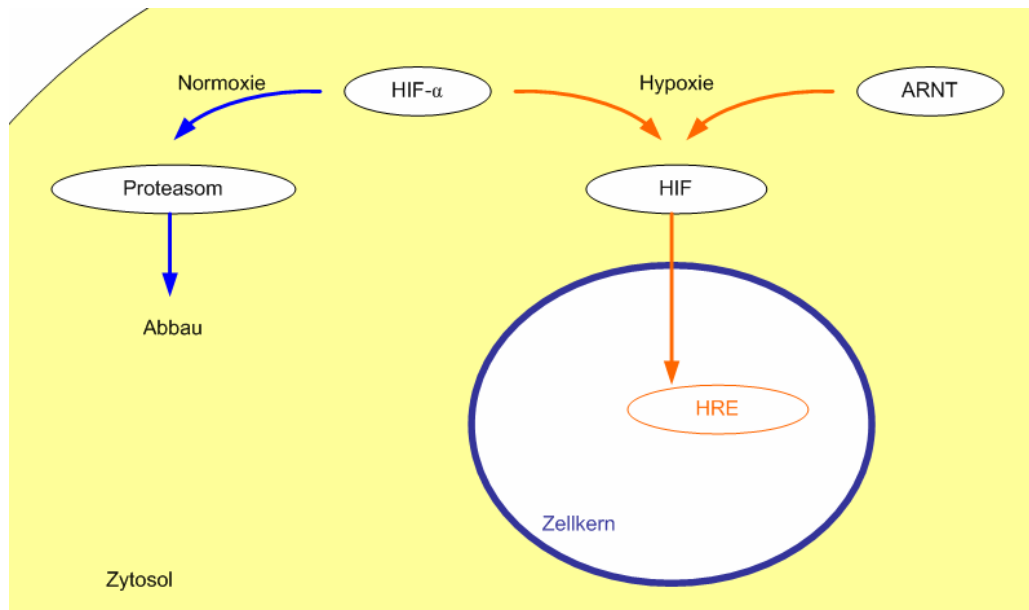


Abbildung 1-7: HIF-Reaktionsstrecke unter Normoxie und Hypoxie (nach Fandrey et al.³⁶).

HREs sind Targetgene deren Expression durch die Bindung angeregt oder unterdrückt wird. Somit kann die Zelle auf eine Veränderung in der DO-Konzentration in ihrem Mikromilieu reagieren. Die Erforschung dieser Targetgene sowie deren Reaktionswege und Auswirkungen sind Gegenstand aktueller Forschung in Biophysik und Molekularbiologie und von sehr großer Relevanz für die Tumorthherapie zum Verständnis des Prozesses der systemischen Metastasierung^{22,25,26,30,35,36}.

Da die genetische Information alleine jedoch keine definitive Aussage über das tatsächliche Metabolisierungsmuster der Zelle zulässt, ist die Entwicklung miniaturisierter Sensoren für die DO-Messung und der dazugehörigen Interface-Elektronik von großer Bedeutung. Mit diesen Systemen können genetische Metabolisierungsdaten erstmalig experimentell unter realitätsnahen Bedingungen überprüft werden.

1.3 Physikalische Grundlagen der Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung

Zum Verständnis der biophysikalischen Vorgänge auf zellulärer Ebene und der sensorischen Eigenschaften von Lab-on-chip-Systemen werden nachstehend die wichtigsten physikalischen Gesetze bezüglich des Sauerstoffs dargestellt. Schwerpunkt ist hierbei das Lösungsverhalten von Sauerstoff in Flüssigkeiten unter unterschiedlichen Einflussgrößen wie Druck, Temperatur und Salinität^{VIII}.

^{VIII} Als Salinität wird der Salzgehalt einer Flüssigkeit bezeichnet.

1.3.1 Eigenschaften von Sauerstoff

Sauerstoff (Symbol: O) ist das achte Element im Periodensystem, d.h., es hat acht Protonen im Kern (Ordnungszahl 8) und, da es ein neutrales Atom ist, ebenso viele Elektronen. Die Massenzahl beträgt 15,999. Drei Isotope des Sauerstoffs kommen in der Natur vor: ^{16}O (99,759%), ^{17}O (0,037%) und ^{18}O (0,204%). Sauerstoff ist im Bereich der Erdkruste das häufigste Element; der Massenanteil beträgt 49,2%³⁷. Bei Raumtemperatur ist Sauerstoff gasförmig, farb- sowie geruchlos. Der Schmelzpunkt liegt bei $-218,79^\circ\text{C}$, der Siedepunkt bei $-182,953^\circ\text{C}$. Der kritische Druck liegt bei 50,79 bar, die kritische Temperatur liegt bei $-118,56^\circ\text{C}$ ^{38,39}. Das molare Volumen von Sauerstoff ergibt sich zu 22,4 l/mol.

1.3.2 Sauerstoff in Gasen

Der Standardluftdruck auf Meeresniveau beträgt 1,01325 bar. Luft setzt sich auf Meeresniveau (in Volumenprozent) folgendermaßen zusammen³⁷:

Tabelle 1-1: Prozentuale Zusammensetzung von Luft auf Meeresniveau.

Gas	Anteil (%)
Stickstoff	78,08
Sauerstoff	20,95
Argon	0,933
Kohlenstoffdioxid	0,034
Sonstige	0,003

In einer idealen Gasmischung ist der Gesamtdruck nach dem Gesetz von Dalton gleich der Summe der Drucke P_i , welche die einzelnen Komponenten i ausüben würden, wenn sie das Gesamtvolumen ausfüllen würden.

$$P = \frac{n_{tot}}{V} R_m \cdot T = \frac{n_1}{V} R_m \cdot T + \frac{n_2}{V} R_m \cdot T + \dots + \frac{n_r}{V} R_m \cdot T = P_1 + P_2 + \dots + P_r \quad 1-1$$

Der jeweilige Partialdruck ergibt sich zu⁴⁰:

$$P_i = \frac{n_i}{n_{tot}} P \quad 1-2$$

Man spricht von einem idealen Gas wenn die Zustandsgleichung

$$P \cdot \bar{V} = R \cdot T \quad 1-3$$

innerhalb der Messgenauigkeit erfüllt ist. Für Atmosphärendruck und Umgebungstemperatur beschreibt diese Zustandsgleichung reale Gase in sehr guter Näherung (relativer Fehler < 1%). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen genügen diesen Kriterien, daher sind exaktere Zustandsgleichungen (Van der Waals, Redlich – Kwong, etc.) nicht nötig. Bei einem Partialdruck von 0,2123 bar (1,01325 bar · 0,2095 v%) ergibt sich nach Gleichung 1-3 für Sauerstoff:

Tabelle 1-2: Molares Volumen und Molarität von Sauerstoff in Luft in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur (K)	Molares Volumen (l mol ⁻¹)	Molarität (mol l ⁻¹)
273,15	106,98	9,35E-03
278,15	108,93	9,18E-03
283,15	110,89	9,02E-03
288,15	112,85	8,86E-03
293,15	114,81	8,71E-03
298,15	116,77	8,56E-03
303,15	118,73	8,42E-03
308,15	120,68	8,29E-03
313,15	122,64	8,15E-03
318,15	124,60	8,03E-03
323,15	126,56	7,90E-03
328,15	128,52	7,78E-03

1.3.3 Sauerstoff in Flüssigkeiten

Die Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten hängt vom Umgebungsdruck, der Temperatur sowie vom Salzgehalt der Flüssigkeit ab⁴¹. Die Abhängigkeit vom Druck lässt sich nach Gleichung 1-3 über den Partialdruck bestimmen. Die Abhängigkeit von der Temperatur wird durch temperaturabhängige Absorptionskoeffizienten (siehe Kapitel: 1.3.3.1) beschrieben. Die Abhängigkeit vom Salzgehalt der Flüssigkeit wird über Sechenov-Konstanten (siehe Kapitel: 1.3.3.6) bestimmt.

1.3.3.1 Ostwaldscher Absorptionskoeffizient

Der Ostwaldsche Absorptionskoeffizient gibt (bei Standardluftdruck) das Verhältnis der Konzentration des Gases in der Flüssigkeit zu der in der Gasphase wieder:

$$\alpha_{OS} = \frac{c_i^F}{c_i^G} \quad 1-4$$

Nach Rettich et al.⁴² ergibt sich der Ostwaldsche Absorptionskoeffizient für Sauerstoff in reinem Wasser wie folgt:

Tabelle 1-3: Ostwaldscher Absorptionskoeffizient von Sauerstoff in reinem Wasser.

Temperatur (K)	α_{os} von Sauerstoff (l)
273,15	0,049256
278,15	0,043897
283,15	0,039627
288,15	0,036194
293,15	0,033415
298,15	0,031153
303,15	0,029305
308,15	0,027794
313,15	0,026561
318,15	0,025557
323,15	0,024748
328,15	0,024104

Dies bedeutet, dass mit zunehmender Temperatur die Konzentration des DO in der Flüssigkeit abnimmt. Thermisch induzierte Hypoxien sind in neuerer Zeit wieder verstärkt Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen in der Tumorforschung. Eine DO-Veränderung im umliegenden Gewebe wird als hilfreiche therapeutische Maßnahme gegen die Ausbreitung und das Wachstum der Tumorzellen betrachtet. Die gewebeassoziierte Messung der DO-Konzentration kann in diesem Fall helfen, Therapiemodelle abzusichern.

1.3.3.2 Molenbruch bzw. Stoffmengenanteil von Gasen in Flüssigkeiten

Die Gelöst-Gas-Konzentration wird auch im Molenbruch für Gase in Flüssigkeiten angegeben. Der Zusammenhang zwischen Ostwaldschem Absorptionskoeffizient und Molenbruch ergibt sich wie folgt^{43,44}:

$$x_1 = \left[\frac{1}{V_1^0 \cdot \alpha_{OS}} \left(\frac{R \cdot T}{P_G} + B_{11} \right) + 1 \right]^{-1} \quad 1-5$$

Gleichung 1-5 enthält das molare Volumen der Flüssigkeit V_1^0 und den zweiten Virialkoeffizienten^{IX} des Gases B_{11} . Das molare Volumen reinen Wassers beträgt 55 mol/l. Einige zweite Virialkoeffizienten für Sauerstoff ergeben sich wie folgt³⁹:

Tabelle 1-4: Zweite Virialkoeffizienten von Sauerstoff.

Temperatur (K)	B_{11} von Sauerstoff (l/mol)
250	-0,029
270	-0,023
290	-0,018
310	-0,014
330	-0,010

1.3.3.3 Bunsenscher Absorptionskoeffizient

Der Bunsensche Absorptionskoeffizient gibt an, wie viel Volumen eines gelösten Gases bei Normbedingungen von einem Volumen des Lösungsmittels aufgenommen wird⁴⁵.

$$\alpha_{BU} = \frac{V_{G_i}}{V_{F_j}} \quad 1-6$$

Der Zusammenhang zwischen Bunsenschem Absorptionskoeffizient und Ostwaldschem Absorptionskoeffizienten ergibt sich zu:

$$\alpha_{BU} = \alpha_{OS} \left(\frac{T_0}{T} \right) \text{ mit } T_0 = 273,15 \text{ K} \quad 1-7$$

1.3.3.4 Henry-Koeffizient

Der Henry-Koeffizient gibt die Gelöst-Gas-Konzentration in der Flüssigkeit abhängig vom Partialdruck an^{46,47}:

$$c_i^F = \frac{P_G}{H_c} \quad 1-8$$

^{IX} Die Verwendung von Virialkoeffizienten erlaubt eine Erweiterung der allgemeinen Gasgleichung auf Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen. Diese Präzisierung ist aus den in Kapitel 1.3.2 genannten Gründen in dieser Arbeit nicht notwendig.

Für Sauerstoff gibt der Henry-Koeffizient somit den Zusammenhang zwischen der Konzentration des Gelöst-Sauerstoffs (DO) und dem Sauerstoff-Partialdruck (pO_2) an:

$$DO \cdot c_{O_2}^F = pO_2 \quad 1-9$$

Gelegentlich wird der Henry-Koeffizient aber auch als dessen Kehrwert verwendet⁴⁰. Als Henry-Koeffizient wird auch der Zusammenhang zwischen der Gelöst-Gas-Konzentration und dem Molenbruch von Gasen in Flüssigkeiten bezeichnet^{44,48}:

$$x_1 = \frac{P_G}{H_{x_1}} \quad 1-10$$

1.3.3.5 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in reinem Wasser

Mit Gleichung 1-4 ergibt sich für die DO-Konzentration in reinem Wasser (bei konstantem Druck):

Tabelle 1-5: Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur (K)	Molarität (mol l ⁻¹)
273,15	0,460E-03
278,15	0,403E-03
283,15	0,357E-03
288,15	0,321E-03
293,15	0,291E-03
298,15	0,267E-03
303,15	0,247E-03
308,15	0,230E-03
313,15	0,217E-03
318,15	0,205E-03
323,15	0,196E-03
328,15	0,188E-03

Nachstehender Graph verdeutlicht den nichtlinearen Zusammenhang der in Tabelle 1-5 errechneten Beziehung zwischen Temperatur und DO-Konzentration.

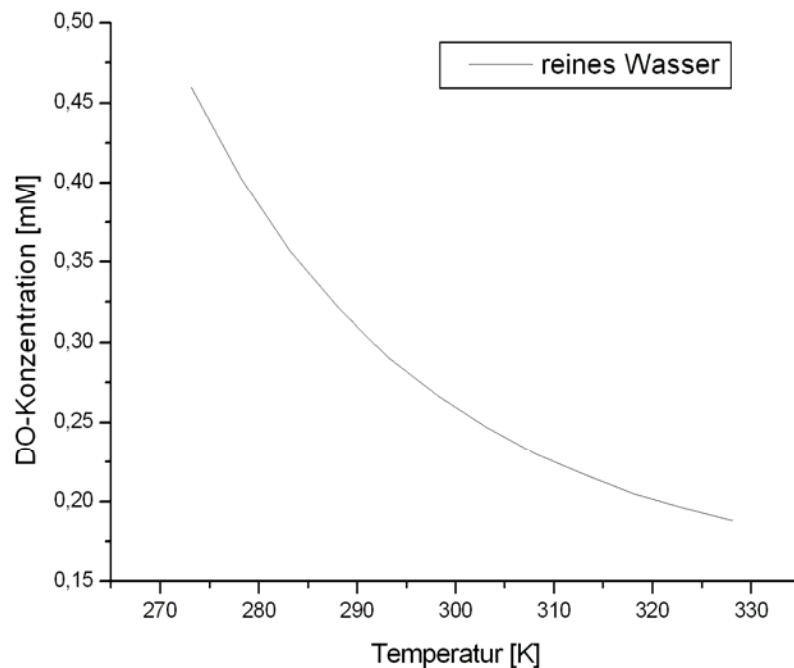


Abbildung 1-8: Abhängigkeit der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in reinem Wasser von der Temperatur.

Beim Betrieb von Lab-on-Chip-Systemen ist dieser physikalischen Eigenschaft besonders Rechnung zu tragen. Erwärmt man ein geschlossenes Fluidiksystem von Raum- auf Körpertemperatur, geht Sauerstoff aus der Flüssigkeit aus und führt zu – meist unerwünschten – Luftblasen im System.

1.3.3.6 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in isotoner Kochsalzlösung

Die Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in wässrigen Lösungen ist mit der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration von reinem Wasser über den Löslichkeitskoeffizienten q verknüpft⁴⁹:

$$q = \frac{c_i^F}{c_{H_2O}^F} \quad 1-11$$

Der Löslichkeitskoeffizient q bei einer bestimmten Temperatur einer wässrigen Lösung aus mehreren nicht-interagierenden Komponenten ergibt sich aus der Sechenov-Gleichung^{46,49,50}:

$$\log q = -\sum k_{s_i} c_i \quad 1-12$$

Mit der Sechenov-Konstante k_{s_i} :

$$k_{s_i} = (a + bT + cT^2) \quad 1-13$$

Einige ausgewählte Koeffizienten zur Berechnung der Sechenov-Konstante sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet⁴⁹.

Tabelle 1-6: Ausgewählte Koeffizienten zur Berechnung der Sechenov-Konstanten.

Lösung	a	b	c
KCl	-157397E-6	150629E-8	-11919E-9
NaCl	-159381E-6	86858E-8	0
MgCl ₂	-238222E-6	87600E-8	0

Die Sechenov-Konstante und der Löslichkeitskoeffizient für isotonische Kochsalzlösung (0,15 M NaCl) ergeben sich wie in nachfolgender Tabelle:

Tabelle 1-7: Sechenov-Konstante und Löslichkeitskoeffizient von isotonischer Kochsalzlösung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur (K)	Sechenov-Konstante (1)	Löslichkeitskoeffizient (1)
273,15	7,79E-02	0,972
278,15	8,22E-02	0,971
283,15	8,66E-02	0,969
288,15	9,09E-02	0,968
293,15	9,52E-02	0,966
298,15	9,96E-02	0,965
303,15	1,04E-01	0,963
308,15	1,08E-01	0,962
313,15	1,13E-01	0,960
318,15	1,17E-01	0,959
323,15	1,21E-01	0,957
328,15	1,26E-01	0,956

Die Tabelle zeigt, dass sich die DO-Konzentration in Kochsalzlösung mit zunehmender NaCl-Konzentration verringert. Dieser Effekt wird durch Temperaturerhöhung verstärkt. Mit Gleichung 1-12 ergibt sich für die DO-Konzentration in isotonischer Kochsalzlösung in Abhängigkeit von der Temperatur Tabelle 1-8.

Tabelle 1-8: Abhängigkeit der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in isotonischer Kochsalzlösung von der Temperatur.

Temperatur (K)	Molarität (mol l ⁻¹)
273,15	4,47E-04
278,15	3,91E-04
283,15	3,46E-04
288,15	3,11E-04
293,15	2,81E-04
298,15	2,58E-04
303,15	2,38E-04
308,15	2,21E-04
313,15	2,09E-04
318,15	1,97E-04
323,15	1,88E-04
328,15	1,80E-04

Graphisch dargestellt ergibt sich folgender Zusammenhang:

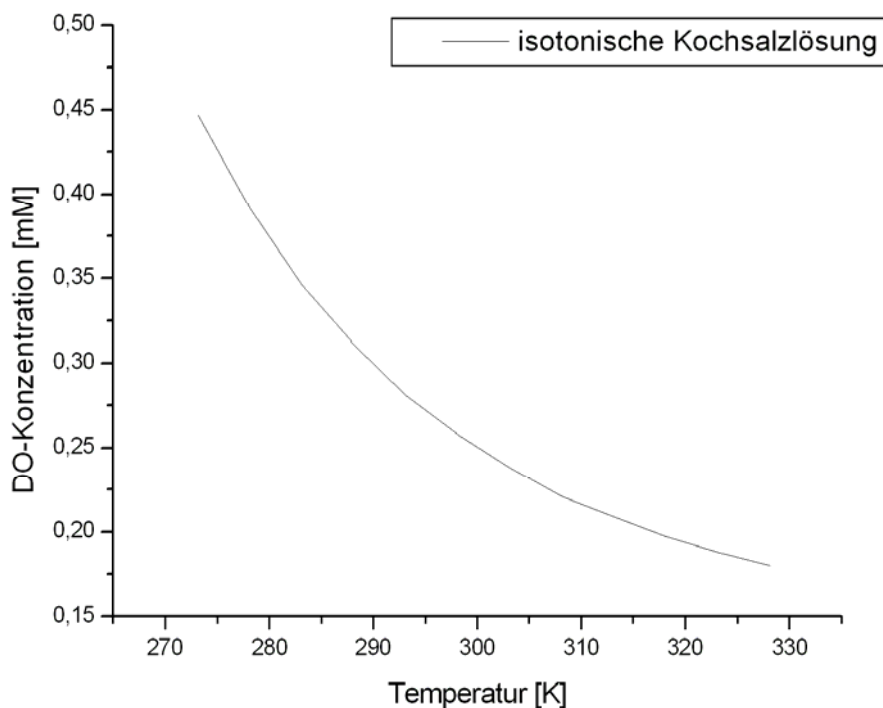


Abbildung 1-9: Gelöst-Sauerstoffkonzentration von isotonischer Kochsalzlösung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Nach Abbildung 1-9 ergibt sich bei 298,15 K (25°C) Raumtemperatur eine DO-Konzentration von 0,257 mM. Bei 310,15 K (37°C) Körpertemperatur ergibt sich eine DO-Konzentration von 0,215 mM. Dies bedeutet, dass sich die DO-Konzentration in isotonischer Kochsalzlösung bei einer Temperaturerhöhung um 12°C (Raumtemperatur auf

Körpertemperatur) um 16,3% verringert. Dies bedeutet auch, dass aufgrund dieser thermodynamischen Betrachtung bei Erwärmung einer isotonischen Kochsalzlösung in einem geschlossenen Behältnis (z.B. Fludikschlauch) von 25°C auf 37°C ca. 16% des Sauerstoffs ausgasen und in Form von Gasbläschen im Behältnis entstehen.

1.3.3.7 Gelöst-Sauerstoff-Konzentration in anderen Lösungen

Der Bunsensche Absorptionskoeffizient für die Löslichkeit von Sauerstoff in menschlichem Blut wird nach Battino et al.⁴³ mit folgender Gleichung im Bereich von 273 K bis 310 K beschrieben:

$$\ln \alpha_{BU} = 1,9685 - 0,018638 \left(\frac{T}{K} \right) \quad 1-14$$

Die Henry-Koeffizienten für einige organische Lösungen wie Methanol, Oktan oder Propanol wurden von Fischer et al.⁵¹ experimentell bestimmt.

1.3.4 Sauerstoffaustausch lebender Zellen

Der zelluläre Sauerstoffverbrauch einer menschlichen oder tierischen Zelle bewegt sich ungefähr zwischen $10^{-17} \frac{mol}{s}$ und $10^{-16} \frac{mol}{s}$. Diese Werte schwanken je nach Zelltyp und Differenzierungszustand der Zelle sehr stark⁵². Eine Übersicht über die unterschiedlichen Methoden, die Sauerstoff-Verbrauchsrate (englisch: *oxygen uptake rate* (OUR)) von Zellen zu ermitteln, wurden von Ruffieux et al.⁵³ erstellt. Einige Sauerstoff-Verbrauchsraten⁵⁴ sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 1-9: Sauerstoffverbrauchsraten verschiedener Zelltypen.

Zelltyp	OUR ($\frac{mol}{s}$)	Quelle
Tierische Zellkultur	$5.55 \cdot 10^{-17} \frac{mol}{s}$	Ducommun et al. ⁴⁷
Hybridom Zellkultur	$4.16 \cdot 10^{-17} \frac{mol}{s}$	Singh ⁵⁵
Menschliche Diploid Zellkultur	$1.38 \cdot 10^{-17} \frac{mol}{s}$	Ruffieux et al. ⁵³

Yamada et al.⁵⁶ zeigten allerdings auch, dass die OUR nicht nur vom Zelltyp abhängt, sondern auch linear mit der Zelldichte zusammenhängt.

Betrachtet man den humanen Körper, so ist der DO im menschlichen Blut eine Funktion des Sauerstoffbedarfs des Stoffwechsels (der Stoffwechsel wird nicht nur durch den DO limitiert). Dies zeigt sich z.B. durch erhöhte Atemfrequenz bei Anstrengungen. In diesem Zusammenhang wurde auch Erythropoetin (EPO) als Radfahrerdroge bekannt. EPO ist ein Wachstumsfaktor für die Bildung von roten Blutkörperchen die für den Sauerstofftransport verantwortlich sind.

.... No might nor greatness in mortality can censure scape; back-wounding calumny the whitest virtue strikes. What king so strong can tie the gall up in the slanderous tongue? But who comes here? ...

William Shakespeare- Measure for measure

2 Methoden zur Bestimmung der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration

Die DO-Bestimmung geht zurück bis ins Jahr 1888, in dem die so genannte Winkler Titration – eine chemische Methode – publiziert wurde⁵⁷. Winkler bezieht sich in seiner Arbeit auf Vorarbeiten von Bunsen und Schützenberger. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden verschiedene physikalische Messmethoden untersucht wie kartesische Taucher^{58,59} oder Vakuum-Extraktionsmethoden⁴⁸. Mitte des 20. Jahrhunderts wurden dann verschiedene elektrochemische Methoden, wie zum Beispiel die tropfende Quecksilberelektrode⁶⁰ oder der Mackereth-Sensor⁶¹, untersucht und publiziert. Die bekannteste ist hierunter wohl die Clark-Elektrode die 1959 von L.C. Clark patentiert wurde⁶¹. Ende des 20. Jahrhunderts wurde die so genannte „optische“ Fluoreszenz-Quenching-Messmethode von Wolfbeis untersucht und publiziert⁶². Etwa um die Jahrtausendwende wurden dann verschiedene magnetresonanzbasierte Methoden vorgestellt^{24,63}. Eine historische Betrachtung der Blut-Gas-Analyse wurde von Severinghaus et al.⁶⁴ publiziert. Im Folgenden wird ein Überblick über die verschiedenen Verfahren gegeben und ein Bezug zur Messung an biologischen Zellen hergestellt. Bei allen Verfahren ist eine konstante Umgebungstemperatur einzurichten, da Temperaturschwankungen zum einen die Messergebnisse verfälschen (siehe Kapitel: 1.3.3.6) und zum anderen bei Kultivierung der meisten biologischen Zellen eine konstante Temperatur von 310 K (wie im menschlichen Körper) erforderlich ist. Schwankungen im Luftdruck stören ebenfalls die Messung und sollten vermieden werden.

2.1 Chemische Bestimmung

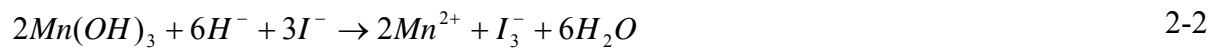
Die wichtigsten Varianten zur Bestimmung der DO-Konzentration mit chemischen Methoden werden hier kurz beschrieben. Solche Methoden dienen in diesem Zusammenhang allerdings nur zu Referenz- und Kalibrationszwecken, da es sich ausschließlich um Endpunktmessungen handelt. Lange Messzeiten und Störanfälligkeit gegenüber anderen Ionen oder Verbindungen sind weitere Nachteile der chemischen Bestimmung.

Da die chemische Bestimmung von DO immer die Entnahme einer Probe und deren Analyse beinhaltet, ist sie für Online-Analysen von Zellen oder Geweben nicht geeignet. Sie ist jedoch die Standard-Referenzmethode für die DO-Bestimmung und wird zu Kalibrations- und Evaluierungszwecken verwendet^{58,65,66}.

2.1.1 Bestimmung nach Winkler

Die Bestimmung des DO nach Winkler⁵⁷ ist eine normierte Standardmethode. Sie arbeitet nach dem so genannten iodometrischen Verfahren^{67,68}.

Bei dieser Methode wird Mn(II) in alkalischer Lösung zu Mn(III) oxidiert und als Mn(OH)₃ ausgefällt. Nach Ansäuern wird Iodid von Mn(III) zu Iod oxidiert und bestimmt^{48,61}.



2.1.2 Winkler-Titration

Das bei der Bestimmung nach Winkler anfallende Iod wird mit Thiosulfat titriert (d.h. die Menge des bis zum Farbumschlag zugegebenen Thiosulfats wird gemessen), bis die Lösung farblos wird. Hierbei entsprechen vier Thiosulfatmoleküle einem Sauerstoffmolekül.



Die ursprünglich von Winkler eingeführte Methode ist störanfällig gegenüber einigen Ionen und Verbindungen. Deshalb wurden einige Modifikationen eingeführt, die diese Interferenzen eliminieren^{48,69}.

2.1.3 Winkler-Spektrophotometrie

Mit Hilfe der Winkler-Spektrophotometrie kann die Konzentration des bei der Bestimmung nach Winkler anfallenden Iods durch dessen Lichtabsorptionsfähigkeit bestimmt werden⁷⁰. Obwohl nur I₂ durch die Winkler-Reaktion gebildet wird, misst die Spektrophotometrie I₂ und I₃. Durch geeignete Wahl der Wellenlänge lässt sich diese Verfälschung jedoch eliminieren⁷¹.

2.1.4 Spektrophotometrie (Kolorimetrie, Absorptionsphotometrie)

Hierbei werden Konzentrationsverhältnisse durch die Lichtabsorptionsfähigkeit bestimmter Ionen oder Verbindungen erfasst. Je nach Wahl der reduzierten Form und der Wellenlänge kann so der DO-Gehalt bestimmt werden⁴⁸.

2.2 Elektrochemische Bestimmung

Elektrochemische Methoden zur Bestimmung des DO basieren meist auf einer elektrochemischen Zelle, die in verschiedenen Variationen betrieben wird. Hierbei sind zumindest eine Arbeits- und eine Referenzelektrode vorhanden. Die Referenzelektrode wird so hergestellt, dass das über sie abfallende Potential möglichst unabhängig von äußeren Einflüssen (siehe Kapitel: 2.2.1) über einen möglichst langen Zeitraum konstant bleibt⁷². Somit ist gewährleistet, dass alle beobachteten Potentialänderungen aufgrund von elektrochemischen Vorgängen an der Arbeitselektrode entstehen.

2.2.1 Referenzelektroden, elektrochemisches Potential, Nernst-Gleichung

Referenzelektroden werden als Bezugssysteme für elektrochemische Messungen verwendet. Nach Sawyer et al.⁷³ soll eine ideale Referenzelektrode die folgenden fünf Eigenschaften besitzen:

- 1) Reversibilität und Nernstsches Verhalten
- 2) Langzeitstabilität über die Zeit
- 3) Keine Hysterese bei geringen Stromflüssen
- 4) Keine Löslichkeit der festen Phase (z.B. Ag/AgCl) im Falle von Referenzelektroden der zweiten Art
- 5) Keine Temperaturabhängigkeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenzelektroden der zweiten Art⁴⁰ verwendet. Dies sind Elektroden, bei denen der Spannungsabfall über die Konzentration eines Anions festgelegt wird. Meist werden Silberchlorid-Referenzelektroden verwendet. Hier ist das Anion Cl⁻. Referenzelektroden dienen bei elektrochemischen Messungen als Bezugssystem und sollen

ihren Spannungsabfall möglichst konstant halten. Die Normal-Wasserstoffelektrode ist die Standard-Referenzelektrode. In der Praxis werden jedoch meist einfach zu handhabende Elektroden, wie z.B. die Silberchloridelektrode oder die Kalomelektrode, verwendet.

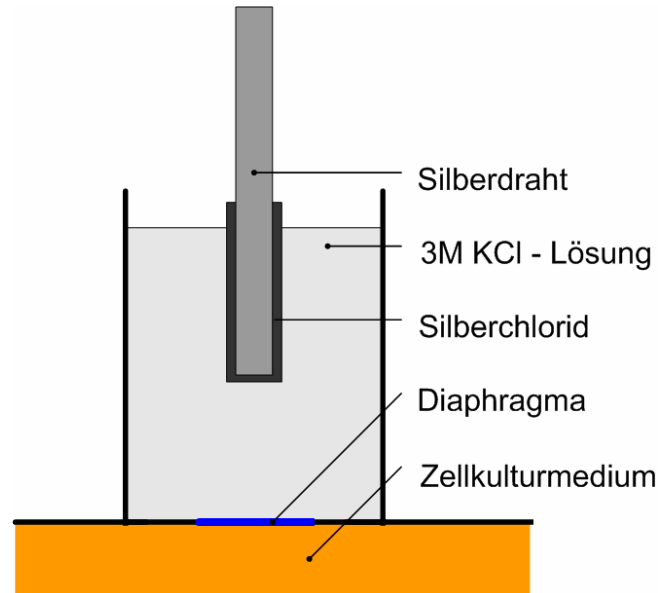


Abbildung 2-1: Prinzip einer Ag/AgCl-Referenzelektrode.

Die Abbildung zeigt das Funktionsprinzip der Silberchlorid-Referenzelektrode. Ein chlorierter Silberdraht taucht in eine – mit festem AgCl gesättigte – 3M KCl-Lösung. Das Diaphragma verhindert das Cl⁻-Ionen in das Zellkulturmedium diffundieren. So wird die potential- bestimmende Konzentration konstant gehalten. Das Redoxpotential ergibt sich nach folgender Herleitung^{40,72}:

Das chemische Potential einer reinen Substanz μ ist die auf 1 mol bezogene Gibbs-Energie G^X .

$$\mu_i = \frac{G_i}{n_i} \quad 2-5$$

Es gilt auch (mit der Konstanten μ_0 und der Aktivität a)⁷⁴:

$$\mu_i = \mu_0 + RT \ln a \quad 2-6$$

^x Die Gibbs-Energie (oder Freie Enthalpie) ist ein thermodynamisches Potential. Da alle chemischen Reaktionen den Gesetzen der Thermodynamik folgen, wurde sie definiert aus Enthalpie, Temperatur und Entropie (vgl. Grundlagen der Thermodynamik⁷⁴).

Zwei in chemischen Kontakt stehende Phasen A und B sind im Gleichgewicht, wenn gilt:

$$\mu_A = \mu_B \quad 2-7$$

Für die Beschreibung von Gleichgewichten, bei denen Ionen beteiligt sind, wurde das elektrochemische Potential $\tilde{\mu}$ eingeführt:

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi_i \quad 2-8$$

Mit

z_i Wertigkeit der Ionensorte

φ Elektrisches Potential

Für die Grenzfläche Ag/Ag^+ im Gleichgewicht gilt nun:

$$\mu_{0_{\text{Ag}}} + RT \ln a_{\text{Ag}} + F \varphi_{\text{Ag}} = \mu_{0_{\text{Ag}^+}} + RT \ln a_{\text{Ag}^+} + F \varphi_{\text{Ag}^+} \quad 2-9$$

Durch Umformung erhält man:

$$\varphi_{\text{Ag}} - \varphi_{\text{Ag}^+} = \frac{\mu_{0_{\text{Ag}^+}} - \mu_{0_{\text{Ag}}} - RT \ln a_{\text{Ag}}}{F} + RT \ln a_{\text{Ag}^+} \quad 2-10$$

Die Aktivität des Metalls wird gleich eins gesetzt⁷⁵. Somit ist die Potentialdifferenz nur von der Aktivität der Silberionen abhängig. Diese kann mit dem bekannten Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid (Gleichung 2-11) und Kenntnis der Reaktionsgleichung 2-12 durch die Chloridionen-Konzentration definiert werden.

$$K_L = a_{\text{Ag}^+} \cdot a_{\text{Cl}^-} \quad 2-11$$



Mit Einführung des Standard-Redoxpotentials für Ag/Ag^+ (Gleichung 2-13) ergibt sich Gleichung 2-14. Hier wurde die Aktivität durch die Konzentration der Chloridionen ersetzt

(siehe Kapitel 2.2.2). Gleichung 2-14 wird (im verallgemeinerten Fall) als Nernst-Gleichung bezeichnet.

$$E_{0_{Ag/Ag^+}} = \frac{\mu_{0_{Ag^+}} - \mu_{0_{Ag}} - RT \ln a_{Ag}}{F} \quad 2-13$$

$$E = E_{0_{Ag/Ag^+}} + \frac{RT}{F} \ln K_L - \frac{RT}{F} \ln c_{Cl^-} \quad 2-14$$

Mit

E:	Redoxpotential	T:	Temperatur
E ₀ :	Standard-Redoxpotential	K _L :	Löslichkeitsprodukt
R:	Gaskonstante	c _{Cl} :	Chloridionen-Konzentration
F:	Faraday-Konstante		

Das Redoxpotential der Silberchlorid-Referenzelektrode ist konstant bei konstanter Chloridionen-Konzentration. Bei 25°C ergibt sich mit dem Ag/Ag⁺-Standard-Redoxpotential von 0,7991 V⁷⁶, dem Löslichkeitsprodukt von AgCl von 1,78E-10⁷⁴ und einer Chloridionen-Konzentration von 3 M ein Redoxpotential von 0,1943 V gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode. Bei 37°C ergibt sich ein Redoxpotential von 0,1700 V gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode (ohne Temperaturanpassung des Standard-Redoxpotentials und des Löslichkeitsprodukts). Am Übergang zwischen der 3 M KCl-Lösung im Elektrolyten und dem 0,15 M isotonischen Messmedium ergibt sich nach der Donnan-Gleichung^{XI} ein weiterer Potentialsprung von 76,9 mV bei 25°C und 80,0 mV bei 37°C.

Die Herstellungsmethode sowie die Lagerung und das Alter von Referenzelektroden haben Einflüsse auf die Langzeitstabilität und das Rauschen von Referenzelektroden⁷⁷. Dies bedeutet, dass Referenzelektroden nach definierten Bedingungen hergestellt, sorgfältig gelagert und regelmäßig erneuert werden müssen.

Seit längerem wird versucht, für Lab-on-chip-Systeme Referenzelektroden zu miniaturisieren⁷⁸⁻⁸⁰. Dies würde eine erhebliche Vereinfachung der Messsysteme sowie eine Kostenreduzierung bedeuten. Matsumoto et al.⁸¹ entwickelten eine Quasi-Referenzelektrode in Dünnschichttechnik für einen Single-chip-Glukosesensor. Huang et al.⁷⁷ fertigten eine miniaturisierte Referenzelektrode zweiter Art für ISFET-Anwendungen. Cranny und

^{XI} Das Donnan-Potential entsteht zwischen zwei Lösungen, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind und unterschiedliche Ionenkonzentrationen besitzen.

Atkinson⁸² entwickelten eine planare Referenzelektrode in der kostengünstigen Dickschichttechnik. Sun und Wang⁸³ zeigten eine elektrochemische Methode, um planare Referenzelektroden herzustellen. Lee und Sohn^{84,85} stellten eine auf einen Feldeffekttransistor basierende Referenzelektrode vor. Schon 1989 stellten Bergveld et al.⁸⁶ (Abbildung 2-2⁸⁷) die Verwendung einer Quasi-Referenzelektrode für die pH-Messung vor. Hierbei wird ein nicht-pH-sensitiver Referenz-FET (REFET) als Bezugssystem verwendet.

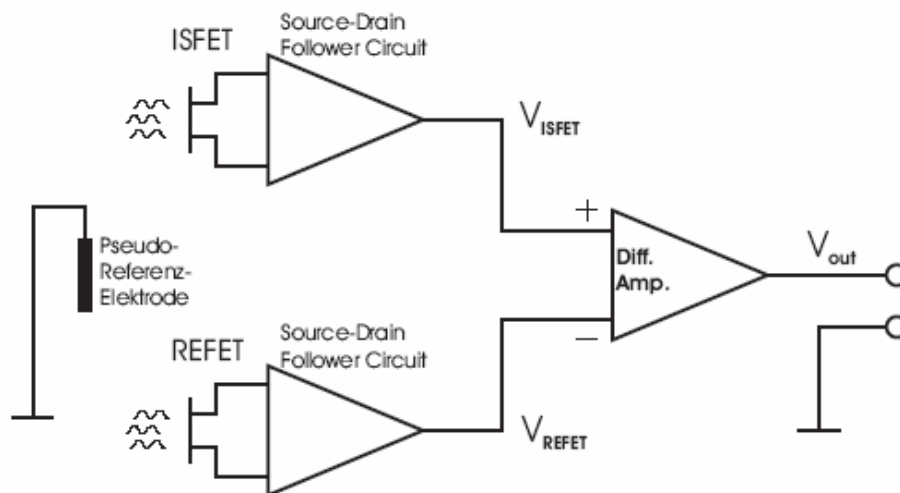


Abbildung 2-2: Prinzip einer pH-Messung mit einem REFET und einer Pseudo-Referenz-Elektrode (nach Bergveld et al.⁹¹).

Bei einem solchen Aufbau ist die Ausgangsspannung des ISFET abhängig vom pH-Wert und dem Potential an der Pseudoreferenzelektrode. Die Ausgangsspannung des REFET ist nur abhängig vom Potential der Pseudoreferenzelektrode. Durch Subtraktion der beiden Werte lassen sich sowohl Schwankungen an der Pseudoreferenzelektrode als auch Veränderungen von externen Parametern (die auf beide Transistoren einwirken) wie Temperatur, Licht oder Alterung eliminieren.

2.2.2 Amperometrie

Die amperometrische Methode bedeutet, dass an einer elektrochemischen Zelle eine konstante Polarisationsspannung angelegt wird und der daraus resultierende Strom bestimmt wird. Bei einer bestimmten Spannung (siehe Abbildung 2-4) wird die Konzentration des DO gemessen. Das Äquivalent zum gemessenen Strom ist die so genannte Aktivität. Diese stimmt bei sehr verdünnten Lösungen mit der Konzentration überein⁵⁰:

$$a_i = f_i c_i$$

Mit

- a_i : Aktivität
- f_i : Aktivitätskoeffizient
- c_i : Konzentration

Eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten wurden bereits in der Fachliteratur vorgestellt^{48,88-93}. Hier soll eine 3-Elektroden-Variante, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, beschrieben werden.

Nachfolgende Abbildung zeigt das Prinzip der amperometrischen Methode. Hierbei wird zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode ein konstantes Potential U_{IN} eingestellt, das die nachfolgend beschriebenen elektrochemischen Reaktionen erzwingt. Die Zusatz- oder Hilfselektrode dient hierbei als Stromgeber und sorgt dafür, dass sich das konstante Potential über der Referenzelektrode nicht durch den Stromfluss verschiebt. Gelegentlich wird zusätzlich eine so genannte Guard-Elektrode verwendet, die zum einen Störströme im Elektrolyten abdämpfen und zum anderen die Abscheidung von Silberionen auf der Arbeitselektrode verhindern soll⁹⁴.

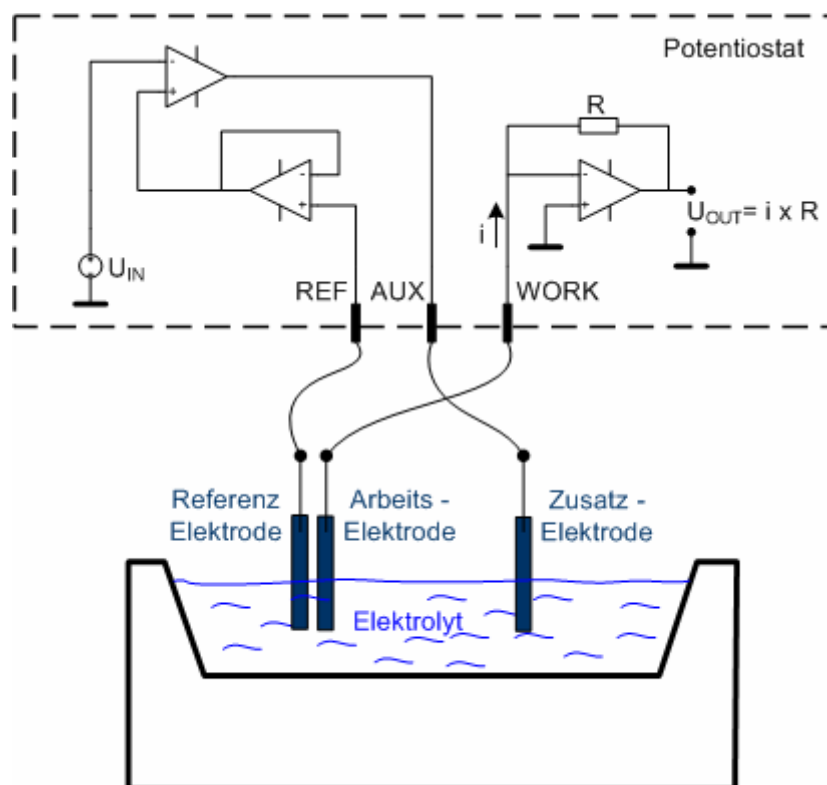


Abbildung 2-3: Prinzip einer 3-Elektroden amperometrischen Messschaltung.

Der resultierende Strom wird über einen Strom-/Spannungswandler an der Arbeitselektrode umgewandelt und kann so weiterverarbeitet werden. Es ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen Stromstärke und DO in der Lösung. Der Reaktionsweg zeigt eine Abhängigkeit vom pH-Wert. Nach Hamann et al.⁷⁵ ergeben sich folgende Reaktionen (mit ihrem Standard-Redoxpotential^{XII}):

In saurer Lösung ergibt sich die direkte Reduktion zu:



Mit zwei Reaktionsschritten:



In alkalischer Lösung ergibt sich die direkte Reduktion zu:



Mit zwei Reaktionsschritten:



Der optimale Wert des Potentials U_{IN} wird durch eine Voltametrie^{76,95} ermittelt. Hierbei werden unterschiedliche Spannungen eingestellt und der resultierende Strom gemessen. Diese Prozedur wird mit Kalibrationslösungen durchgeführt. In Abbildung 2-4 wurde eine Voltametrie mit sauerstoffgesättigtem *phosphat buffered saline* (PBS, Sigma) und sauerstoffverarmten PBS durchgeführt. Es wurde ein Messaufbau wie in Abbildung 2-3 verwendet, wobei die Anschlüsse REF und AUX kurzgeschlossen wurden. Bei -700 mV ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen sauerstoffverarmten (rot) und

^{XII} Das Standard-Redoxpotential beschreibt das Potential einer elektrochemischen Halbzelle gegenüber der Normal-Wasserstoffelektrode.

sauerstoffgesättigtem Medium (schwarz). Am Wendepunkt der I/U-Kurve wird der Arbeitspunkt gewählt.

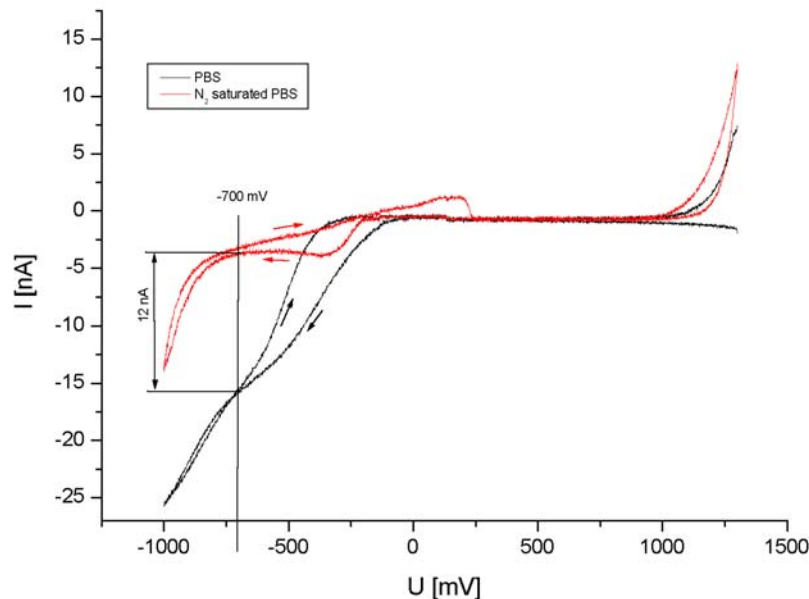


Abbildung 2-4: Voltammetrie (Messaufbau wie Abbildung 2-3) an einem O_2 -FET (Edelmetallelektrode vs. Ag/AgCl). Der ideale Arbeitspunkt ergibt sich zu -700mV .

Der Großteil der amperometrischen Sauerstoffsensoren ist mit einer gaspermeablen Membran bedeckt. Allerdings hat es sich in einigen Anwendungsgebieten gezeigt, dass auf diese Membran auch verzichtet werden kann⁹⁶.

Nachteilig an membranbedeckten Sauerstoffsensoren ist, dass sie den Partialdruck in der Flüssigkeit und nicht die Gelöst-Sauerstoff-Konzentration messen⁴¹. Der Zusammenhang zwischen Partialdruck und Gelöst-Gas-Konzentration wurde in Kapitel 1.3.3 beschrieben. Die elektrochemischen Hintergründe der Sauerstoffmessung und die verwendbaren Elektrodenmaterialien wurden kürzlich umfassend von L'Her⁹⁷ diskutiert. Dieser Arbeit zu Folge ist Platin als Elektrodenmaterial vorzuziehen.

2.2.2.1 Sensoren ohne gaspermeable Membran

Membranfreie Sauerstoffsensoren können verwendet werden, wenn die Messlösung keine störenden, beim Arbeitspotential U_{IN} elektrochemisch aktiven Verbindungen sowie eine konstante Ionenzusammensetzung bei der Messungen relativer Änderungen enthält⁹⁸. Untersuchungen zur Zuverlässigkeit von membranfreien Sauerstoffsensoren wurden von Tang⁹⁹ und Züllig⁹⁶ durchgeführt. Vorteilhaft an dieser Variante ist, dass die Diffusion des

Sauerstoffs an die Elektrodenoberfläche nicht durch eine Membran behindert und die Herstellung vereinfacht wird. Nachfolgende Abbildungen zeigen zwei Sauerstoffsensoren ohne gaspermeable Membran. Abbildung 2-5 zeigt einen in nMOS-Technik gefertigten Silizium-Sauerstoffsensor¹⁰⁰. Abbildung 2-6 zeigt einen auf Glas gefertigten Sauerstoffsensor. Die Variante in Abbildung 2-6 ist vorzuziehen, da sie größere Symmetrieeigenschaften besitzt⁹⁴. Außerdem wäre es optimaler, runde Strukturen zu verwenden, da diese den Quotienten von Elektrodendurchmesser zu Elektrodenfläche verringern und somit zur Verringerung des Rauschens beitragen. Das Rauschen an der Elektrolyt-Elektroden-Grenzfläche einer AgCl-Referenzelektrode ergibt sich durch nachstehende Gleichung⁹⁴.

$$S_v(f) = \frac{4kTk_1}{Af [c_{Cl^-}]} + \frac{4kTk_2d}{\sqrt{A} [c_{Cl^-}]} \quad 2-22$$

Mit:

$S_v(f)$	Rauschen	A	Elektrodenfläche
k_1, k_2	Konstanten	d	Elektrodendurchmesser
k	Boltzmann-Konstante	c_{Cl^-}	Chloridionenkonzentration
T	Temperatur		

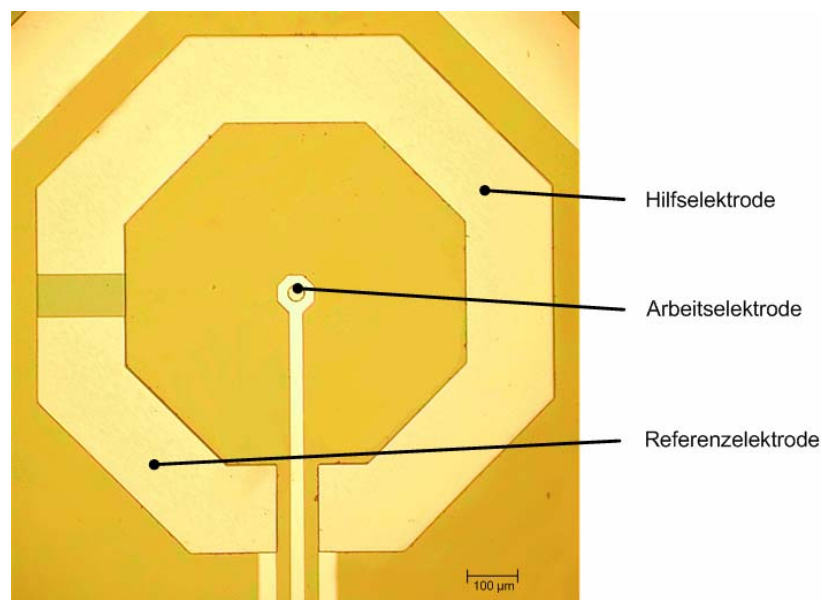


Abbildung 2-5: Amperometrischer Sauerstoffsensor (ohne Membran) in Siliziumtechnologie. Der Durchmesser des mit dem Messmedium in Kontakt stehenden Bereichs der Arbeitsselektrode beträgt 30μm.

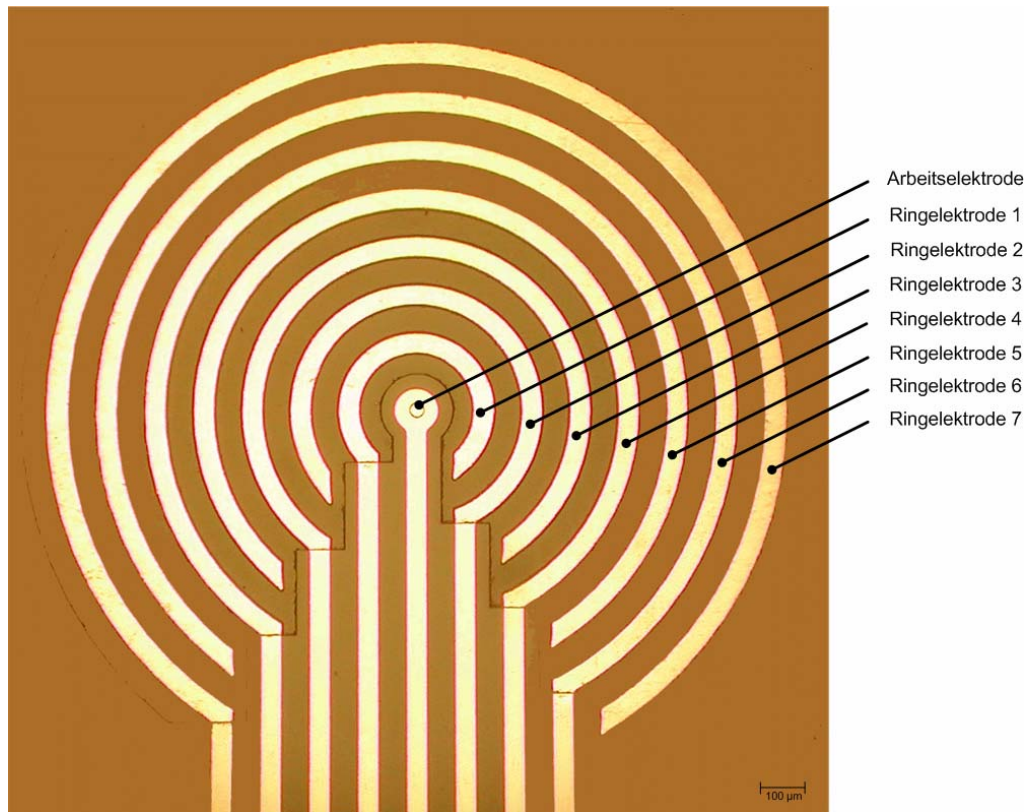


Abbildung 2-6: Amperometrische Sauerstoffsensor-Teststruktur (ohne Membran) in Dünnschicht-Technologie auf Glas. Der Durchmesser des mit dem Messmedium in Kontakt stehenden Bereichs der Arbeitselektrode beträgt 30μm. Die Ringelektroden 1 bis 7 können wahlweise als Referenz- oder Hilfelektrode beschalten werden.

Durch eine Veränderung in der Geometrie kann die amperometrische Methode auch räumlich aufgelöst angewandt werden. Wird die Arbeitselektrode als kleine Nadel ausgeführt und auf einem Mikromanipulator gelagert erhält man die so genannte „abtastende elektrochemische Mikroskopie“ (englisch: *scanning electrochemical microscopy* (SECM)). Diese Methode wurde auch an lebenden Zellen angewandt^{90,101-103}. Die amperometrische DO-Messung wird auch *in vivo* angewandt¹⁰⁴. Mit dem pO₂-Histograph (Eppendorf, Hamburg) kann eine Goldelektrode mit einem Durchmesser von 300μm in 1mm-Schritten durch Gewebe bewegt werden, womit eine örtliche aufgelöste DO-Bestimmung *in vivo* möglich wird¹⁰⁵. Verschiedene Varianten amperometrischer DO-Sensoren wurden publiziert. Hierbei wird meist die Arbeitselektrode modifiziert, um Störeinflüsse anderer Ionen zu verringern oder die Langzeitstabilität zu erhöhen, zum Beispiel durch Kobalt¹⁰⁶ oder Vitamin B₁₂¹⁰⁷ basierte Moleküle. Nei et al. stellten einen günstigen Gelöst-Sauerstoff-Sensor vor, der eine Nicht-Edelmetall-Arbeitselektrode vorsieht¹⁰⁸.

2.2.2.2 Sensoren mit gaspermeabler Membran

Membranbedeckte Sensoren¹⁰⁹ wurden von Linek et al.¹¹⁰ und Berntsson et al.⁶⁵ evaluiert und von Gavaghan et al.¹¹¹⁻¹¹⁴ umfassend numerisch simuliert. Durch die Wahl einer geeigneten sauerstoffpermeablen Membran kann verhindert werden, dass Ionen oder chemische Verbindungen die elektrochemischen Reaktionen an den Elektrodenoberflächen beeinträchtigen. Außerdem ist garantiert, dass das Potential der Referenzelektrode aufgrund einer definierten Elektrolytzusammensetzung stabil bleibt. Hierdurch kann eine höhere Spezifität, größere Stabilität und längere Lebensdauer des Sauerstoffsensors erreicht werden. Amperometrische DO-Sensoren sind zur Messung der zellulären Atmung etabliert und werden in unterschiedlichen Systemen^{90,98,115-119} verwendet. Untersuchungen zu den unterschiedlichen Elektrodenmaterialien und zu Vergiftungserscheinungen wurden von Hitchman⁴⁸, Hoare¹²⁰ und Hahn^{121,122} durchgeführt.

2.2.3 O₂-FET-Methode

Der so genannte O₂-FET¹²³⁻¹²⁶ ist eine Kombination aus einem amperometrischen Sauerstoffsensor und einem pH-Sensor. Das Funktionsprinzip lässt sich anhand von Gleichung 2-19 erklären.

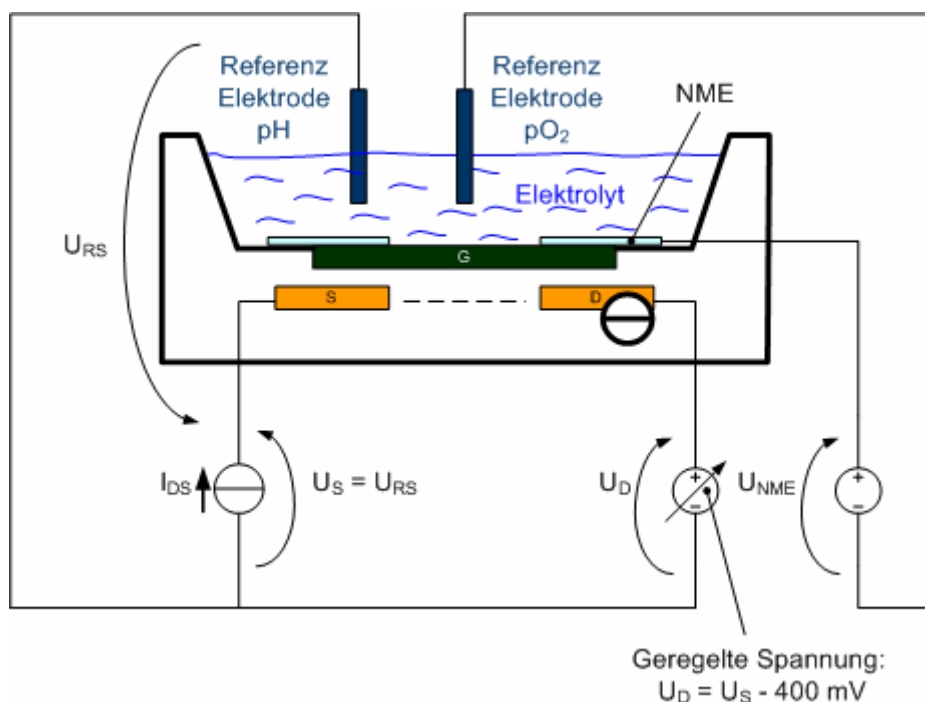


Abbildung 2-7: Funktionsprinzip des O₂-FET (NME steht für *noble metal electrode*, deutsch: Edelmetallelektrode).

Während bei der amperometrischen Messung die Ladungsmenge, die durch die Grenzfläche Arbeitselektrode/Elektrolyt fließt, gemessen wird, wird beim O₂-FET zusätzlich die Verschiebung des pH-Werts durch die Produktion des Hydroxids gemessen (siehe chemische Gleichungen in Kapitel 2.2.2). Durch An- und Abschalten der Spannung des amperometrischen Sensorteils kann die elektrochemische Reaktion an- und abgeschaltet werden. So ist es möglich, die Sauerstoffumsetzung auszuschalten. Dadurch wird der O₂-FET zu einem pH-Sensor. Durch geeignete Wahl der Spannung am amperometrischen Sensorteil kann quasi gleichzeitig der pH-Wert und die DO-Konzentration gemessen werden. Die Funktionsweise des pH-ISFETs ist in einem eigenen Unterkapitel (siehe Kapitel: 2.2.3.1) beschrieben. Das Prinzip des O₂-FETs ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Wie beschrieben, wird durch Anlegen der Polarisationsspannung zwischen NME und einer Referenzelektrode der pH-Wert im Elektrolyten verändert. Diese Änderung wird am Gate des ISFETs gemessen. Nachfolgende Abbildung zeigt einen O₂-FET in Siliziumtechnologie, der in Zusammenarbeit vom Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik und dem Lehrstuhl für Technische Elektronik der TU München¹⁰⁰ hergestellt wurde.

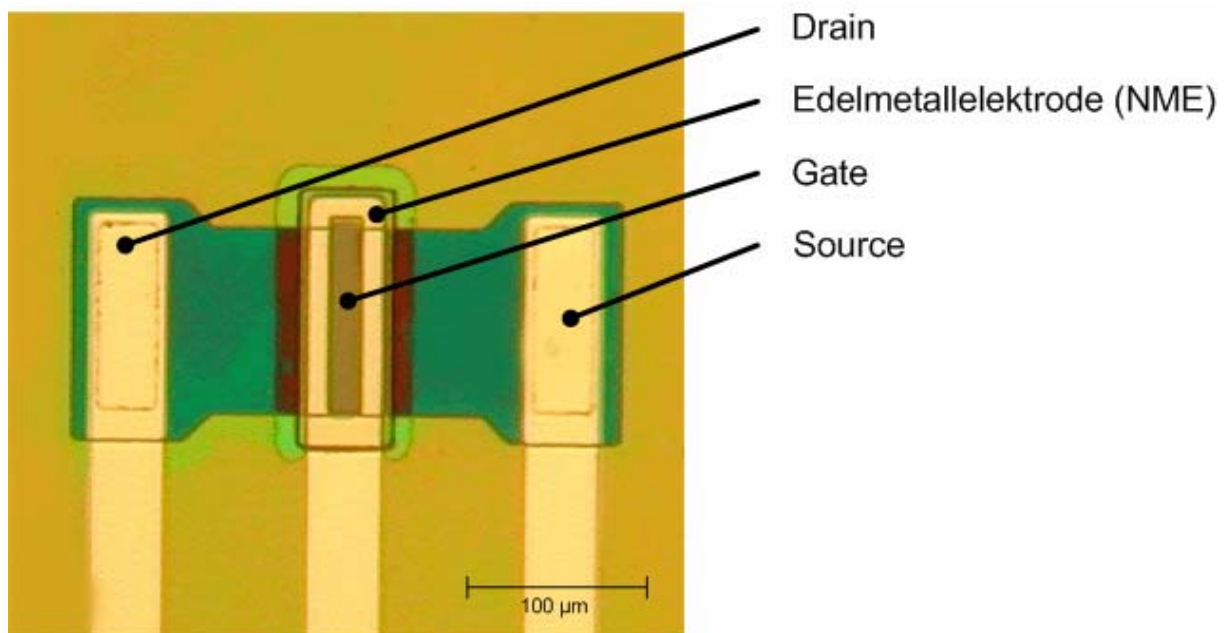


Abbildung 2-8: O₂-FET in Siliziumtechnologie (Quelle: Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik¹⁰⁰).

O₂-FETs werden bisher nicht standardmäßig zur Messung der zellulären Atmung (und der extrazellulären Ansäuerung) verwendet. Der Grund hierfür ist der hohe Herstellungsaufwand

und noch nicht gelöste Probleme in der Herstellungsqualität. Die Funktionsfähigkeit wurde jedoch mehrfach gezeigt^{95,123,127}.

Die Möglichkeit, quasi-gleichzeitig DO und pH an einem Mikropot zu messen, hat eine große Bedeutung in der Sensorik. So kann ein amperometrisches Spektrometer betrieben werden, mit dem es zusätzlich möglich ist, Menge und Redox-Potential von Oxoniumionen in unterschiedlichen elektrochemischen Reaktionen zu bestimmen.

2.2.3.1 pH-ISFET

Der ionensensitive Feldeffekttransistor (ISFET) wurde unter anderen von Bergveld^{128,129} vorgestellt und seither vielfach untersucht¹³⁰⁻¹³⁵ und abgewandelt¹³⁶⁻¹³⁸. Betrieben wird der ISFET vorzugsweise mit der so genannten Sourcefolger-Schaltung. Hierbei wird der Feldeffekttransistor kontinuierlich in einem festen Arbeitspunkt gehalten, so dass nur die Potentialänderung zwischen dem Gate und dem Elektrolyten erfasst wird. Das Potential des Elektrolyten wird an der Referenzelektrode abgegriffen.

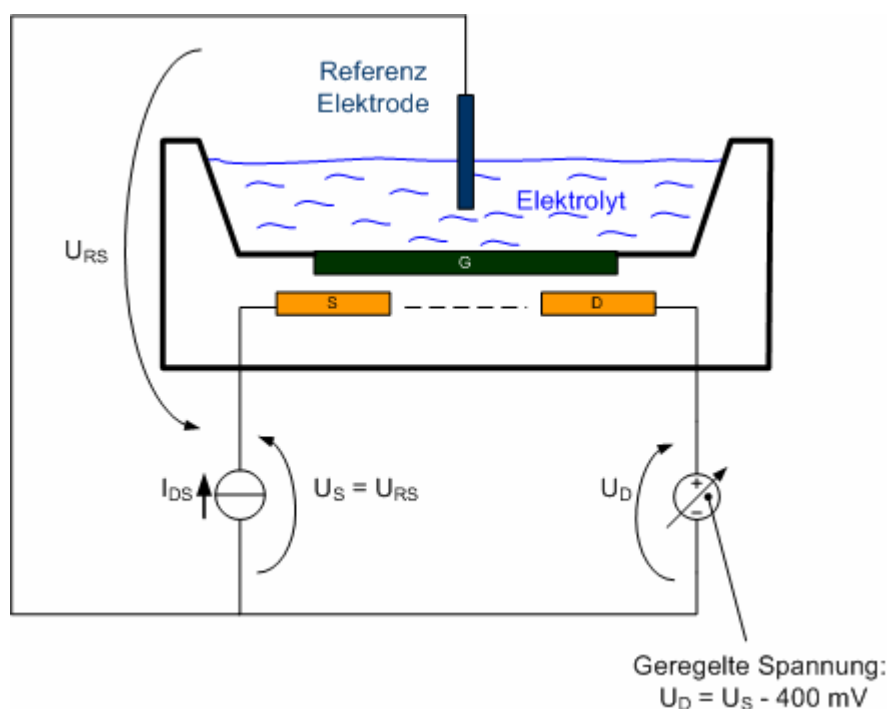


Abbildung 2-9: Funktionsprinzip des ISFET.

Die Messgröße am ISFET ist die Spannung U_S , die, wie in Abbildung 2-9 ersichtlich, gleich U_{RS} ist. Für U_{RS} ergibt sich nach dem Gesetz von Kirchhoff folgende Maschenregel:

$$U_{RS} + U_{SG} + U_{GE} + U_{ER} = 0$$

2-23

Mit

U_{SG} : Spannung zwischen Source (S) und Gate (G)

U_{GE} : Spannung zwischen Gate und Elektrolyt

U_{ER} : Spannung zwischen Elektrolyt und Referenzelektrode

Mit der verwendeten Sourcefolger-Schaltung wird ein konstanter Strom I_{DS} (Strom zwischen Drain (D) und Source (S)) und eine konstante Spannung U_{DS} (Spannung zwischen D und S) eingestellt. Dies führt dazu, dass der Feldeffekttransistor in einem konstanten Arbeitspunkt gehalten wird, wodurch folglich auch U_{SG} konstant sein muss.

Durch die Verwendung einer Referenzelektrode wird gewährleistet, dass das Potential des Elektrolyten konstant gehalten wird. Somit ist auch U_{ER} konstant.

Da U_{DS} und U_{ER} konstant bleiben, ergibt sich die Ableitung von 2-23 zu:

$$\frac{\partial U_{RS}}{\partial t} + \frac{\partial U_{GE}}{\partial t} = 0$$

2-24

Somit ist eine Änderung der Messspannung $U_S (= U_{RS})$ gleich der Änderung des Potentials zwischen Elektrolyt und Gate. Ein pH-ISFET besitzt ein Gate-Isolator-Material, das selektiv Protonen aus der Messlösung binden kann. Die Abhängigkeit dieses Potentials vom pH-Wert wird durch das Site-Binding-Modell^{132,134,139} beschrieben. Für komplexe Zusammenhänge lässt sich jedoch kein analytischer Ausdruck finden. Solche Gegebenheiten lassen sich momentan nur numerisch lösen¹⁰⁰.

2.2.4 Potentiometrie

Bei der potentiometrischen Messmethode wird an einer elektrochemischen Zelle (ohne Anlegen einer Polarisierungsspannung) die entstehende Spannung gemessen. Hierbei ist ein sehr hochohmiges Messgerät zu verwenden, da kein Stromfluss – im Gegensatz zur amperometrischen Methode – erlaubt wird.

Alle (ionensensitiven) potentiometrischen Elektroden¹⁴⁰ erfüllen die Nernst-Gleichung^{40,75}.

Das Redoxpotential ergibt sich zu:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

Mit:

E_0	Standard Redoxpotential
R	Allgemeine Gaskonstante
T	Temperatur
n	Stoffmenge
F	Faraday-Konstante
a_{Ox}, a_{Red}	Aktivitäten der beteiligten Substanzen

Beispiele für potentiometrische Gelöst-Sauerstoff-Sensoren sind die tropfende Quecksilberelektrode, sowie metalloxidbasierte oder feldeffekttransistorbasierte Varianten¹⁴¹.

2.2.5 Redoxpotential

Bei der Bestimmung des DO über das Redoxpotential wird eine elektrochemische Zelle wie in nachfolgender Abbildung aufgebaut. Der Spannungsabfall zwischen Arbeitselektrode und Elektrolyt hängt hierbei von der Konzentration des DO im Elektrolyten ab^{60,141,142}.

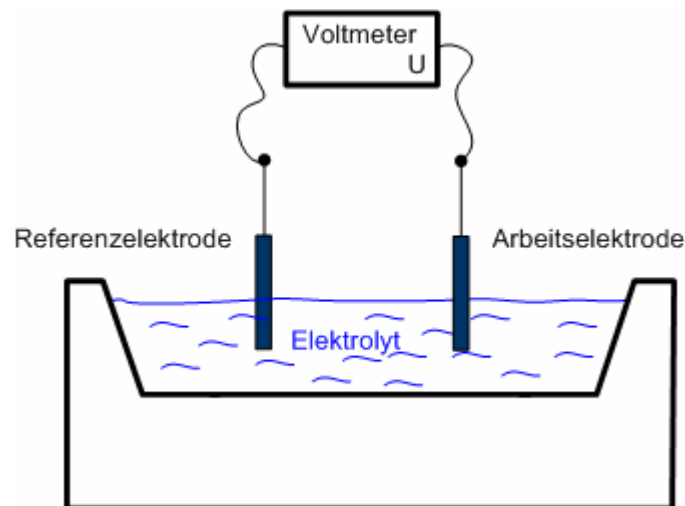


Abbildung 2-10: Funktionsprinzip eines potentiometrischen Sensors. Über eine Referenzelektrode wird das Potential des Elektrolyten definiert. Mit einem Voltmeter wird die Spannungsänderung aufgezeichnet, die zwischen Arbeitselektrode und Elektrolyt auftritt.

Der elektrochemischen Gleichgewichtsreaktion (2-16) kann ein Nernst-Potential zugeordnet werden. Diese Reaktion ist dabei potentialbestimmend, da sie den größten Austauschstrom^{XIII} repräsentiert⁷⁴. Das Nernst-Potential hängt vom pH-Wert und vom DO ab.

2.3 Optische Bestimmung

Methoden zur optischen Bestimmung von DO basieren auf fluoreszierenden Mikrosports, die in Abhängigkeit des DO ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern. Solche Sensoren sind erhältlich mit an der Spitze von Glasfasern montierten Sensorspots. Es ist allerdings auch möglich, die entsprechende Tinktur zu erwerben und Sensorspots an optisch geeignetem Material anzubringen. So ergibt sich die Möglichkeit, Lab-on-chip-Systeme auf Glaträgern mit derartigen Sensoren auszustatten.

2.3.1 Fluoreszenz, Lumineszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft eines Atoms oder Moleküls, ein Photon zu absorbieren und später mit niedriger Energie wieder zu emittieren¹⁴³. Die Fluoreszenz ist eine besondere Art der Lumineszenz. Die Lumineszenz ist die optische Strahlung eines physikalischen Systems, die beim Übergang von einem angeregten Zustand zum Grundzustand entsteht¹⁴⁴.

Optische DO-Sensoren werden meist aus rutheniumbasierten Fluoreszenzkomplexen¹⁴⁵, aus Porphyrin-Farbstoffen¹⁴⁶ oder aus Derivaten von Pyrenen¹⁴⁷ hergestellt. Dabei werden zwei Messmethoden angewendet. Zum einen wird die Intensität der Fluoreszenz¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ gemessen, zum anderen wird die Abklingzeit der Fluoreszenz^{146,151-153} ermittelt. Es werden auch Referenzfarbstoffe verwendet, die nicht DO-abhängig sind. Damit wird versucht einen Störeffekt durch das Ausbleichen der Farbstoffe zu eliminieren. Die Signaländerung, die durch den Ausbleichvorgang verursacht wird, kann mit mathematischen Methoden von den Änderungen, verursacht durch die DO-Konzentration, herausgerechnet werden¹⁴⁸.

^{XIII} Fließt in einer elektrochemischen Zelle kein Strom, bildet sich das Elektrodenpotential aus den Standard-Elektrodenpotentialen oder Standard-Redoxpotentialen (vgl. Kapitel 2.2.2) der beiden Halbzellen aus. Verändert man dieses Potential durch eine extern angelegte Spannung, – der so genannten Überspannung, – fließt ein Strom, der so genannte Austauschstrom.

2.3.1.1 Intensität der Fluoreszenz

Ein absorbiertes Photon kann durch Stoßlöschung (englisch: *quenching*) mit DO-Molekülen seine Energie langsam und strahlungslos abgeben. Der Grad der Stoßlöschung hängt von der DO-Konzentration ab.

Der Zusammenhang zwischen der Intensität der Fluoreszenz und der DO-Konzentration ist nicht-linear und wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{I_R}{I_{R,0}} = \frac{1}{1 + k_{SV} \cdot c_{O_2}} \quad 2-26$$

Mit

$I_{R,0}$	Fluoreszenz-Intensität in Abwesenheit von Sauerstoff
I_R	Fluoreszenz-Intensität bei der Gelöst-Sauerstoff-Konzentration c_{O_2}
k_{SV}	Stern-Volmer-Parameter

2.3.1.2 Abklingzeit der Fluoreszenz

Die Abklingzeit gibt an, wie lange es dauert, bis (nach einem absorbierten Lichtimpuls sehr kurzer Dauer) die Intensität der Fluoreszenz um $1/e$ abgenommen hat. Sie hängt vom Grad der Stoßlöschung und somit von der DO-Konzentration ab. Die Abklingzeit kann aus der Phasenverschiebung des emittierten und absorbierten Lichtstrahls ermittelt werden:

$$\tan(\phi) = 2 \cdot \pi \cdot f \cdot \tau \quad 2-27$$

Mit

ϕ	Phasenverschiebung
f	Frequenz
τ	Abklingzeit in der Anwesenheit von Sauerstoff

Der Zusammenhang zwischen Abklingzeit und DO-Konzentration wird in vereinfachter Form durch Gleichung 2-28 wiedergegeben.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot c_{O_2}$$

Mit

τ_0 Abklingzeit in der Abwesenheit von Sauerstoff

k_q Quenching-Konstante

In jüngerer Vergangenheit wurden auch optische DO-Sensoren zur Beobachtung der zellulären Atmung verwendet^{146,148,154}.

Die Verwendung optischer Sensoren ist dort von Vorteil, wo starke elektromagnetische Felder den Einsatz elektrochemischer Sensoren behindern. Solche Sensoren können in planarer Spot-Technologie oder Faser-Technologie aufgebaut werden, wobei Faserspitzen bis zu einem Durchmesser von 50 μm bekannt sind.

2.4 Magnetische Bestimmung

Magnetische Methoden zur DO-Bestimmung detektieren Änderungen in Spineigenschaften von Teilchen. Eine DO-Abhängigkeit wird entweder durch die paramagnetischen Eigenschaften von Sauerstoff oder durch die Zugabe von Kontrastmitteln erreicht. Diese Methoden werden bisher nicht in Lab-on-chip-Systemen realisiert.

2.4.1 Overhauser-Verstärkungs-Magnetresonanztomographie

Die Kernspintomographie oder synonym Magnetresonanztomographie (englisch: *magnetic resonance imaging* (MRI)) basiert auf der Kernspinspektroskopie oder synonym Kernresonanzspektroskopie (englisch: *nuclear magnetic resonance* (NMR)) und nutzt den Effekt, dass Atomkerne durch den Spin der Protonen und Neutronen ein magnetisches Moment erhalten. Bei der Overhauser-Verstärkungs-MRI⁶³ wird ein Kontrastmittel beigegeben. Der Verstärkungsfaktor dieses Kontrastmittels kann von der DO-Konzentration abhängig sein. Damit wird es möglich, 3D-Aufnahmen der DO-Konzentration zu erzeugen.

2.4.2 Elektronenparamagnetische Resonanz

Die elektronenparamagnetische Resonanz (englisch: *electron paramagnetic resonance imaging* (EPRI)) nutzt im Gegensatz zur NMR die magnetischen Eigenschaften von ungepaarten Elektronen¹⁵⁵. Auch bei dieser Methode werden Kontrastmittel verwendet, um den DO detektieren zu können⁶³.

2.5 Andere Methoden

Einige andere Methoden zur Messung des Gelöst-Sauerstoffs in Flüssigkeiten wurden publiziert^{48,61,156,157}. So wird beschrieben, wie der DO aus einer nicht-definierten Flüssigkeit entfernt, dann in eine definierte Lösung gebracht und dort bestimmt wird. Auch ist es möglich, Änderung in der DO-Konzentration über Druck- bzw. Volumenänderungen zu detektieren (Kartesischer Taucher). Die Nutzung von physikalischen Prinzipien über Massenspektroskopie¹⁵⁸, Radiometrie, thermische Leitfähigkeit, Gas-Chromatographie und Paramagnetismus¹⁵⁹ wurden ebenfalls angewendet. Zudem wurden optimierte amperometrische Sauerstoffelektroden durch funktionalisierte Oberflächen vorgestellt^{106,107}. Reviews zu den unterschiedlichen Methoden, Tumor-Hypoxie zu detektieren, wurden von Höckl et al.²³ und Gallez et al.²⁴ erstellt. Methoden wie die „Blut-Sauerstoff-Level abhängige Magnetresonanztomographie⁶³“ (englisch: *blood oxygen-level dependend magnetic resonance imaging* (BOLD MRI)), Infrarotspektroskopie (englisch: *near-infrared spectroscopy*) oder Puls-Oximetrie¹⁶⁰ (englisch: *pulse oximetry*) werden im Zusammenhang mit der Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung genannt. Diese Methoden messen jedoch nicht direkt die Gelöst-Sauerstoff-Konzentration.

2.6 Eigenschaften der Methoden zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung

Die in Kapitel 2 beschriebenen Methoden zur DO-Bestimmung sind unterschiedlich gut zur Messung an lebenden Zellen geeignet. Die diesbezüglichen Eigenschaften sind in Tabelle 2-1 vergleichend dargestellt. Die Kriterien sind:

- die Möglichkeit, kontinuierlich zu messen, um die Kinetik des Stoffwechsels aufzuzeichnen;
- Biokompatibilität der Messmethode, um an lebenden Zellen messen zu können;

- direkte DO-Bestimmung, um eine Beeinflussung der Zellen durch Marker oder Kontrastmittel ausschließen zu können;
- Kosten bzw. die Komplexität der Messmethode.

Tabelle 2-1: Eigenschaften der Methoden zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung an lebenden Zellen.

Typ	Kontinuierliche Messung	Kosten / Komplexität	Bio-kompatibilität	Direkte DO Bestimmung
Chemisch	nein	mittel	nein	nein
Spektro-photometrisch	nein	mittel	nein	nein
Elektrochemisch	ja	gering	in-vitro, in-vivo	ja
Optisch	ja	gering	in-vitro	ja
Magnetisch	ja	hoch	in-vivo	nein

Es zeigt sich, dass die elektrochemische und die optische Methode zur Messung der DO-Konzentration an lebenden Zellen am geeignetsten sind.

2.7 Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung für zellbasierte Systeme

Verschiedene Systeme zur multiparametrischen Online-Aufzeichnung physiologischer Parameter von Zellen wurden in den Arbeitsgruppen von Prof. B. Wolf entwickelt^{116,161-168}. Kommerziell erhältliche Geräte zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung werden z.B. von der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten GmbH (Weilheim, Deutschland, www.wtw.de) oder der Metrohm AG (Herisau, Schweiz, www.metrohm.com) angeboten. Diese sind jedoch für Anwendungen an lebenden Zellen zu groß. Einzelne Mikrosensoren lassen sich mit Potentiostaten (z.B. Radiometer Copenhagen) betreiben. Potentiostaten stellen messtechnische Grundprinzipien wie Amperometrie, Voltametrie oder Ähnliches zur Verfügung. Die PreSens GmbH (Regensburg, Deutschland, www.presens.de) vertreibt Geräte, die nach dem optischen Prinzip arbeiten und auch zu Messungen an Zellen verwendet werden^{148,169-171}. Die HiTec Zang GmbH (Herzogenrath, Deutschland, www.hitec-zang.de) vertreibt ein „Respiration Activity Monitoring System“. Das Messprinzip beruht hier auf der

Messung des Sauerstoff-Partialdrucks in der Gasphase des Kultivierungssystems^{172,173}. Oroboros Instruments (Innsbruck, Österreich, www.oroboros.at) vertreibt einen Oxygraph, mit dem es möglich ist, Untersuchungen zur mitochondrialen Aktivität durchzuführen¹⁷⁴. Es wurden verschiedene Versionen von Geräten zum Betrieb von multiparametrischen elektrochemischen Biosensorchips entwickelt und verbessert. Seahorse Bioscience Inc. (North Billerica, MA, USA, www.seahorsebio.com) bietet einen „Extracellular Flux Analyzer“ zusammen mit einem „XF Assay Kit“ an, mit dem parallel in einer 24well-Platte mit fluoreszenzbasierten Sensoren die Sauerstoffverbrauchsrate gemessen werden kann¹⁷⁵. Kommerziell erhältlich sind die Systeme von Bionas (Rostock, Deutschland, www.bionas.de). Diese Geräte besitzen eine statische Arbeitspunkteinstellung, eine offene Fluidik, keine Steuerung für den O₂-FET und wurden stationär realisiert^{176,177}. Sehr ähnlich sind auch die Systeme vom Kurt Schwabe Institut in Meinsberg¹⁷⁸. Die beiden vorgenannten Systeme gehen auf Verbundprojekte oder Entwicklungen von Prof. B. Wolf zurück. Eine Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen existieren, die sich mit der Untersuchung der Mikroumgebung von lebenden Zellen (auch so genannte μ TAS-Systeme für englisch: *micro total analysis systems*¹⁷⁹) beschäftigen¹⁸⁰⁻¹⁸².

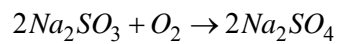
2.8 Methoden zur gezielten Variation des Gelöst-Sauerstoffs in Flüssigkeiten

Um die DO-Konzentration in Flüssigkeiten zu verändern, wurden verschiedene Methoden angewandt, die sich in zwei Kategorien teilen lassen. Erstens der Verbrauch des DO in der Flüssigkeit und zweitens die Verdrängung des DO aus der Flüssigkeit. Generell ist zu beachten, dass die DO-Konzentration thermodynamisch exakt einstellbar ist. In der Praxis kann sich das Einstellen einer definierten Konzentration jedoch durch kinetische Effekte verzögern^{XIV}.

2.8.1 Natriumsulfit

Durch Zugabe von Na₂SO₃ in eine Flüssigkeit wird der dort vorhandene DO nach nachstehender Gleichung (vereinfacht) zu Na₂SO₄ reduziert.

^{XIV} In diesem Zusammenhang wird oft der Begriff „Sättigungskonzentration“ verwendet. Bei der Sättigungskonzentration ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Eintritt des Gases aus der Gasphase in die Flüssigkeit und Austritt des Gases aus der Flüssigkeit in die Gasphase erreicht.



2-29

Als Faustregel wird 1 Gramm Na_2SO_3 auf 100 ml Flüssigkeit gegeben, um eine DO-freie Lösung zu erhalten. Damit wird die Flüssigkeit mit Natriumsulfit übersättigt, wodurch Sauerstoff, der in die Flüssigkeit nachdiffundiert, sofort wieder verbraucht wird. Eine solche PBS-Lösung hält mehrere Stunden bis die DO-Konzentration wieder ansteigt. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass sie sehr einfach und schnell zu realisieren ist. Nachteilig kann sich die mit der Zugabe von Natriumsulfit verbundene pH-Wert-Verschiebung auswirken. Außerdem ist es mit dieser Methode nur möglich, den gesamten Sauerstoff zu verbrauchen. Definierte DO-Konzentrationen lassen sich hiermit nur transient einstellen.

2.8.2 Glukoseoxidase

Durch Zugabe des Enzyms Glukoseoxidase (GOD) (www.sigma-aldrich.com, G6641) und Glukose wird nach nachstehender Gleichung ebenfalls Sauerstoff verbraucht⁹⁴. Damit das aggressive Wasserstoffperoxid nicht in der Flüssigkeit verbleibt, wird meist noch Katalase (www.sigma-aldrich.com, C9322) zugegeben. Damit wird das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Als Gesamtreaktion wird Sauerstoff jedoch verbraucht.



Als Faustformel werden auf 50 ml Flüssigkeit 1 U Glukoseoxidase^{XV} und 10 U Katalase^{XVI} gegeben. Der Sauerstoffverbrauch kann durch Zugabe von 500 µl einer 1 M Glukoselösung angestoßen werden. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass keine aufwändigen Geräte notwendig sind und dass die physiologischen Bedingungen der Flüssigkeit nur geringfügig verändert werden. Nachteilig sind der relativ große Aufwand und die hohen Kosten sowie die Instabilität der Enzyme. Bei dieser Methode ist zu beachten, dass durch die Bildung von Gluconsäure auch eine Verschiebung des pH-Werts erfolgt.

^{XV} 1 U Glukoseoxidase oxidiert 1,0 µM Glukose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid pro Minute bei pH 5,1 und 35°C (dies entspricht einem Sauerstoffverbrauch von 22,4 µl pro Minute).

^{XVI} 1 U Katalase spaltet 1,0 µM Wasserstoffperoxid pro Minute bei pH 7,0 und 25°C (bei einer Abnahme der Wasserstoffperoxid-Konzentration von 10,3mM nach 9,2 mM).

2.8.3 Veränderung des Gasgemischs (Stickstoff)

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, ergibt sich der Partialdruck von Sauerstoff in Gasen unter anderem aus seinem prozentualen Anteil an der Zusammensetzung von Luft. Verringert oder erhöht man nun den prozentualen Anteil des Sauerstoffs an Luft (durch z.B. Erhöhung des Stickstoffanteils), ändert sich auch die DO-Konzentration in der Flüssigkeit.

Diese Methode findet meist durch Einleiten gasförmigen Stickstoffs oder Sauerstoffs in die Flüssigkeit Anwendung. Durch gesteuerte Begasung ist es auch möglich, definierte Werte der DO-Konzentration einzustellen. Nachteilig wirkt in der Praxis eine Temperaturenniedrigung (Ausdehnung und starke Abkühlung von Gasen aus Hochdruckflaschen) in der Flüssigkeit aus. Wärmetauscher schaffen hier Abhilfe.

2.8.4 Veränderung des Umgebungsdrucks

Wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben, kann der Partialdruck des Sauerstoffs auch durch eine Veränderung des Umgebungsdrucks verändert werden. Hierzu wird eine Druckkammer oder ein Exikator benötigt (siehe Abbildung 2-11). Durch genaues Einstellen des Umgebungsdrucks können so definierte DO-Konzentrationen in einer Flüssigkeit eingestellt werden.

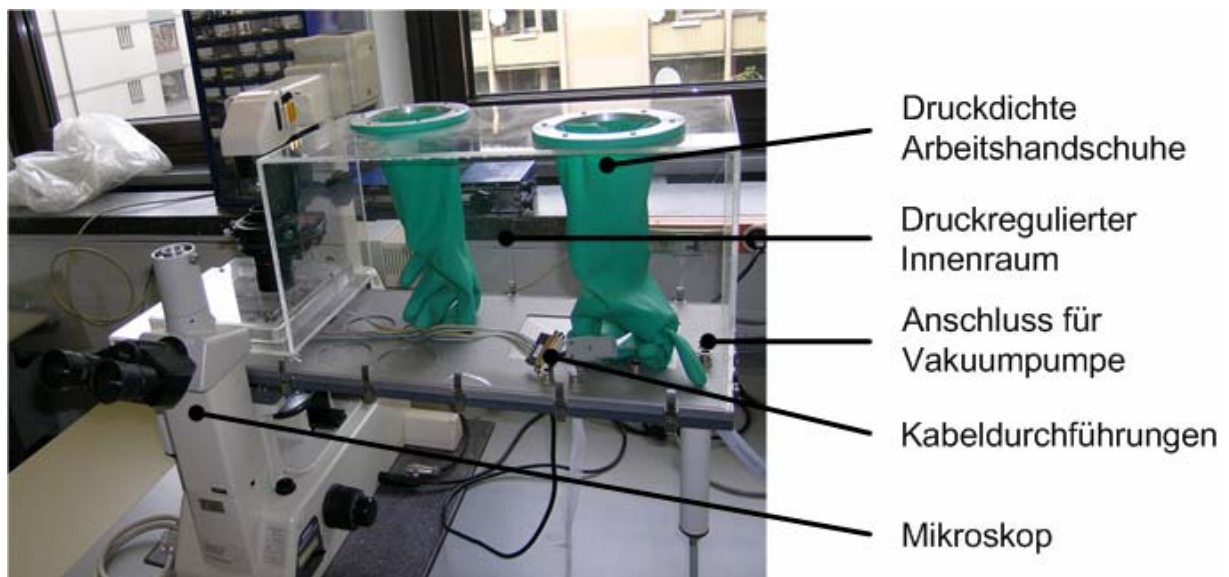


Abbildung 2-11: Exikator am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. Über den druckregulierten Innenraum kann eine definierte DO-Konzentration im Kulturmedium der Zellen eingestellt werden. Zur elektrochemischen Untersuchung der Zellen kann über die Kabeldurchführung eine externe Elektronik angeschlossen werden. Zur optischen Analyse ist ein Mikroskop integriert.

... I'm not trying to prove anything, by the way. I'm a scientist and I know what constitutes proof. But the reason I call myself by my childhood name is to remind myself that a scientist must also be absolutely like a child. If he sees a thing, he must say that he sees it, whether it was what he thought he was going to see or not. See first, think later, then test. But always see first. Otherwise you will only see what you were expecting. Most scientists forget that. I'll show you something to demonstrate that later. So, the other reason I call myself Wonko the Sane is so that people will think I am a fool. That allows me to say what I see when I see it ...

Douglas Adams – The hitchhiker's guide to the galaxy

3 Neue Ansätze zur Gelöst-Sauerstoff-Bestimmung für Lab-on-chip-Systeme

Zur Beschreibung eines zellbasierten Systems und zur Einführung der entsprechenden Begriffe wird hier zunächst ein zellbasiertes System vorgestellt, wie es zu Beginn dieser Arbeit existierte. Nachstehende Abbildung zeigt den prinzipiellen Aufbau des alten zellbasierten Systems.

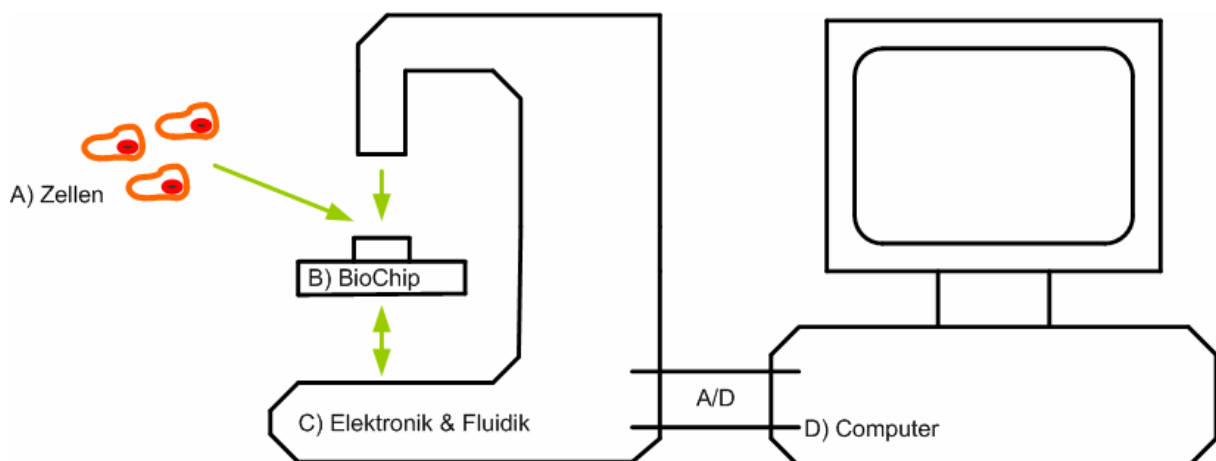


Abbildung 3-1: Prinzipskizze eines zellbasierten Systems zu Beginn dieser Arbeit mit lebender Zellprobe (A), multiparametrischem Sensorchip (B), Elektronik und Fluidik zum Betrieb des Mikrosensorchips und zur Versorgung der Zellen (C) und Computer zur Datenanzeige.

Auf dem BioChip befinden sich Mikrosensoren zur Messung von DO, pH, Impedanz und Temperatur. Die Arbeitspunkte der Mikrosensoren werden statisch über Potentiometer auf der Elektronik eingestellt. Die erfassten Messdaten werden über eine A/D-Wandlerkarte zum Computer übertragen und dort gespeichert und angezeigt. Die Steuerung der Fluidik erfolgt auch elektronisch; hierbei werden die Pumpintervalle und die Pumpgeschwindigkeit ebenfalls mit Potentiometern definiert.

Zur Messung werden lebende Zellen auf den BioChip gebracht und die Fluidik angeschlossen. Dann wird in einem kurzen Intervall frisches Messmedium auf den Chip gepumpt. In einer anschließenden längeren Messphase werden die Pumpen gestoppt. Während der Messphase wird mit den Mikrosensoren die von den Zellen verursachte Änderung in DO, pH und Impedanz gemessen. Anschließend wird wieder frisches Medium gepumpt. Damit erhalten die Zellen frische Nährstoffe und die Mikrosensoren gehen auf den Referenzwert zurück. Die Pump- und Messphasen werden so bis zum Ende des Experiments weiter abgewechselt. Soll die Reaktion der Zellen auf einen Wirkstoff untersucht werden, wird dieser über die Pumpphase in das System eingebracht.

Abbildung 3-2 zeigt den Aufbau der alten Fluidikvariante. Während der Pumphase wurden zwei Pumpen betrieben. Die erste Pumpe (Zulauf, langer Kanal) dient dazu, Medium zum BioChip zu transportieren. Die zweite Pumpe (Ablauf, kurzer Kanal) wurde mit einem größeren Fördervolumen betrieben, um ein Überlaufen des Messmediums zu verhindern. Als Referenzelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der in das Messvolumen eintauchte. Diese Referenzelektrode wird als Bezugssystem für den pH-Mikrosensor auf dem BioChip benötigt.

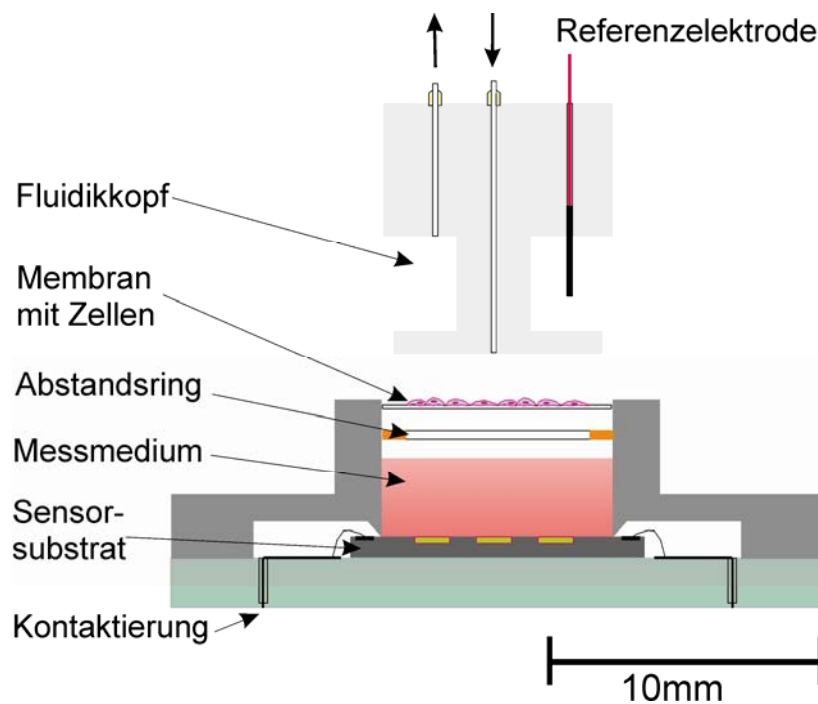


Abbildung 3-2: Prinzipieller Aufbau des alten Fluidiksystems (nach Brischwein et al.¹⁸³).

Abbildung 3-3 zeigt einen BioChip, wie er im alten System verwendet wurde. Dieser Chip wurde im Rahmen der Arbeitsgruppe von Prof. B. Wolf¹⁶¹ entwickelt und von der Firma Micronas (www.micronas.com) in Siliziumtechnologie hergestellt. Auf dem Chip befinden sich vier ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs) zur Messung des pH-Werts (nur in Verbindung mit der externen Referenzelektrode), ein amperometrischer Sauerstoffsensor zur Messung des DO, ein planarer Fingerkondensator zur Messung der Impedanz, eine pn-Diode zur Temperaturmessung und ein O₂-FET zur quasi-gleichzeitigen Messung von DO und pH¹⁸³. Auf der Unterseite des BioChips befinden sich elektronische Kontakte, mit denen die einzelnen Mikrosensoren mit der entsprechenden Steuer- und Auswerteelektronik verbunden wurden. Die elektronische Kontaktierung erfolgte mit einem PLCC-Testsockel (vgl. Abbildung 4-20).

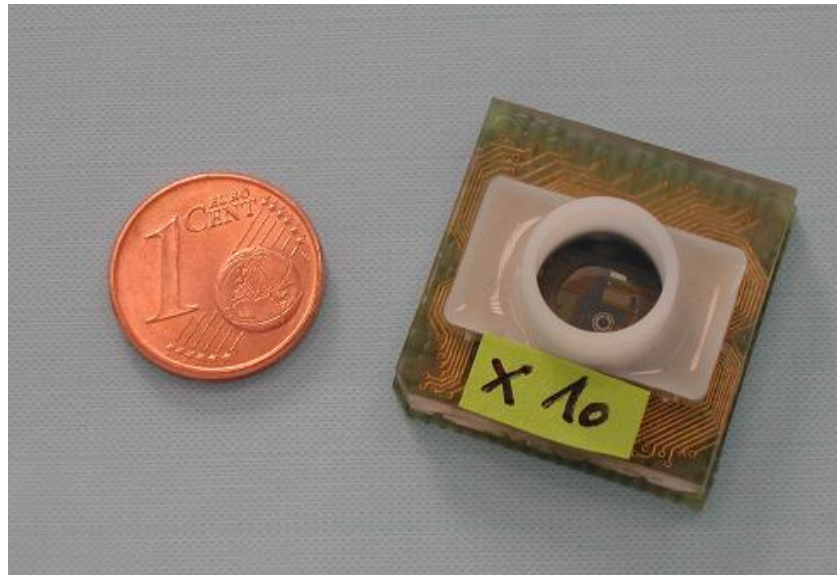


Abbildung 3-3: Abbildung eines von Prof. Wolf entwickelten und von Micronas (www.micronas.com) hergestellten BioChips in Siliziumtechnologie. Der BioChip enthält Mikrosensoren für DO, pH, Impedanz und Temperatur.

In Abbildung 3-4 ist die Kontaktierung zur Fluidik und zur Elektronik gezeigt. Der BioChip mit dem lebenden Zellmaterial wurde in den PLCC-Testsockel eingelegt und dieser zugeklappt. Dadurch kam die Verbindung zur Elektronik zustande. Anschließend wurde der Fluidik-Arm heruntergeklappt und somit die Zellen mit dem Fluidiksystem verbunden.

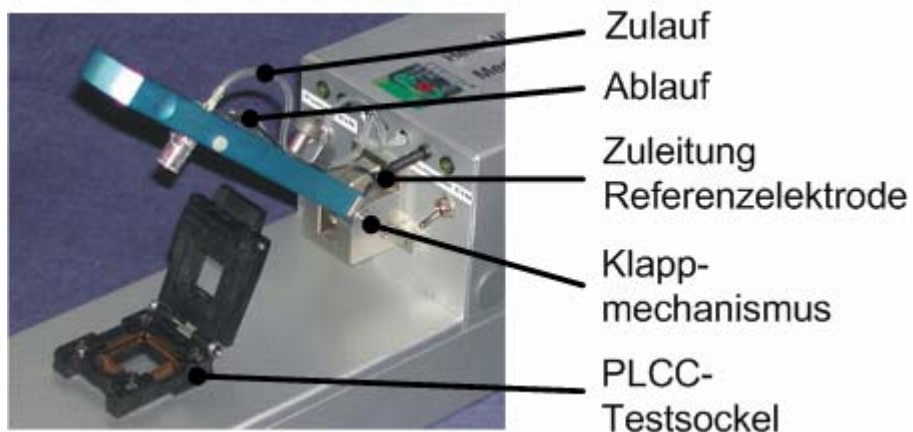


Abbildung 3-4: Abbildung eines zellbasierten Systems (ohne BioChip), wie es am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik entwickelt wurde.

3.1 Elektrochemische Bezugssysteme

In den in dieser Arbeit beschriebenen Systemen werden elektrochemische Bezugssysteme für die pH-Messung im Umfeld lebender Zellen untersucht. Hierbei wurden die Stabilitäts-eigenschaften des bestehenden Systems auf Silberchloridbasis untersucht und verbessert. Außerdem wurde ein neuer, biokompatibler Pt-basierter Ansatz entwickelt und evaluiert. Mit einem biokompatiblen Bezugssystem wird eine Integration auf dem BioChip und somit eine weitere Integration und Miniaturisierung möglich.

3.1.1 Silber/Silberchlorid-Referenzelektroden

Bisher wurden externe (d.h. nicht auf dem Sensorchip integrierte) Referenzelektroden⁷² (Bezugselektroden) der ersten Art verwendet. Es kamen chlorierte Silberdrähte (Ag/AgCl) zum Einsatz. Die bisher verwendeten Referenzelektroden lieferten jedoch nicht die gewünschte Langzeitstabilität für Messungen über 48h. Deshalb wurden im hier verwendeten System Referenzelektroden der zweiten Art verwendet. Das Elektrolytgefäß (*Replaceable Flow-Thru Barrel w/1/16"*) für die 3,0 M KCl-Lösung inklusive Diaphragma wurden bei Microelectrodes Inc. (Microelectrodes Inc., Bedford, New Hampshire, USA, www.microelectrodes.com) bestellt. Der chlorierte Silberdraht wurde mit einer Methode nach Huang et al.⁷⁷ hergestellt: Ein mit Aceton gereinigter Silberdraht (als Kathode) mit einem Durchmesser von 0,5 mm wird ca. 2,0 cm in 0,1 M HCl getaucht. Als Anode wird ein Platindraht verwendet. Anschließend wird mit Hilfe des Potentiostaten *Voltalab PGZ-402* für vier Minuten ein Strom von 3 mA eingeprägt. Die so gefertigten Referenzelektroden wurden bzgl. Drift, Rauschen und Alterung charakterisiert (siehe Kapitel 4.1.1).

3.1.2 Platiniertes Platindraht als Bezugssystem

Es wurde die Eignung eines platinierten Platindrahts (Pt/Pt schwarz) als Quasi-Referenzelektrode untersucht. Durch die Platinierung wird die aktive Oberfläche der Elektrode vergrößert und die Austauschstromdichte^{XVII} der Elektrode erhöht¹⁸⁴. Diese Variante hätte gegenüber der Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode den Vorteil, dass die

^{XVII} Die Austauschstromdichte hängt von den Konzentrationen der an den Elektrodenreaktionen beteiligten Spezies sowie von den freien Aktivierungsenthalpien ab⁸⁰.

Elektrode direkt auf dem Chip integriert werden kann und somit zum einen eine deutliche Miniaturisierung des Messsystems, zum anderen eine kostengünstigere und rauschärmere Messung ermöglichen würde. Möglich ist dies, da Platin – im Gegensatz zu Silber – nicht zytotoxisch ist. Die Platinierung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Lösungen nach Sandison et al.¹⁸⁵ bzw. Cai et al.¹⁸⁶. Folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Lösungen:

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Platinierungs-Lösungen (jeweils in 20ml destilliertem H₂O).

Lösung 1	Lösung 2
50mM Hexachloroplatinat	24mM Hexachloroplatinat
0,5mM Bleicitrat	2,1mM Bleiacetat

Wie bei der Herstellung der Silber/Silberchlorid-Elektroden wurde ein Platindraht als Bezugssystem verwendet. Es wurde ein Stromfluss von 65 mA für 90 Sekunden eingestellt.

3.2 O₂-FET

Die Möglichkeiten des O₂-FET wurden bisher nicht ausgeschöpft und nicht umfassend untersucht. Zum einen kann durch zusätzliches Aufzeichnen des Stromflusses (z.B. durch eine Kombination einer ISFET-Schaltung mit einer amperometrischen Sauerstoffschaltung) über die Edelmetallelektrode (NME) genauer auf die stattfindenden elektrochemischen Reaktionen geschlossen werden. Zum anderen kann durch Modellierung und Simulation das Verständnis der physikalischen Vorgänge am O₂-FET genauer verstanden werden. Abbildung 3-5 zeigt einen O₂-FET in cMOS Siliziumtechnology wie er für die Messungen in dieser Arbeit verwendet wurde. Zu Beginn dieser Arbeit war es möglich einen O₂-FET ohne die amperometrische Messmethode bei statischen Arbeitspunkten zu betreiben. Die dynamische Arbeitspunkteinstellung, das amperometrische Messprinzip, sowie die Modellierung des O₂-FET wurden im Rahmen dieser Arbeit geleistet.

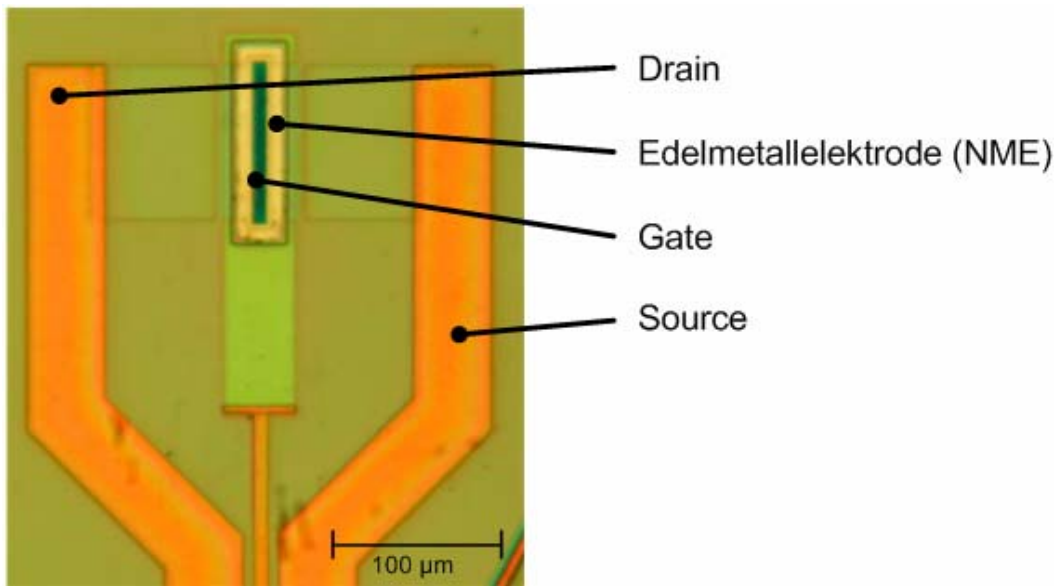


Abbildung 3-5: O₂-FET in cMOS Siliziumtechnologie auf einem BioChip wie in Abbildung 3-3 dargestellt.

3.2.1 Amperometrie + ISFET

Durch Aufzeichnung und Korrelation von Strom und pH-Wert-Änderungen am O₂-FET wird es möglich, spezifischere Analysen in Bezug auf die DO-Konzentration im Messmedium zu erstellen. Wie nachstehende Abbildung zeigt, kann durch Einfügen einer Strommessung das Messprinzip um die amperometrische Methode (vgl. Kapitel 2.2.2) erweitert werden.

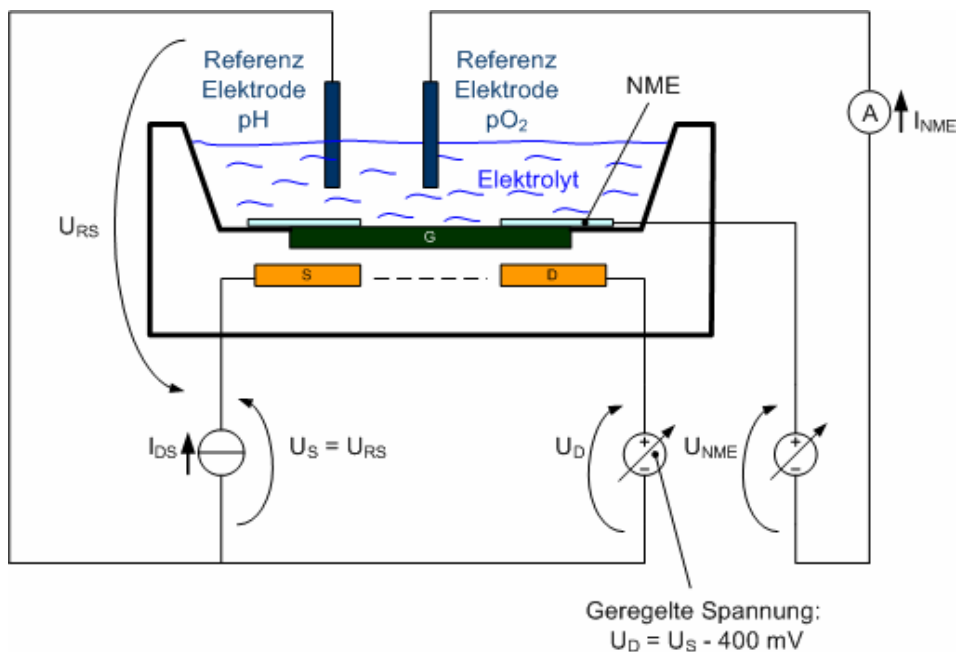


Abbildung 3-6: Erweitertes Funktionsprinzip des O₂-FET (vgl. Abbildung 2-7).

Zudem kann das Detektionsspektrum des Sensors durch eine Variation der Spannung an der Edelmetallelektrode erweitert werden. Durch Umpolen der Betriebsspannung kann auch ein Reinigungsprozess erreicht werden, der die Lebensdauer und die Langzeitstabilität des Sauerstoffsensors verlängert^{187,188}. Dies wird durch Invertierung elektrochemischer Vorgänge an den Elektroden erreicht. Die aktuelle Beschaltung des O₂-FET ist in zwei funktionale Blöcke geteilt. Zum einen die Beschaltung des ISFET und zum anderen die Beschaltung der Edelmetallelektrode. Durch die Neuentwicklung des *Intelligent Mobile Lab* (IMOLA) soll nun neben der Amperometrie (Strommessung bei konstanter Spannung) auch eine Wechsellspannungsvoltametrie (Strommessung bei variabler Spannung) durchgeführt werden. Eine Auflistung mit Beschreibung der verschiedenen elektroanalytischen Messtechniken findet sich in Whitfield et al.⁴¹.

3.2.2 Modellierung

Die beim O₂-FET beobachteten Messkurven waren bisher nicht vollständig erklärbar¹²⁴. Beim Wechsel zwischen pH-Messung und DO-Messung gibt es einen Versatz in der Messkurve. Um dieses Phänomen zu untersuchen und um die Vorgänge am O₂-FET genauer zu verstehen, wurden die geometrischen und physikalischen Gegebenheiten am O₂-FET mit Hilfe der Finite-Elemente-Software *COMSOL* modelliert und simuliert werden.

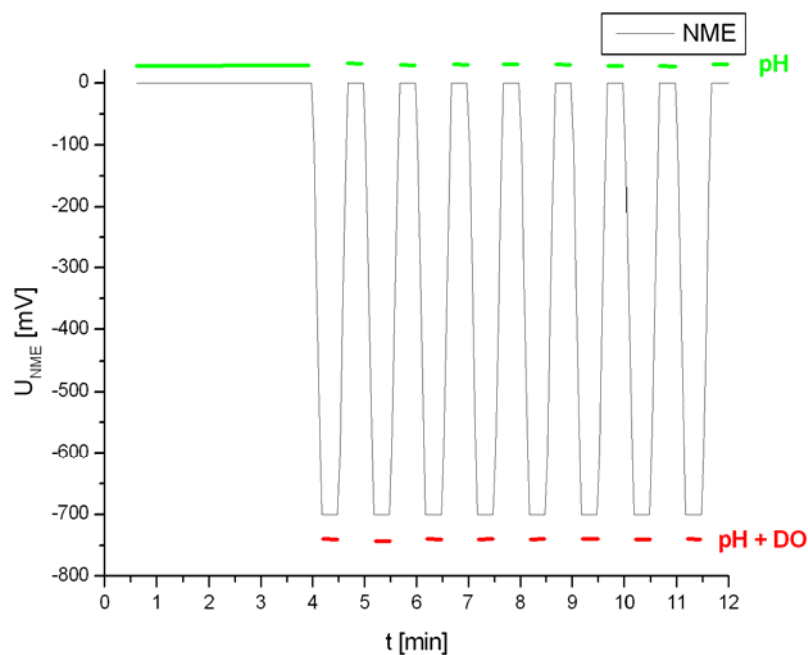


Abbildung 3-7: Vorgegebene Spannung U_{NME} an der NME während eines Zyklus. Oben (grün) markiert sind die Zeiten, in denen der pH-Wert bestimmt wird. Unten (rot) markiert sind die Zeiten, in denen pH- und DO-Wert gemessen werden.

Als Ausgangsbasis für das neu zu erstellende Modell wurden die Arbeiten von Nilsson¹⁸⁹, Kolev et al.¹⁹⁰ und Curtiss et al.¹⁹¹ zugrunde gelegt. Abbildung 3-7 zeigt die Spannung während eines Messzyklus von 10 min, die an der Edelmetallelektrode des O₂-FETs angelegt wird (gegenüber der Referenzelektrode). Werden 0 V angelegt, so wird der pH-Wert gemessen. Werden -700 mV angelegt, wird additiv zum pH-Wert die DO-Konzentration gemessen. Abbildung 3-8 zeigt den Verlauf des realen Messsignals bei einer Messung mit PBS. In Abbildung 3-8 wird in den ersten 2,5 Minuten frisches Medium zum Chip transportiert (Pumpzyklus) für den Rest der Darstellung steht das Medium auf dem BioChip (Messzyklus). Es gibt einen Versatz in der Signalhöhe zwischen pH-Messung und DO-Messung. Dieser Versatz war nach bisherigem Stand der Technik nicht zu erklären.

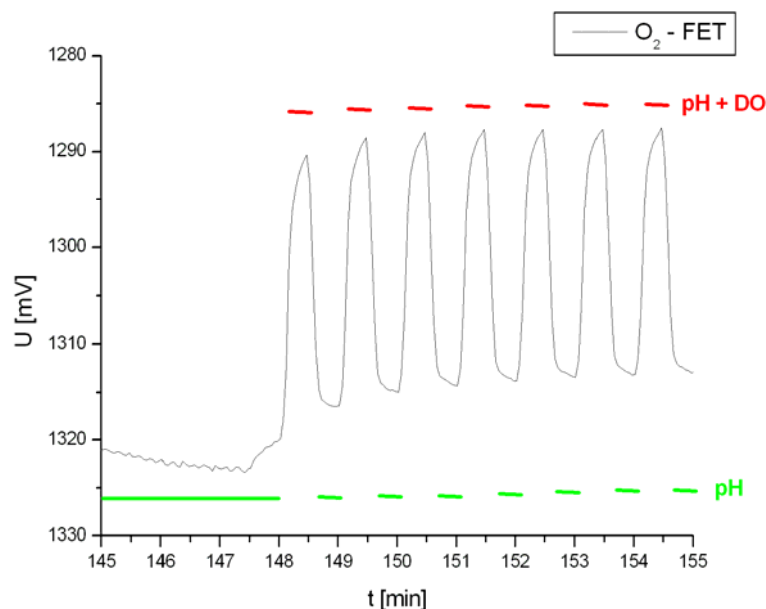


Abbildung 3-8: Reale Messergebnisse an einem O₂-FET während eines Versuchs mit PBS. Während der grünen Zyklen werden 0mV an der NME angelegt (reine pH-Messung). Während der roten Zyklen werden -700mV an der NME angelegt (Messung von pH und DO).

Um die Prozesse während eines Versuchs zu simulieren, wurde die Geometrie der Versuchsanordnung dreidimensional entsprechend Abbildung 3-9 simuliert. Rechts im Bild ist die Grundfläche des BioChips abgebildet, auf der sich der O₂-FET befindet (vgl. Abbildung 3-3). Die zylinderförmige Komponente darüber stellt das Fluidvolumen über dem Sensorchip dar. Sie hat einen Durchmesser von 6,0E-3 m und eine Höhe von 2,0E-4 m, womit sich ein Volumen von 5,4E-9 m³ ergibt. Links oben ist eine Vergrößerung des O₂-FETs abgebildet.

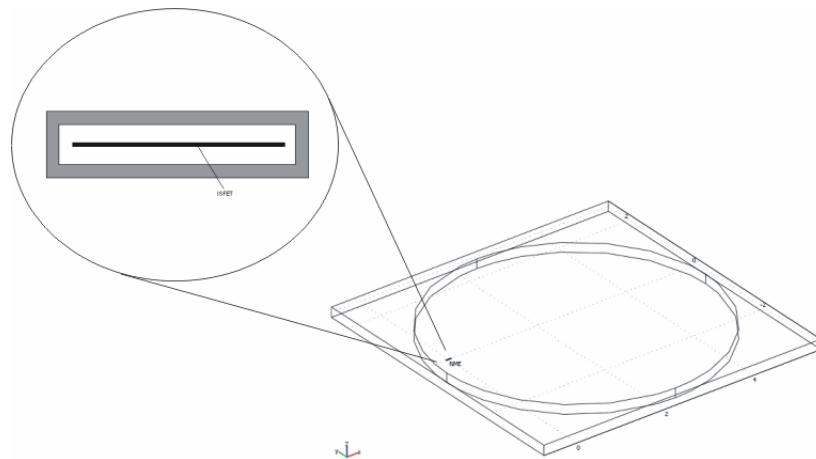


Abbildung 3-9: Dreidimensionales Modell des BioChips mit Vergrößerung des O₂-FET-Gatebereichs und der Edelmetallelektrode.

Die exakten Dimensionen der Edelmetallelektrode des O₂-FETs sind in Abbildung 3-10 dargestellt.

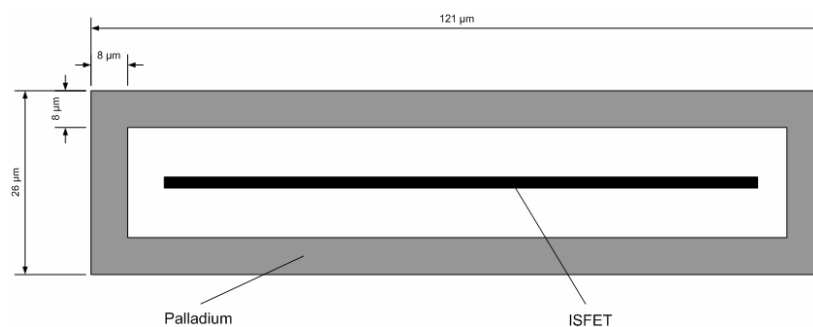


Abbildung 3-10: Geometrischer Aufbau der Edelmetallelektrode des verwendeten O₂-FETs.

Als physikalisches Prinzip wurde Diffusion modelliert. Konvektion wurde vernachlässigt, da weder ein Gradient in der Temperatur noch in der Dichte des Messmediums zu erwarten ist. Migration wurde ebenfalls vernachlässigt, da ein Gradient in der Felddichte nur in der Helmholtz-Doppelschicht in direkter Nähe der NME zu erwarten ist und nicht an der Gate-Fläche des ISFETs. Die Diffusion wurde durch das zweite Ficksche Gesetz mit der Diffusionskonstante D und der Konzentration c implementiert:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \cdot \nabla c_i) = 0 \quad 3-1$$

Die Messflüssigkeit wurde als hoch verdünnt betrachtet, wodurch ein Aktivitätskoeffizient von 1 angenommen und die Ionenkonzentration anstelle der Aktivität der beteiligten Moleküle bei den Berechnungen verwendet werden kann¹⁹². Die Zusammensetzung der modellierten Messflüssigkeit ist in Tabelle 3-2 gegeben.

Tabelle 3-2: Inhaltsstoffe und Konzentrationen von gepufferter isotonischer Kochsalzlösung.

Inhaltsstoff	Konzentration (g/l)
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄	1,15

Als dominierende elektrochemische Reaktion an der Edelmetallelektrode wurde Gleichung 2-19 angenommen. Die Bildung von OH⁻-Ionen wurde durch ein Einströmen derselben modelliert. Basierend auf Gleichung 2-19, einem gemessenen elektrischen Strom von 15 nA und einer Oberfläche der NME von 0,003 mm² wurde ein Ionenfluss von 7,4E-5 mol/m²s berechnet.

Tabelle 3-3: Simulationsparameter des Diffusionsmodells bei 298 K.

Parameter	Beschreibung	Wert	Einheit	Referenz
D_{OH^-}	diffusion coefficient	$5.273 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m^2}{s}$	Lide ³⁹
$D_{H_3O^+}$	diffusion coefficient	$9.313 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m^2}{s}$	Gray ¹⁹³
D_{O_2}	diffusion coefficient	$2.51 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m^2}{s}$	Landolt et al. ¹⁹⁴
D_{H_2O}	(self) diffusion coefficient	$2.13 \cdot 10^{-9}$	$\frac{m^2}{s}$	Landolt et al. ¹⁹⁴
$c_{OH^-} \Big _{t=0}$	start concentration	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$\frac{mol}{m^3}$	Lautenschlager et al. ¹⁹⁵
$c_{H_3O^+} \Big _{t=0s}$	start concentration	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$\frac{mol}{m^3}$	Lautenschlager et al. ¹⁹⁵
$c_{O_2} \Big _{t=0s}$	start concentration	0.25	$\frac{mol}{m^3}$	Adam et al. ⁴⁰
$c_{H_2O} \Big _{t=0s}$	start concentration	≈ 55510	$\frac{mol}{m^3}$	Lautenschlager et al. ¹⁹⁵

Um die Simulation zu verfeinern wurde die Pufferkapazität von PBS durch Titration gemessen, rechnerisch validiert und implementiert¹⁹⁶. Durch die geringen pH-Änderungen (ca. 0,5 pH) während einer Messung konnte die Pufferkapazität des Mediums als linear

angenähert werden. Sie wurde durch einen kontinuierlichen Ausfluss von $2,1\text{E-}9 \text{ mol/m}^2\text{s}$ H_3O^+ -Ionen implementiert. Die Temperatur wurde konstant auf 298 K gesetzt und die Simulationsparameter entsprechend Tabelle 3-3 verwendet. Das Modell wurde implementiert, mit COMSOL gerechnet und direkt über der Gate-Elektrode des ISFETs ausgewertet.

3.3 Kohlenstoff-Nanoröhrchen

Ein im Rahmen dieser Arbeit vollständig neu entwickelter und untersuchter DO-Sensor funktioniert nach dem potentiometrischen Prinzip. Hier wurde die Verwendung neuer Materialien zur Bestimmung des DO untersucht. Kong et al.¹⁹⁷ zeigte, dass Kohlenstoff-Nanoröhrchen (CNT) eine vielversprechende Grundlage für neuartige Sensoren sind. Vorteilhaft ist zum einen die günstigere Messmethode, da eine potentiometrische Messung deutlich einfacher als eine amperometrische aufzubauen ist. Zum anderen sollen die Herstellungskosten dadurch minimiert werden, dass die Sensorstrukturen z.B. gedruckt oder in Dickschichttechnik hergestellt werden. Eine Abbildung der Messanordnung ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

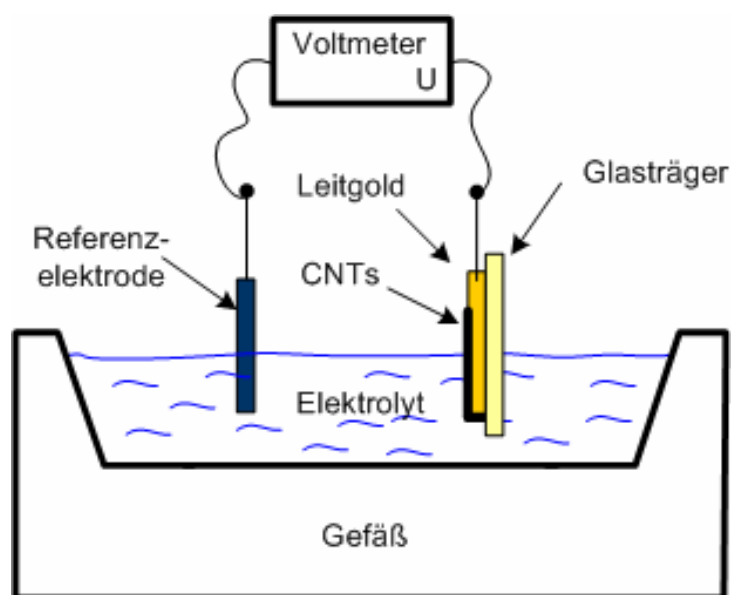


Abbildung 3-11: Funktionsprinzip des CNT-Sensors. Die Potentialdifferenz zwischen dem CNT-Sensor und einer Referenzelektrode wird gemessen.

In unterschiedlichen Arbeiten wurde gezeigt, dass gasförmiger Sauerstoff mit Kohlenstoff-Nanoröhrchen-basierten Sensoren detektiert werden kann¹⁹⁸⁻²⁰¹. Die Art der Bindung wurde von Ulbricht et al. untersucht¹⁹⁹. Ye et al.²⁰² zeigten, dass es mit solchen Sensoren auch möglich ist, in Flüssigkeiten gelösten Sauerstoff zu detektieren. Qi et al.²⁰³ zeigten den

Aufbau eines Kohlenstoff-Nanoröhrchen-Arrays. Der Einsatz von CNT-Arrays zur Detektion von Nervengiften wurde von Novak et al.²⁰⁴ untersucht. Die Bio-Funktionalisierung²⁰⁵ von Kohlenstoff-Nanoröhrchen mit Glukoseoxidase^{206,207}, Desoxyribonukleinsäure (DNS)²⁰⁸, aber auch mit Meerrettich-Peroxidase²⁰⁹ wurde gezeigt. In der vorliegenden Arbeit sollte eine kostengünstige Herstellungsmethode für einen Kohlenstoff-Nanoröhrchen-basierten Gelöst-Sauerstoff-Sensor untersucht werden. Grundlegende Arbeiten bezüglich Stabilität, Biokompatibilität und Elektrodenalterung wurden bereits von Poh et al.²¹⁰ und Shim et al.²⁰⁵ durchgeführt. Eine drahtlose Sensorvariante wurde von Ong et al.²⁰¹ vorgestellt. Untersuchungen zur Integration in miniaturisierte Geräte und Systeme wurden von Franklin et al.²¹¹ publiziert.

3.4 Modulares Lab-on-chip-System

Zum Betrieb der Mikrosensoren (für DO, pH, Impedanz, Temperatur) wurde das IMOLA entwickelt²¹². Dies war notwendig, da bestehende Systeme Unzuverlässigkeiten in der Betriebsweise zeigten. Die Ursachen hierfür waren unterschiedlich: Zur Gewährleistung der Langzeitstabilität der Messungen, wurde das Referenzelektrodensystem verändert. Außerdem wurde die Chipkontaktierung überarbeitet, damit reproduzierbar kleine Übergangswiderstände erreicht werden konnten. Um Leckagen und Luftblasen zu vermeiden und Hypoxieuntersuchungen zu ermöglichen, wurde das Fluidiksystem neu konzipiert. Durch eine Erweiterung der Elektronik wurden mobile Applikationen^{213,214} bzw. ein erweiterter Betriebsmodus des O₂-FETs möglich. Schließlich wurde ein modulares Konzept entwickelt, das eine hohe Flexibilität bezüglich der Anpassung an zukünftige Entwicklungen im Bereich der Mikrosensorchips zulässt. Zudem wurde eine frühzeitige Digitalisierung der Daten implementiert. Schwerpunkt dieser Arbeit sind die Teile des IMOLAs, die zum Betrieb des O₂-FET notwendig sind. Das Modul zum Betrieb des Keramikchips²¹⁵ sowie die CAN-Bus Vernetzung^{216,217}, die automatisierte Fluidik^{216,218} sowie das angeschlossene Software- und Datenbank-System²¹⁹⁻²²¹ werden hier nicht beschrieben, da dies größtenteils Entwicklungsarbeiten waren.

3.4.1 Kontaktierung

Der hohe Widerstand sowie dessen ungenaue Reproduzierbarkeit der bisher verwendeten Kontaktierung waren nachteilig. Zudem war eine einfache Wartbarkeit der Kontaktierungsvariante nicht gegeben (Probleme mit eingetrockneter Flüssigkeit unterhalb des Kontaktsockels). Durch die Untersuchung der am Markt verfügbaren Kontaktierungstechniken sollte der Kontaktwiderstand verringert und die Reproduzierbarkeit des Kontaktwiderstands erhöht werden. Zudem sollte es ermöglicht werden, das komplette Kontaktierungsmodul einfach auszutauschen, zu reinigen oder zu ersetzen.

3.4.2 Fluidiksystem, Modularer Aufbau

Das bisher verwendete Fluidiksystem arbeitete im Pumpmodus, was im Falle einer Leckage zu einem Überlauf führte. Zudem war keine kostengünstige Möglichkeit vorhanden, alle mit der Zellkulturlösung in Berührung kommenden Teile auszutauschen. Es wurde ein Wechsel von einem Pumpsystem in ein Saugsystem durchgeführt um die Überlaufsicherheit zu erhöhen und die Wahrscheinlichkeit der Luftblasenbildung zu verringern. Zudem wurde von einem offenen in ein geschlossenes System gewechselt um die Kontaminationsgefahr zu verringern und Untersuchungen in hypoxischem Milieu zu ermöglichen. Auch das Fluidiksystem wurde modular gestaltet, so dass Teile einfach ausgetauscht oder durch andere Module ersetzt werden können.

Durch den modularen Aufbau ist eine Anpassung an zukünftige Entwicklungen im Bereich der Biosensorik auf einfache Weise möglich. Zudem kann einfach zwischen unterschiedlichen Sensortypen gewechselt werden (Keramik-Chips, Silizium-Chips). Zusätzlich wird durch das modulare System eine Probenanalyse vor Ort möglich. Das bedeutet, dass je nach Zusammenstellung der unterschiedlichen Einzelmodule ein stationäres oder ein mobiles Messgerät bereitgestellt werden kann.

Der modulare Aufbau wurde auch außerhalb der Elektronik realisiert. Die Bereiche Software^{220,221}, Fluidik²¹⁶ und Spannungsversorgung²²² wurden ebenfalls modular konzipiert. Die Spannungsversorgung wurde in Form von Akkus integriert. Ein Fluidikmodul wurde im hinteren Bereich dieser IMOLA-Version angehängt. Der modulare Aufbau ist in Abbildung 4-16 dargestellt und wird in Kapitel 4.4 detailliert beschrieben.

... Esa misma teoría me había expuesto en el colegio el padre Vicente, un jesuita veterano que tenía la mano rota para explicar todos los misterios del universo — desde el gramófono hasta el dolor de muelas — citando el Evangelio según san Mateo, ...

Carlos Ruiz Zafón - La sombra del viento

4 Ergebnisse der neuen Ansätze für Lab-on-chip-Systeme

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der in Kapitel 3 beschriebenen Ansätze zur Verbesserung des alten zellbasierten Systems bezüglich der Referenzelektrode, dem O₂-FET, dem neuen CNT-DO-Sensor und dem modularen Lab-on-chip-System beschrieben.

4.1 Elektrochemische Bezugssysteme

Die Bezugssysteme für die pH-Messung auf den BioChips konnte deutlich verbessert werden. Durch die Verwendung eines Elektrolytgefäßes wurden das Rauschen und die Drift der pH-Messung verringert, und durch die Untersuchungen zum platinieren Platindraht wird es erstmals möglich, eine kostengünstige und biokompatible Referenzelektrode herzustellen.

4.1.1 Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode

Drei Arten von Ag/AgCl-Referenzelektroden wurden untersucht:

- 1) chlorierte Silberdrähte, die mindestens eine Woche im Einsatz waren
- 2) frisch chlorierte Silberdrähte
- 3) frisch chlorierte Silberdrähte mit zusätzlicher Verwendung eines Elektrolytgefäßes (Microelectrodes, Inc., Bedford, New Hampshire, USA, www.microelectrodes.com)

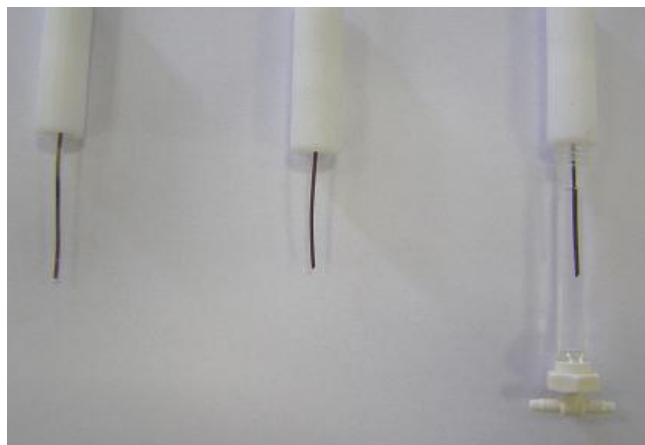


Abbildung 4-1: Referenzelektroden: gebrauchter chlorierter Silberdraht links, frisch chlorierter Silberdraht mitte und frisch chlorierter Silberdraht mit Elektrolytgefäß rechts.

Zur Charakterisierung wurde das Potential an den drei Typen von Referenzelektroden jeweils für 12 h ($n \geq 3$) gegenüber einer Makro-Referenzelektrode (Ag/AgCl-Elektrode für VA,

6.0728.010, Metrohm AG, Herisau, Schweiz, www.metrohm.com) gemessen und Drift sowie Rauschen ermittelt²²³. Die Messsignale waren nach ca. 60 Minuten eingeschwungen (vorher trocken). Nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Langzeitmessungen zusammen:

Tabelle 4-1: Drift und Rauschen verschiedener Ag/AgCl-Referenzelektrodensysteme (n >=3).

Typ	Bezeichnung	Drift ($\frac{mV}{h}$)	Rauschen (V)
1)	Ag/AgCl (alt)	-0,3 bis -2,4	$2.71 \cdot 10^{-4}$ bis $5.00 \cdot 10^{-4}$
2)	Ag/AgCl (neu)	-0,62 bis -1,94	$3.35 \cdot 10^{-4}$ bis $6.32 \cdot 10^{-4}$
3)	Ag/AgCl (Elektrolytgefäß)	0,005 bis 0.08	$1.57 \cdot 10^{-4}$ bis $1.91 \cdot 10^{-4}$

In nachfolgender Abbildung sind Beispielmessungen einer gebrauchten Ag/AgCl-Referenzelektrode sowie einer neuen Ag/AgCl-Referenzelektrode mit Elektrolytgefäß gezeigt. Die größere Drift und das größere Rauschen der gebrauchten Variante sind deutlich zu erkennen.

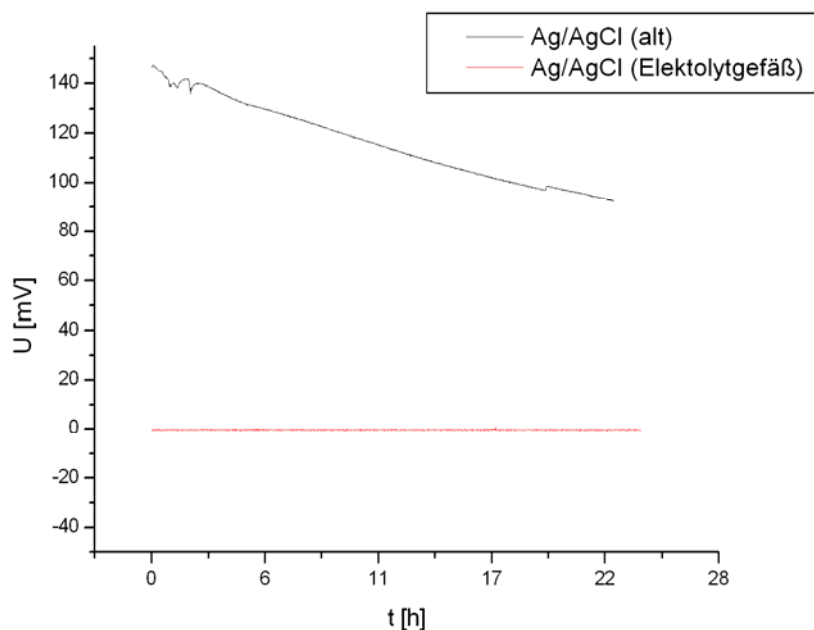


Abbildung 4-2: Exemplarische Messung der Signalstabilität von zwei Ag/AgCl-Referenzelektroden (aus Messreihe n >= 3).

4.1.2 Platiniertes Platindraht als Bezugssystem

Zwei Arten von platinieren Platin-Quasi-Referenzelektroden sowie ein blanker Platindraht wurden untersucht⁸⁷. Das Potential an den beiden Typen von Referenzelektroden wurde jeweils für 20 Stunden gegenüber einer Makro-Referenzelektrode (siehe Kapitel 4.1.1) gemessen. Die Messsignale waren nach 8-14 Stunden eingeschwungen. Es wurde zudem ermittelt, dass eine Lagerung der Elektrode in PBS vor der eigentlichen Messung die Einschwingzeit nicht verkürzt. Das Rauschen lag im Mittel bei ca. 1mV. Nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Langzeitmessungen zusammen:

Tabelle 4-2: Drift und Einschwingzeit verschiedener Pt/Pt schwarz Quasi-Referenzelektrodensysteme.

Typ	Bezeichnung (nach Tabelle 3-1)	Drift ($\frac{mV}{h}$)	Einschwingzeit (h)
1)	Pt-Lösung 1	-0,62	14
2)	Pt-Lösung 2	-1,25	8
3)	Pt-blank	-1,30	12

Abbildung 4-3 zeigt Beispielmessungen einer platinieren Platin-Quasi-Referenzelektrode sowie eines blanken Platindrahts. Die platinieren Variante zeigt ein schnelleres Einschwingen, geringere Drift und ein geringeres Rauschen.

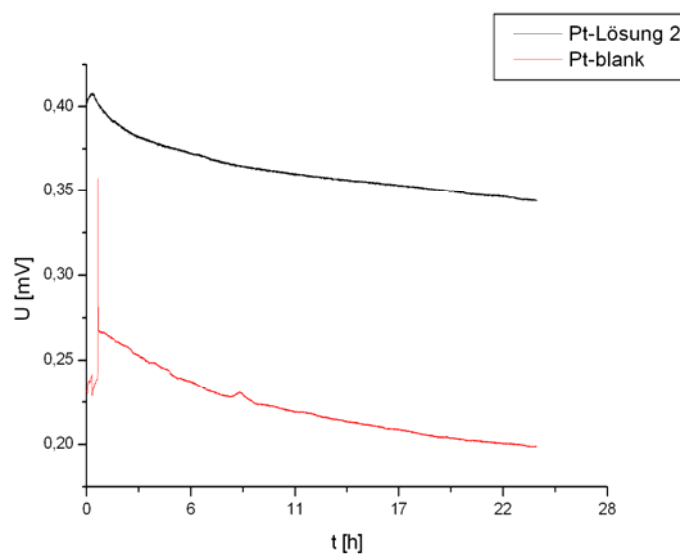


Abbildung 4-3: Exemplarische Messung der Signalstabilität von zwei Platin-Quasi-Referenzelektroden.

Zu beachten bei Anwendungen mit lebenden Zellen ist, dass sich bei einer Konzentrationsänderung um den Faktor 10 das Redox-Potential bei 25°C um 59,1 mV, bei 37°C aber um 61,5 mV verschiebt.

4.2 O₂-FET

Der O₂-FET konnte durch die Erweiterung der Sensorelektronik um das amperometrische Messprinzip erweitert werden. Außerdem wurde durch die Modellierung und Simulation klar, dass ein diffusionsbasiertes Modell genügt um die Vorgänge am O₂-FET zu beschreiben.

4.2.1 Amperometrie + ISFET

In Abbildung 4-4 ist die Beschaltung eines ISFETs gezeigt⁹⁵. IC21 ist ein Differenzverstärker. In diesem Schaltungsteil wird die Spannung am Drain des ISFETs um die Spannung U_{DS_E} gegenüber Source eingestellt. Die Spannung U_{DS_E} kann variabel vom *PIC-Board* des IMOLA (siehe Abbildung 4-23) vorgegeben werden.

$$U_{ISFET_E_DRAIN} = U_{ISFET_E_SOURCE} - U_{DS_E} \quad 4-1$$

IC22, R5 und IC5c bilden einen Spannung/Strom-Konverter. Über die eingestellte Spannung U_{IDS_E} kann der Strom zwischen Drain und Source eingestellt werden. Die Spannung U_{IDS_E} kann variabel vom *PIC-Board* des IMOLA vorgegeben werden.

$$I_{ISFET_E_SOURCE} = \frac{-U_{IDS_E}}{R5} \quad 4-2$$

IC5a und IC5d sind Spannungsfolger, die nachgeschaltet sind, um die Ausgänge der Regelschaltungen nicht durch einen Stromfluss zu belasten. Messgröße der Schaltung ist ISFET_E_SIGNAL. Die Änderung an ISFET_E_SIGNAL entspricht der Änderung des Potentials zwischen Gate und der Messflüssigkeit. Das Signal ISFET_E_DRAIN ist mit dem Drain-Anschluss des ISFETs verbunden. Das Signal ISFET_E_SOURCE ist mit dem Source-Anschluss des ISFETs verbunden. Zusätzlich muss noch die Referenzelektrode mit dem Massesignal der Schaltung verbunden werden.

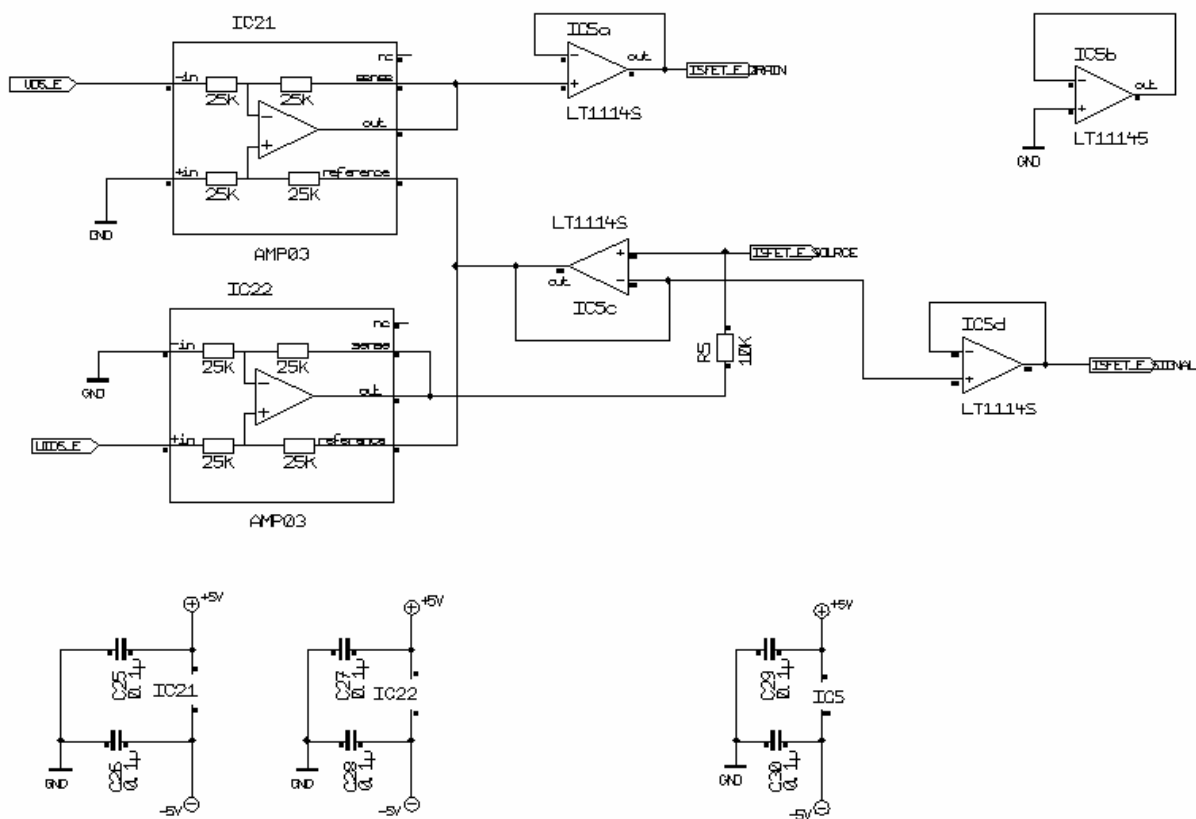


Abbildung 4-4: Schaltbild der Sourcefolgerschaltung zum Betrieb des ISFETs.

Abbildung 4-5 zeigt die galvanisch getrennte Beschaltung der Edelmetallelektrode des O₂-FET. Eine galvanische Trennung zwischen ISFET-Beschaltung und Beschaltung der Edelmetallelektrode ist notwendig, da ansonsten Ströme zwischen der Edelmetallelektrode und der Referenzelektrode des ISFETs fließen können. Solche Ströme würden zum einen die amperometrische Messung des Sauerstoffs verfälschen und zum anderen die Langzeitstabilität der Referenzelektrode verringern bzw. den Potentialabfall über die Referenzelektrode verändern.

IC8 und IC14 sind Signalwandler zwischen der galvanisch getrennten Regelschaltung und dem *PIC Board*. IC3 ist ein Operationsverstärker, der Spannung an CE_O2_B dergestalt regelt, dass die Spannung an RE_O2_B der vorgegebenen Spannung an V_O2_B entspricht. IC4 und R2 bilden einen Strom/Spannungs-Wandler, der den Strom zwischen RE_O2_B und WE_O2_B als Spannungswert O2_B_SIGNAL ausgibt.

$$U_{O2_B_SIGNAL} = R2 \cdot (-I_{WE_O2_B})$$

4-3

IC22 ist eine Referenzspannungsquelle. Durch sie wird das Bezugspotential der Schaltung verschoben. Dies erlaubt es, an der Arbeitselektrode sowohl negative als auch positive Spannungen gegenüber der Referenzelektrode einzustellen. R4 und C46 sowie R20 und C54 sind Filter.

$$I_{WE_O2_B} = - \frac{U_{IC22} - U_{O2_B_SIGNAL}}{R2} \quad 4-4$$

Das Signal CE_O2_B ist mit der Hilfselektrode, das Signal RE_O2_B mit der Referenzelektrode und das Signal WE_O2_B mit der Arbeitselektrode des Sauerstoffsensors verbunden.

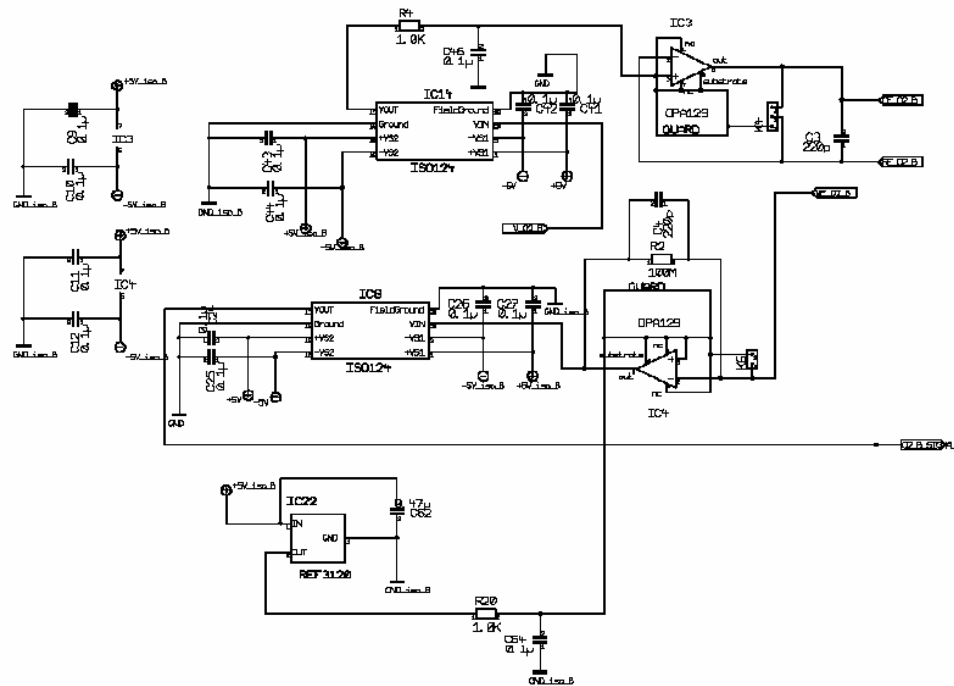


Abbildung 4-5: Schaltbild der galvanisch getrennten Potentiostatschaltung zum Betrieb des amperometrischen Sensorteils.

4.2.2 Modellierung

Durch Umsetzung des in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen Diffusionsmodells konnten nachfolgende Simulationsergebnisse gewonnen werden und mit realen Messungen verglichen werden.

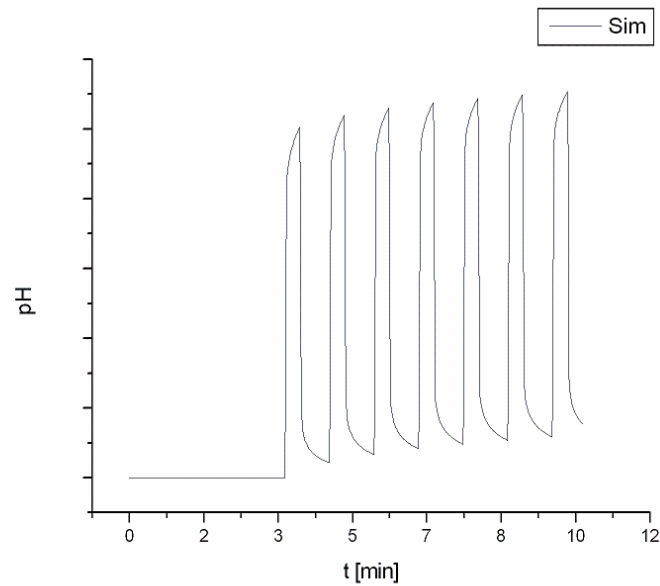


Abbildung 4-6: Simulationsergebnis des Diffusionsmodells.

Das Simulationsergebnis zeigt ähnliche Verschiebungen in der Signalhöhe, wie die reale Messung in Abbildung 3-8. Somit wird der vormals unerklärbare Versatz in der Signalhöhe (vgl. Kapitel 3.1.2.2) durch die simulierte Diffusion der Ionen erklärbar.

4.2.3 Messung mit Kalibrierflüssigkeit

Abbildung 4-7 zeigt die Reaktion des O₂-FET auf eine Änderung des DO von 100% auf 0% im Vergleich zu einem amperometrischen und einem optischen Gelöst-Sauerstoff-Sensor¹²⁵. Die Ansteuerspannung der Edelmetallelektrode des O₂-FET wurde wie in Abbildung 3-7 gewählt. Das bedeutet, dass die Sprünge in der Kurve des O₂-FET auf die Umschaltung zwischen DO- und DO- mit gleichzeitiger pH-Messung zurückgehen. Zur Änderung der DO-Konzentration wurde Glukoseoxidase, wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben, verwendet. Während Messzyklus 2 wird somit in sauerstoffgesättigtem Medium gemessen, während in Messzyklus 3 der Sauerstoff im Messmedium entfernt wurde.

Die Messungen zeigen eine Reaktionszeit des amperometrischen Sensors im Millisekunden-Bereich sowie eine Drift kleiner 0,02 nA dieses Sensors. Der optische Sensor zeigt eine größere Reaktionsrate von ca. 60 Sekunden sowie eine geringe Hysterese (Daten nicht abgebildet).

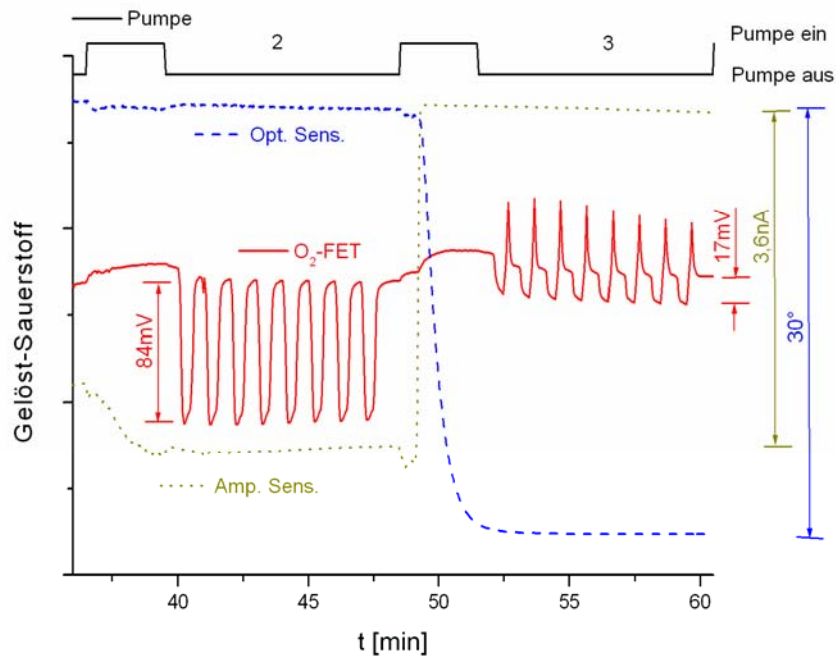


Abbildung 4-7: Reaktion des O₂-FET auf eine Änderung des DO von 100% (Messzyklus 2) nach 0% (Messzyklus 3) und Vergleich mit der Reaktion eines amperometrischen und optischen Sensors.

Der O₂-FET zeigte wie der amperometrische Sensor keine Hysterese, allerdings eine Drift von ca. 12 mV/h. Da der O₂-FET quasi-gleichzeitig DO und pH misst, ist auch die pH-Änderung, verursacht durch die Bildung von Gluconsäure (vgl. Kapitel 2.8.2) im Sensorsignal zu erkennen. Der Versatz in der Signalhöhe ist Diffusionsbedingt und wurde durch die in dieser Arbeit vorgestellten Simulationen (vgl. Kapitel 4.2.1) erklärbar.

4.2.4 Messung an lebenden Zellen

Abbildung 4-8 zeigt die Atmungsaktivität von Hefezellen in RPMI 1640^{XVIII} mit 50 µg/ml Gentamicin und 10 mM D-Glukose^{XIX}. Diese wird mit drei verschiedenen DO-Sensoren gemessen um deren Eigenschaften zu vergleichen. Der amperometrische Sensor (hier bedeutet ein hoher Signalwert eine geringe DO-Konzentration) zeigt wie der O₂-FET (Abnahme von 26 mV auf 22 mV) eine schnelle Reaktionszeit und einen identischen Kurvenverlauf. Mit dem O₂-FET ist es wieder zusätzlich möglich, auch den pH-Wert, sprich die extrazelluläre Ansäuerung der Hefen, zu messen (Hüllkurve des Signalverlaufs).

^{XVIII} RPMI ist ein Zellkulturmedium, das am Rosewell Park Memorial Institute entwickelt wurde (Merck, RPMI 1640, www.merck.de).

^{XIX} D-Glukose ist Traubenzucker und dient zur Anregung der Stoffwechselaktivität der Hefezellen.

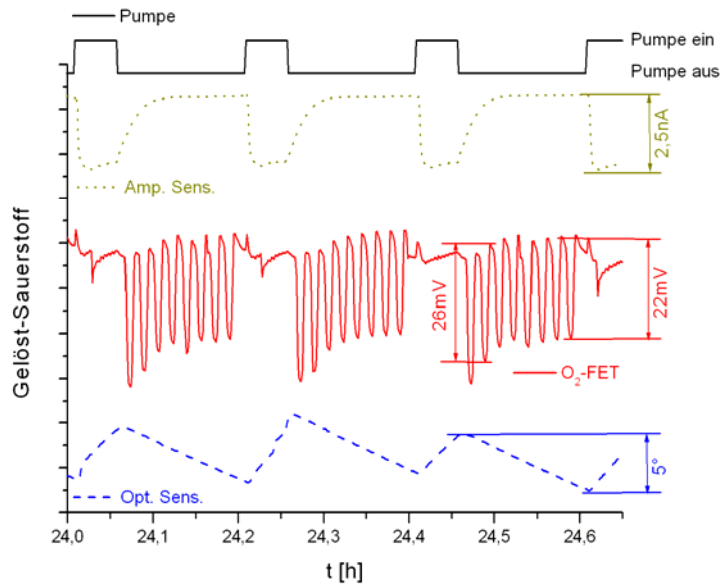


Abbildung 4-8: Aufzeichnung der Atmungsaktivität von Hefezellen mit einem O₂-FET, einem amperometrischen und einem optischen Sensor.

Der optische Sensor zeigt hier einen verhältnismäßig trägen Signalverlauf. Die Tendenz der zellulären Atmung und die Pumpzyklen sind aber deutlich zu erkennen.

4.3 Kohlenstoff-Nanoröhrchen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden so genannte Multi-Wall-CNTs (CNT-MW, Future Carbon GmbH, Bayreuth, Deutschland, www.future-carbon.de) verwendet.

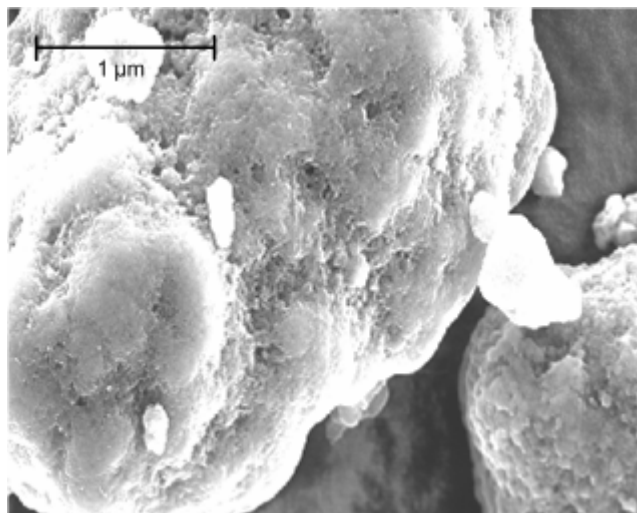


Abbildung 4-9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines CNT-Verbunds.

Abbildung 4-9 zeigt eine Aufnahme eines Verbunds solcher CNTs mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM). Verschiedene Herstellungsverfahren zum Prozessieren der CNTs wurden untersucht²²⁴. Unter anderem gelang es mit einer Disperbyk-2150-Lösung nach Zhao & Gao²²⁵ eine stabile Lösung mit CNTs herzustellen²²⁶. Allerdings waren Elektroden, die mit einer solchen Lösung gefertigt wurden, nicht biokompatibel und somit wurde die Herstellungsmethode nicht weiter verfolgt. Nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Biokompatibilitätstest mit der Disperbyk-2150-Lösung.

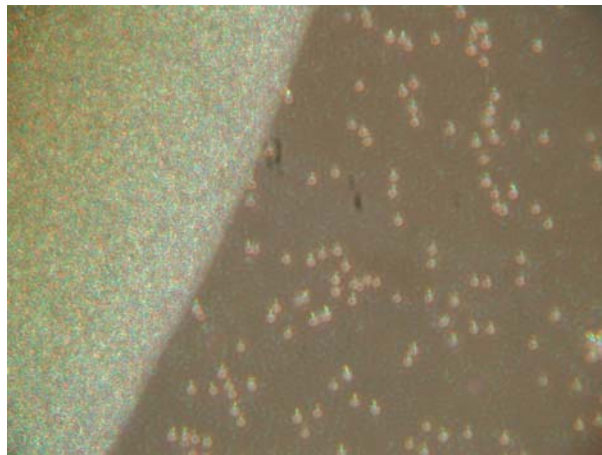


Abbildung 4-10: Biokompatibilitätstest der Disperbyk-2150-Lösung. Links: getrocknete Lösung auf Zellkulturplatte, rechts: tote L929-Zellen (Vergrößerung: 40fach).

Ein Biokompatibilitätstest der reinen, partikulären CNTs zeigte volle Biokompatibilität der Kohlenstoff-Nanoröhrchen. Nachstehende Abbildung 4-11 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Tests:

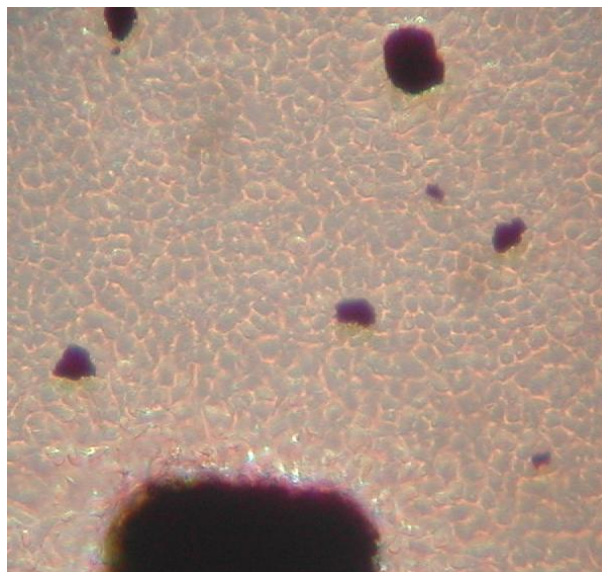


Abbildung 4-11: Biokompatibilitätstest mit nicht zerkleinerten Kohlenstoff-Nanoröhrchen. Die L929-Zellen wachsen fest an der Oberfläche der Zellkulturplatte sowie an den CNT-Knäueln an (Vergrößerung: 40fach).

Schließlich wurde als labortaugliche Herstellungsvariante die so genannte „Dip“-Methode etabliert²²⁷: Ein metallischer Leiter wurde mit Leitgold (Gold Paste, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland, www.plano-em.de) bestrichen bzw. in Leitgold „gedipt“ und anschließend mit CNTs bestreut bzw. in CNT-Pulver „gedipt“. Abbildung 4-12 zeigt einen solchen Versuchssensor.

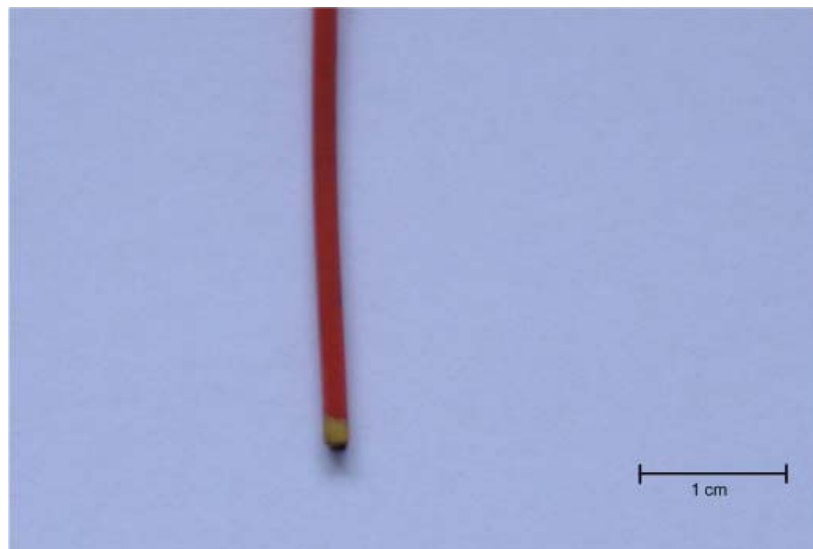


Abbildung 4-12: CNT-Sensor. Ein metallischer Leiter wurde erst in Leitgold und anschließend in CNT-Pulver „gedipt“.

In Abbildung 4-13 ist eine Gelöst-Sauerstoff-Messung mit CNT-Sensoren dargestellt. Die Potentialmessungen wurden mit einem Potentiostaten (PGZ 402, Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark, www.radiometer.com) durchgeführt.

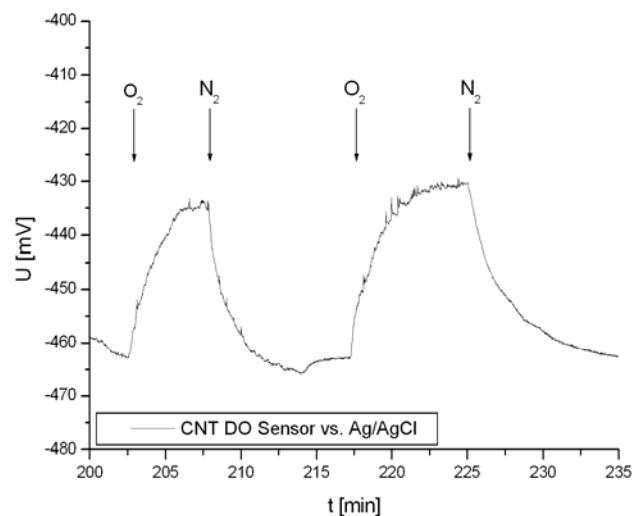


Abbildung 4-13: CNT-Sensor-Messung. Die Gelöst-Sauerstoff-Konzentration im Messmedium (PBS) wurde durch Begasung des Mediums mit Sauerstoff bzw. Stickstoff variiert.

Als Messmedium wurde PBS (pH 7,2) verwendet. Der Versuchsaufbau (Abbildung 3-11) wurde in einem Faradayschen Käfig untergebracht. Die DO-Konzentration im Messmedium wurde durch Begasung mit Stickstoff und Sauerstoff verändert. Abbildung 4-14 zeigt die Reaktionszeit eines CNT-Sensors. Bei dieser Messung wurde der DO durch Zugabe von Natriumsulfit reduziert.

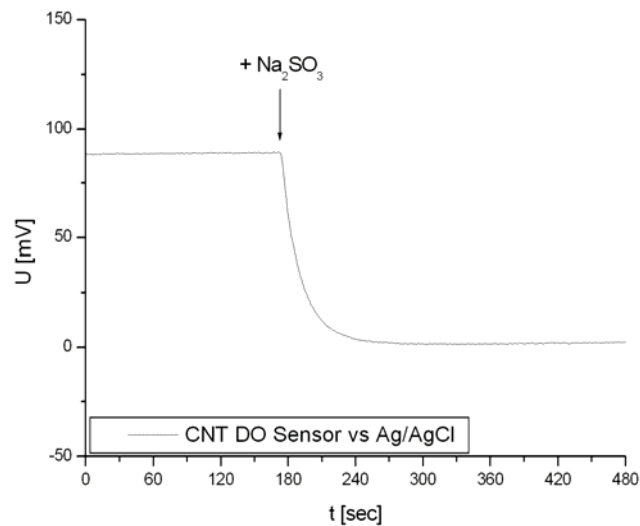


Abbildung 4-14: Ansprechzeit des CNT-Sensors. Der Gelöst-Sauerstoff im Messmedium wurde durch Zugabe von Natriumsulfit reduziert.

Abbildung 4-15 zeigt eine Voltammetrie eines CNT-Sensors und eines reinen Gold-Sensors.

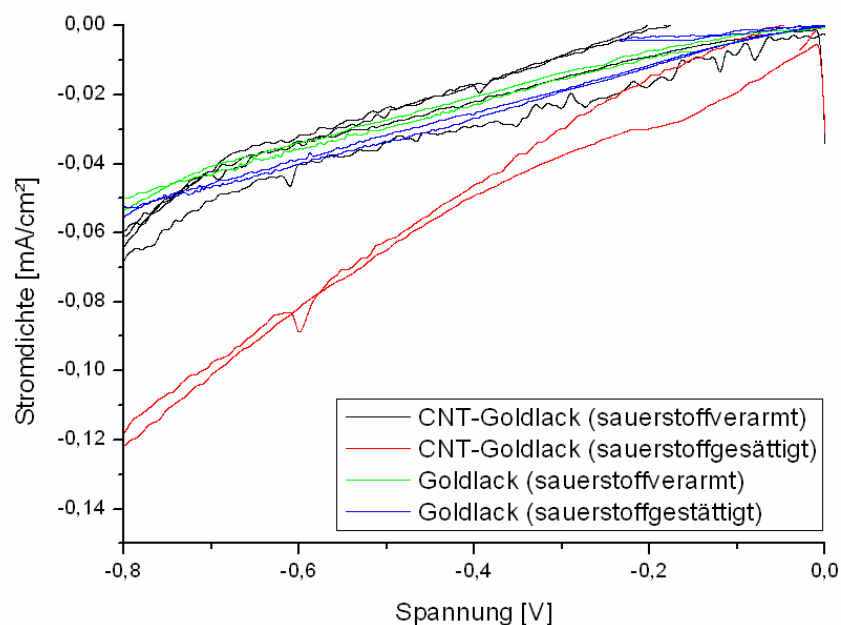


Abbildung 4-15: Voltammetrie des CNT-Goldlack-Sensors und eines Goldlack-Sensors ohne CNTs mit sauerstoffgesättigtem und sauerstoffverarmtem PBS. Nur der CNT-Goldlack-Sensor reagiert deutlich auf einen Unterschied in der DO-Konzentration.

Nur der Sensor, der mit CNTs aktiviert wurde, zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen sauerstoffverarmten und -gesättigten PBS. Die Verarmung der DO-Konzentration wurde durch Begasung mit Stickstoff vorgenommen.

Bei den untersuchten CNT-DO-Sensoren konnten keine Hysteresse-Eigenschaften beobachtet werden. Die Reaktionszeit t_{90} (Zeit bis zum Erreichen von 90% des Endwerts) beträgt ca. 40 Sekunden.

4.4 Modulares Lab-on-chip-System

Nachstehende Abbildung zeigt das modulare Prinzip des IMOLA-Systems. Lebende Zellen werden auf den BioChip gebracht, dieser wird dann an die Fluidik angeschlossen und mit der Elektronik kontaktiert.

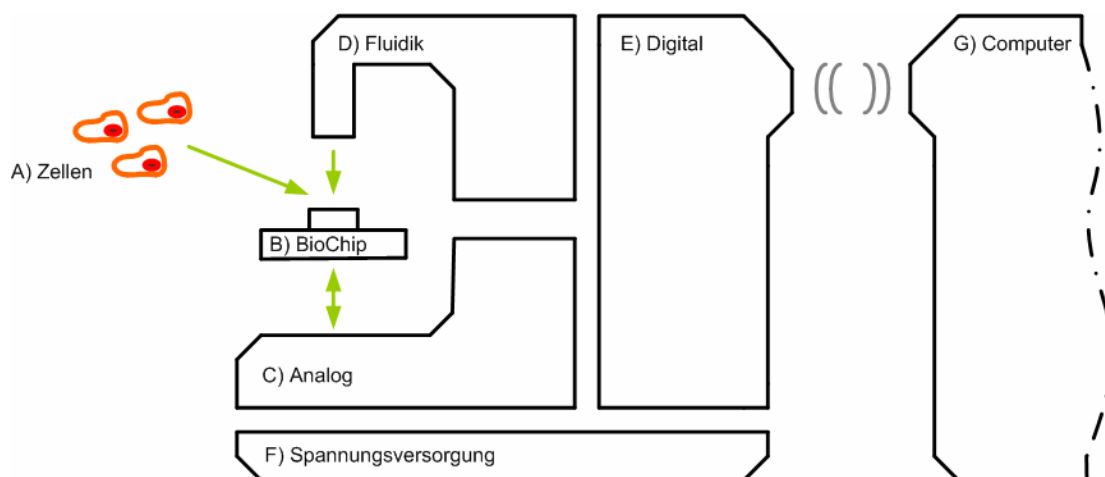


Abbildung 4-16: Prinziplskizze des IMOLA-Systems mit lebender Zellprobe (A), multiparametrischem Sensorchip (B), Analogmodul zum Betrieb der Mikrosensoren (C), Fluidikmodul zur Versorgung der Zellen mit frischem Medium und Wirksubstanzen (D), Digitalmodul zur Steuerung und Datenvorverarbeitung (E) und Computer (G) zur Konfiguration, Datenverarbeitung und Netzwerkanbindung.

Nachfolgend werden die einzelnen Module aus Abbildung 4-16 detailliert beschrieben:

A) Zellen

Verschiedene Zellen lassen sich mit dem System untersuchen. Diese Zellen werden unterschiedlich klassifiziert, z.B. nach adhätierenden und nicht-adhätierenden Zellen, nach Zellen aus der Kultur, Primärzellen oder Gewebeschnitten oder nach Zellen, die sich bei Raumtemperatur oder bei Körpertemperatur kultivieren lassen. Im Zusammenhang mit dem IMOLA-System werden die Zellen in zwei Hauptgruppen – die sich aus der Art der

Anwendung ergeben – eingeteilt. Bei der ersten Gruppe werden die Stoffwechseleigenschaften der Zellen untersucht (z.B. Chemosensitivitätsuntersuchungen^{4,228-230} oder Wirkstoffforschung), bei der zweiten Gruppe werden Umgebungsparameter der Zellen untersucht und die Zellen als Signalwandler verwendet (z.B. Wasserqualitätsmonitoring oder Ersatz von Tierversuchen).

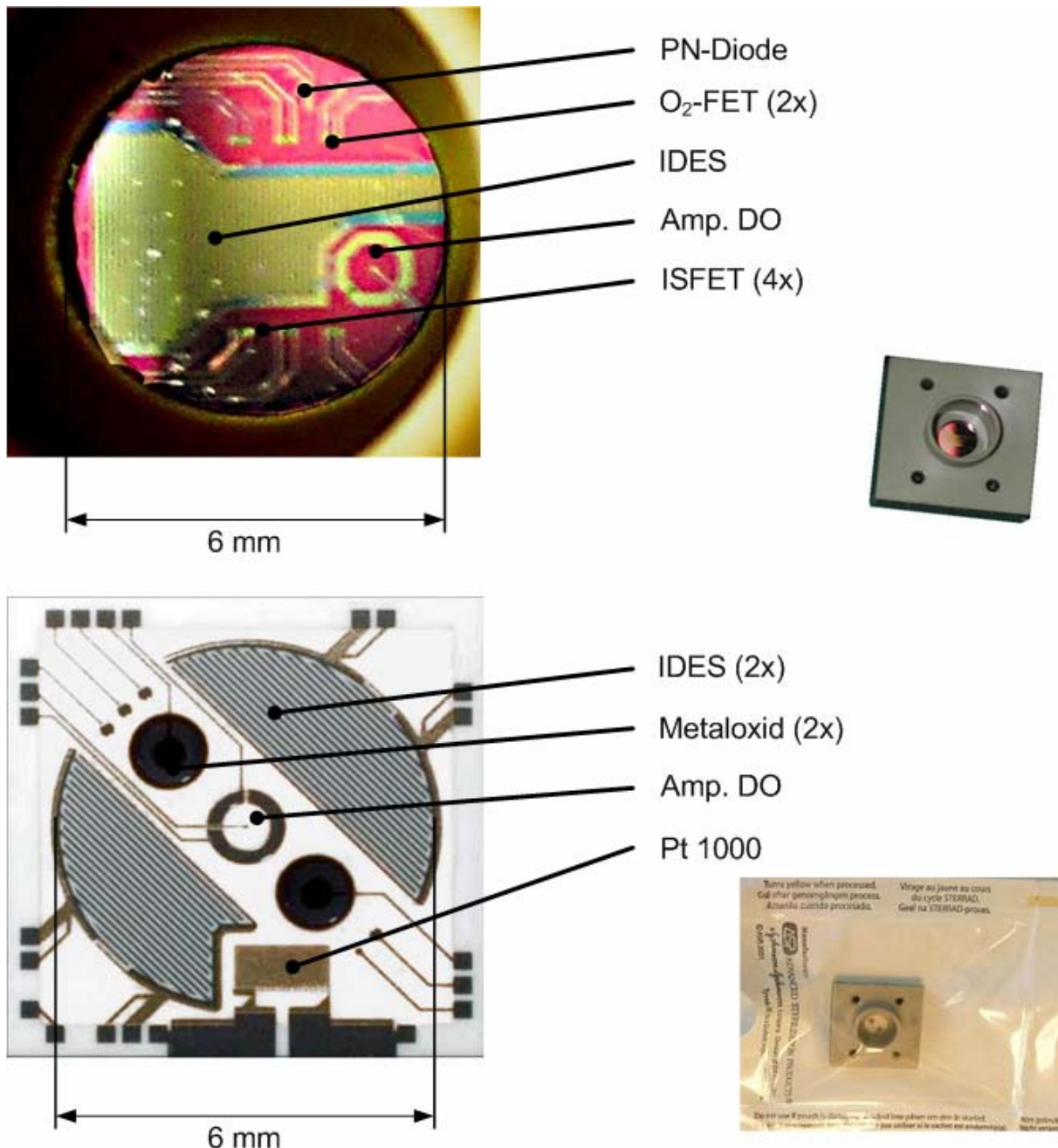


Abbildung 4-17: Unterschiedliche BioChips zum Betrieb im IMOLA. Oben: BioChip-S und die darauf befindlichen Mikrosensoren. Oben rechts: Verkapselter BioChip-S (Kantenlänge: 24mm). Unten: BioChip-C und die darauf befindlichen Mikrosensoren. Unten rechts: Verkapselter und steril verpackter BioChip-C (Kantenlänge: 24mm).

B) BioChip

Das IMOLA-System ist momentan für zwei BioChip-Varianten ausgelegt (Abbildung 4-17): zum einen zum Betrieb vom so genannten BioChip-S (Siliziumtechnologie), zum anderen zum Betrieb vom sogenannten BioChip-C (Dünnschichttechnologie).

Um von einer Chipvariante zur anderen zu wechseln, ist lediglich ein Austausch des Analogmoduls (C) notwendig.

C) Analog

Das Analogmodul enthält die verschiedenen Elektronik-Baugruppen, die zum Betrieb der jeweiligen Mikrosensoren notwendig sind. Das Analogmodul für den BioChip-S ist ausgelegt, um vier ISFETs, einen O₂-FET, einen amperometrischen DO-Sensor und eine pn-Diode als Temperatursensor zu betreiben. Das Analogmodul für den BioChip-C ist ausgelegt, um zwei Metalloxid pH-Sensoren, einen amperometrischen DO Sensor und einen Pt1000 zu betreiben. Der detaillierte Aufbau des BioChip-S Analogmoduls ist in Abbildung 4-23 (Silicon Board) dargestellt, der detaillierte Aufbau eines BioChip-C Analogmoduls ist in Abbildung 4-24 (Ceramic Board) abgebildet. Die realisierte Elektronik zur Messung des DO ist in Abbildung 4-5 und wurde bereits in Kapitel 4.2 detailliert beschrieben.

D) Fluidik

Das Fluidikmodul enthält eine Pumpe, deren Ansteuerung, ein Abfallgefäß und mindestens ein Quellgefäß für das Zellkulturmedium. Details zum Fluidiksystem werden in Kapitel 4.4.2 beschrieben. Die Modularität des Aufbaus spiegelt sich auch im Fluidikmodul wieder. Je nach Applikation kann eine Variante mit miniaturisierter Piezopumpe (siehe Abbildung 4-18) oder mit stationärer n-fach Peristaltikpumpe (siehe Abbildung 4-19) gewählt werden.

E) Digital

Das Digitalmodul dient zur Kommunikation mit dem Computer, zur Datenzwischenspeicherung und zur Steuerung der Fluidik und des Analogmoduls. Je nach verwendetem Analogmodul muss der Mikrocontroller mit einer entsprechenden embedded software programmiert werden. Der detaillierte Aufbau des Digitalmoduls (PIC Board) kann Abbildung 4-23 oder Abbildung 4-24 entnommen werden.

F) Spannungsversorgung

Die Spannungsversorgung des IMOLA-Systems kann optional über einen integrierten Akku oder stationär über 230V Netzteile realisiert werden.

G) Computer

Dieses Modul ist momentan als *Client Applikation* lokal auf einem Laptop realisiert. Es beinhaltet eine Konfigurationsoberfläche (siehe Abbildung 1-1 und Abbildung 4-18) und eine Messwertanzeige für die verschiedenen Mikrosensoren.

Nachstehende Abbildung zeigt ein IMOLA mit Steuerlaptop für den mobilen Einsatz. Hier ist das IMOLA mit integrierter Spannungsversorgung, miniaturisierter Piezopumpe und mobiler Medienversorgung ausgestattet.



Abbildung 4-18: Rechts: IMOLA mit Fluidikmodul und integrierter Spannungsversorgung. Links: Laptop mit drahtloser Schnittstelle und Steuersoftware.

In Abbildung 4-19 ist ein stationärer 6fach Aufbau des IMOLA-Systems abgebildet. Hier ist das System steril (mit geschlossenem Fluidikkreis) im Inkubator aufgebaut. Die Fluidversorgung ist über eine Peristaltikpumpe realisiert. Die Datenkommunikation erfolgt drahtgebunden über ein CAN-Bus-System²³¹. Durch die Vernetzung via CAN-Bus können beliebig viele IMOLA parallel betrieben werden²³². Dies ermöglicht den Aufbau großer Testketten zur parallelisierten und standardisierten tiermodellfreien Erprobung neuer Wirkstoffe.



Abbildung 4-19: Stationärer 6-fach IMOLA Aufbau zur parallelen Untersuchung von sechs Zellproben.

4.4.1 Kontaktierung

Verschiedene Arten von lösbaren Kontaktierungsmöglichkeiten wurden auf Höhe und Reproduzierbarkeit des Übergangswiderstands untersucht.

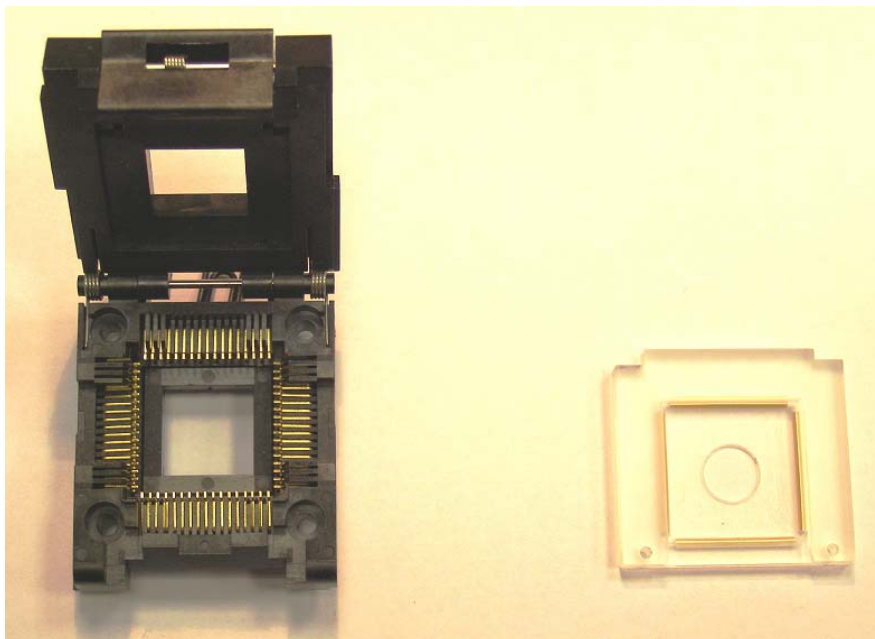


Abbildung 4-20: Alte (links) und neue Kontaktierung (rechts). Der PLCC-Testsockel (Federkontakteleiste) wurde durch Goldkontaktstreifen in einer selbstgefertigten Kunststoffhalterung ersetzt. Die Länge eines Goldkontaktstreifens beträgt 24 mm.

Die bisher eingesetzten PLCC-Testsockel (Yamaichi Electronics Deutschland GmbH, München, Deutschland, www.yeu.com) hatten sich im praktischen Betrieb als störanfällige Lösung erwiesen, da die Übergangswiderstände bei wiederholtem Einlegen der Chips stark schwanken. Da im Routinebetrieb je nach Sorgfalt des Benutzers nicht ausgeschlossen werden kann, dass Flüssigkeit auf die Kontakte kommt, war die Wartbarkeit ungünstig. Zum Austausch eines PLCC-Testsockels mussten 68 Lötverbindungen gelöst werden. Es wurden Federkontaktleisten (Samtec Germany, Germering, Deutschland, www.samtec.com) und Kontaktelemente, wie Zebra Strips mit Kohlenstoff oder Goldleiter und Goldkontaktstreifen (Shin-Etsu Polymer Co. Ltd, Venlo, Niederlande, www.shinetsu.co.jp/e/) untersucht²³³. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 4-3: Übergangswiderstand und Reproduzierbarkeit verschiedener Kontaktelemente.

Bezeichnung	Übergangswiderstand ($m\Omega$)	Standardabweichung $n = 10$
Federkontaktleiste	30 ± 15	6
Zebra Strip (C)	45 ± 15	11
Zebra Strip (Au)	50 ± 15	9
Goldkontaktstreifen	20 ± 5	3

Es zeigt sich, dass die Goldkontaktstreifen sowohl in der Höhe des Übergangswiderstands als auch in der Reproduziergenauigkeit vorteilhaft sind.

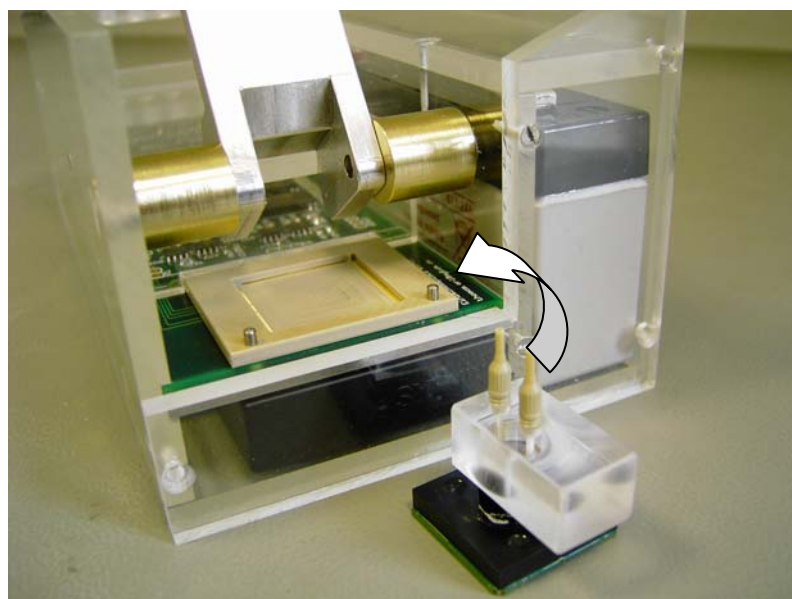


Abbildung 4-21: Kontaktierung zwischen BioChip (vorne) und IMOLA (Goldkontaktstreifen). Zum Betrieb wird der BioChip in die Goldkontaktstreifen-Halterung eingelegt.

Eine Führung zum Einlegen der Messchips wurde ebenfalls realisiert, die zugleich einen konstanten Anpressdruck einstellt (Abbildung 4-21). Der Führungssockel enthält Nuten für die Goldkontaktstreifen und ist über Führungsstifte über der Platine fixiert. Hierdurch lässt sich die Verbindung einfach lösen und eine einfache Wartbarkeit ist gegeben.

4.4.2 Fluidiksystem, Modularer Systemaufbau

Zur Abschätzung, ob eine laminare Strömung in den Schlauchleitungen des IMOLAs vorliegt, wurde die Reynoldszahl^{xx} berechnet²³⁴:

$$\text{Re} = \frac{w \cdot l}{\nu} \quad 4-5$$

Mit

Re Reynoldszahl

w charakteristische Geschwindigkeit

l Länge

ν kinematische Viskosität

Mit Re Reynoldszahl w charakteristische Geschwindigkeit l Länge ν kinematische Viskosität Der Volumenstrom beträgt 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, der Schlauchinnendurchmesser ist 0,8 mm. Daraus ergibt sich eine Strömungsgeschwindigkeit von $2\text{E}-3$ m/s. Als Näherungswert wird die kinematische Viskosität von Wasser verwendet. Diese ist bei 20°C $1\text{E}-6$ m^2/s . Daraus ergibt sich im vorliegenden Fall eine Reynoldszahl $\text{Re} = 0,16$. Ab einem Wert der Reynoldszahl von circa 2000 wird nicht mehr von einer laminaren Strömung, sondern von einer turbulenten Strömung ausgegangen²³⁵. Im Fall der IMOLA-Fluidik kann von einer laminaren Strömung ausgegangen werden. Der Druckverlust in der IMOLA Fluidik wurde mit Hilfe der Navier-Stokes-Bewegungsgleichung berechnet:

$$\frac{\Delta P}{l} = \frac{128 \cdot \eta \cdot w}{\pi \cdot d^2} \quad 4-6$$

^{xx} Die Reynoldszahl wird in der Strömungslehre verwendet und gibt das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften wieder.

Mit

ΔP Druckverlust

η dynamische Viskosität

Als Näherung wurde die dynamische Viskosität von Wasser verwendet, diese beträgt bei 20°C 1E-8 bar. Somit ergibt sich ein Druckverlust im Schlauch von ca. 0,003 bar/m. Dieser Wert beschreibt den Druckverlust für eine gerade Rohrleitung. Druckverluste im Einlauf und in Rohrkrümmungen können vernachlässigt werden²³⁶.

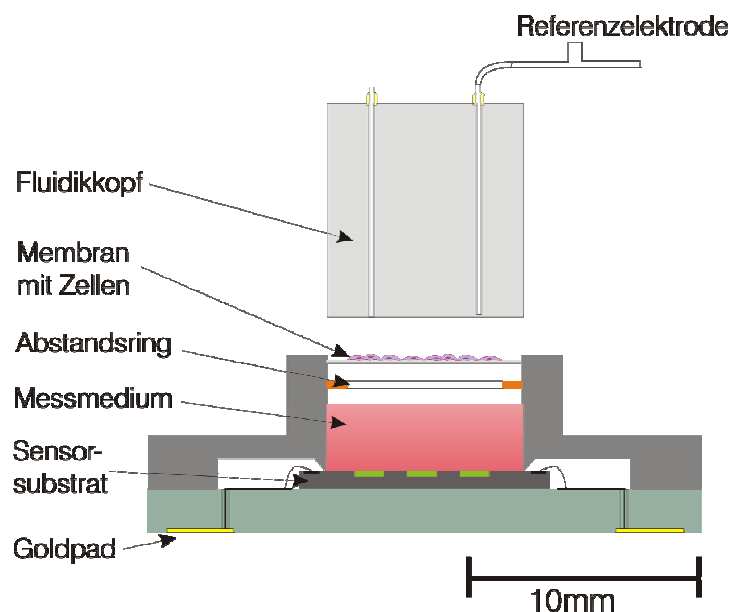


Abbildung 4-22: Prinzipieller Chipaufbau mit Kontaktierung zur Fluidik (Fluidikkopf) und Kontakt zur Sensorelektronik (Goldpad) (nach Brischwein et al.¹⁸³).

Abbildung 4-23 zeigt die Aufteilung der Elektronik in die Module Spannungsversorgung (*Relais Board*), Digitalteil (*PIC Board*), Keramik-Analogteil (*Silicon Board*) und IDES-Platine (*IDES Mezzaine Board*). Das *PIC Board* stellt die digitale Zentrale des IMOLAs dar. Herzstück ist ein Microcontroller aus der PIC-Familie (Microchip Technology Inc., Chandler, Arizona, USA, www.microchip.com). Das *PIC Board* kontrolliert alle notwendigen Schnittstellen zur Kommunikation mit dem PC (RS232 oder Bluetooth), der Fluidik (Pumpenkontrolle), dem Analogteil (A/D, D/A-Wandler via SPI-Bus, RS232) und internen Komponenten wie Echtzeituhr und Speicher (via I²C-Bus). Die (drahtgebundene) Kommunikation mit dem PC und die Spannungsversorgung laufen über das *Relais Board*. Zusätzlich ist dort ein Relais integriert, das im Falle einer externen Spannungsversorgung die Akkus in den Lademodus schaltet. Beim *IDES Mezzaine Board* handelt es sich um eine Auftragsentwicklung. Von dort können Real- und Imaginärteil des IDES-Sensors über ein

RS232-Protokoll ausgelesen werden. Die eigentliche Regelung der Sensoren erfolgt auf dem *Silicon Board*. Hier sind Schaltungen integriert, um eine Temperaturdiode, fünf ionensensitive Feldeffekttransistoren und zwei amperometrische Sauerstoffsensoren zu regeln und auszulesen.

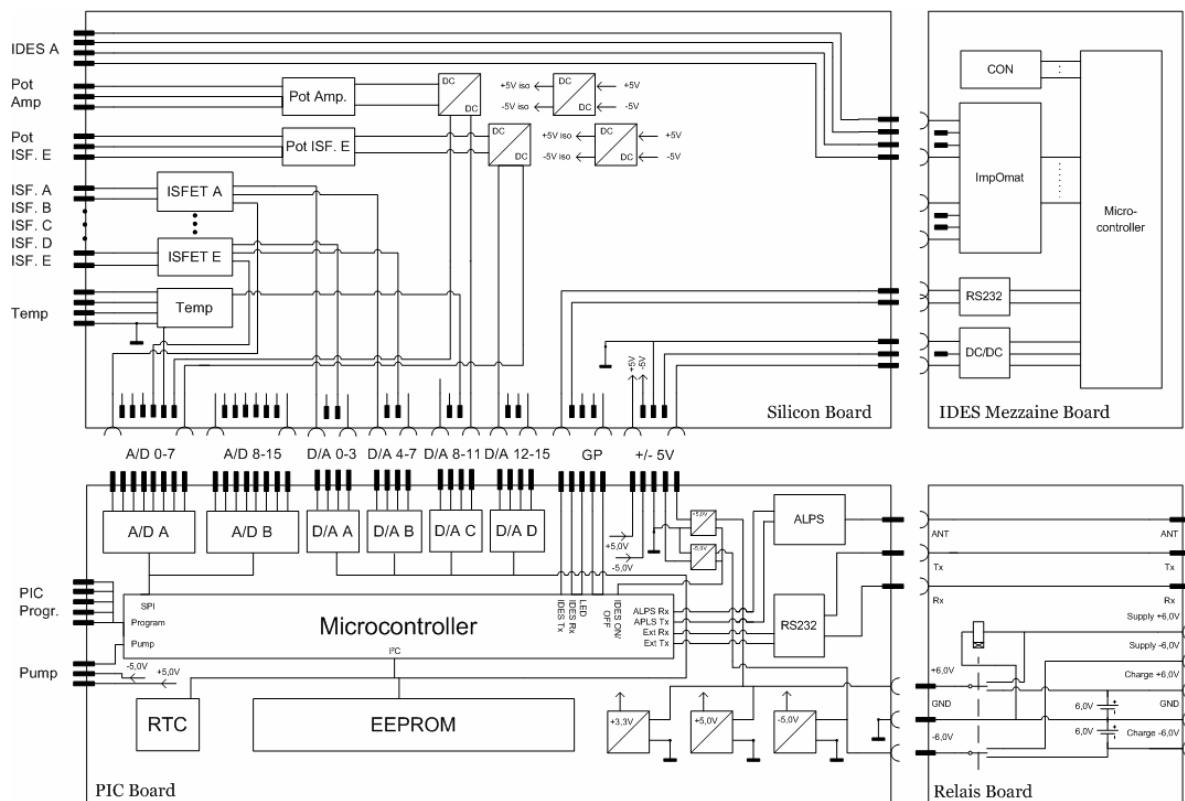


Abbildung 4-23: Modularer Aufbau der IMOLA-Elektronik (Siliziumvariante).

Zusätzlich und unter Nutzung des modularen Prinzips wurde auch eine Variante des IMOLAs realisiert, die es ermöglicht, Dünnschicht-Sensorchips (BioChip-C) zu betreiben. Hierzu wurde lediglich das Silicon Board durch das Ceramic Board ersetzt. Die Mikrosensoren auf dem BioChip-C unterscheiden sich nur im pH-Sensor. Daher enthält das Ceramic Board keine Elektronik für den Betrieb von ISFETs, sondern lediglich eine einfach potentiometrische Schaltung zum Auslesen eines Metaloxid-pH-Sensors. Nachstehende Abbildung 4-24 zeigt den Aufbau der IMOLA-Elektronik (Dünnschicht-Variante).

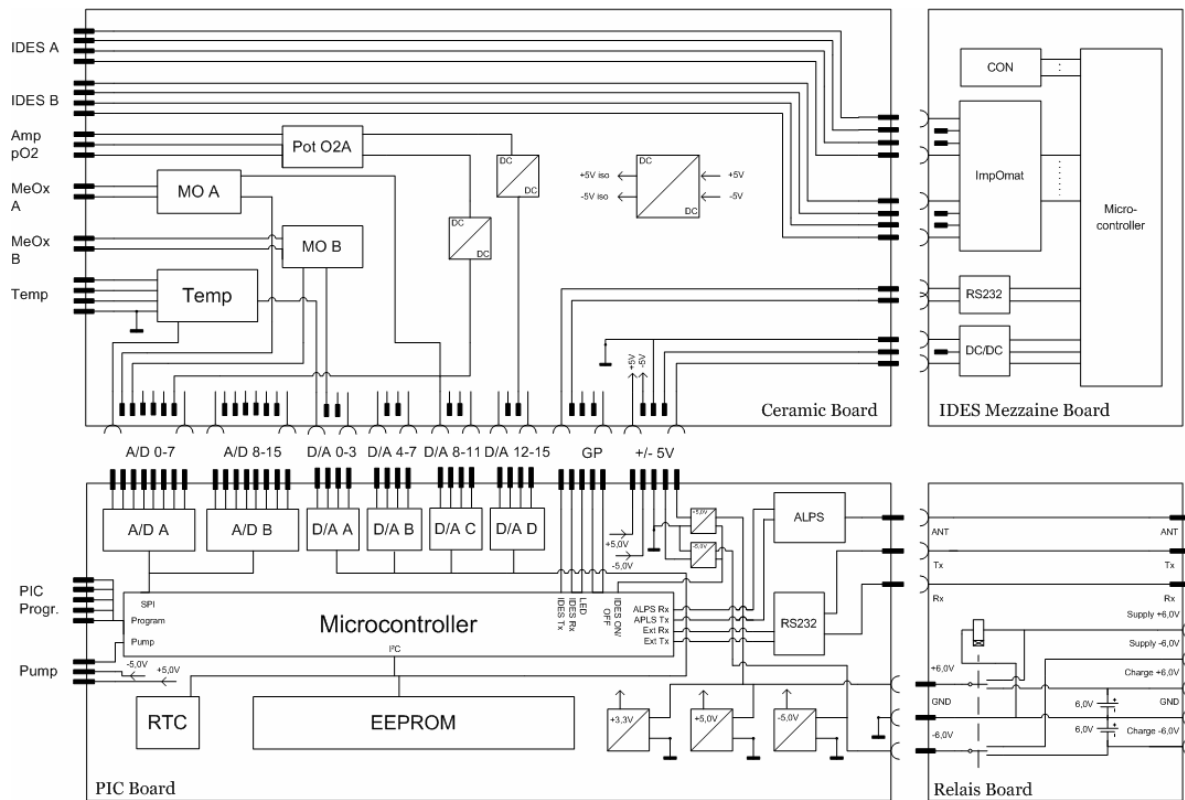


Abbildung 4-24: Modularer Aufbau der IMOLA-Elektronik (Dünnschichtvariante).

4.4.3 Funktionstest durch Messungen an lebenden Zellen

Es wurden verschiedene Applikationen mit den Varianten des IMOLAs entwickelt. Im Bereich Chemosensitivität wurden mit einem 6fach IMOLA-C MCF-7-Krebszellen^{XXI} untersucht²³⁷. Abbildung 4-25 zeigt exemplarisch eine Messung mit MCF-7-Zellen, bei der parallel zur zelluläre Atmung die extrazelluläre Ansäuerung gemessen wurde. Als Messmedium wurde *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM)^{XXII} mit 5% fötalem Kälberserum (englisch: *fetal calf serum* (FCS))^{XXIII} und 50 µg/ml Gentamicin^{XXIV} verwendet. Die Pumpe wurde im Stop- (7 min) und Go-Modus (3 min) mit 60 µl/min betrieben und das Zellkulturvolumen wurde auf 7 µl begrenzt. Es wurden Dünnschicht-Keramiksensorchips verwendet, die 48 Stunden mit 3*10E4 Zellen pro 300 µl bei 37°C vorinkubiert wurden. Die Umrechnung der angezeigten Spannung in den gemessenen Sensorstrom ergibt sich nach Gleichung 4-3 wie folgt:

^{XXI} MCF-7 ist eine adherente Zelllinie eines humanen Brustkrebs-Karzinoms (DSMZ No. ACC 115).

^{XXII} DMEM ist ein standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur (Sigma, D5648).

^{XXIII} Die genaue Zusammensetzung von FCS ist nicht bekannt, es enthält aber unter anderem Wachstumsfaktoren, die für die Kultivierung empfindlicher Zelllinien notwendig sind (Sigma, F7524).

^{XXIV} Gentamicin ist ein Antibiotikum und wird zur Bekämpfung von Bakterien eingesetzt (Sigma, G1272).

$$I_{DO} = \frac{U_{DO}}{100M\Omega} - 20,48nA$$

4-7

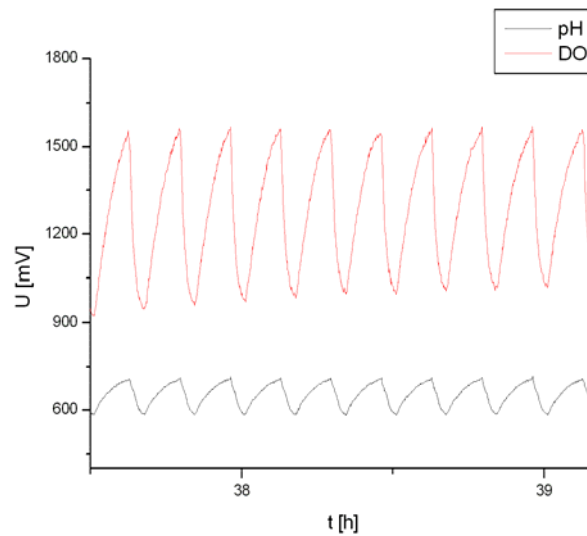


Abbildung 4-25: Zelluläre Atmung (DO) und extrazelluläre Ansäuerung (pH) von MCF-7 Zellen in DMEM mit 5% FCS und 50µg/ml Gentamicin. Der Rückgang auf den Basiswert erfolgt in jedem Pumpzyklus, wenn frisches Medium auf den BioChip transportiert wird.

Im Bereich Umweltmonitoring wurden mit der Siliziumvariante Untersuchungen zur Wasserqualität an der Grünalge *chlorella kessleri* bei Umgebungstemperatur durchgeführt²³⁸. Diese Algenspezies ist nach Rodriguez et al.²³⁹ besonders für Biomonitoring-Anwendungen geeignet. In dieser Applikation wurde der Fluidikkopf des IMOLAs zusätzlich mit LEDs versehen. Somit konnte die Photosyntheseaktivität der Grünalge stimuliert werden. Abbildung 4-26 zeigt exemplarisch eine solche DO-Messung mit einem amperometrischen DO-Sensor. Hierbei wurde die y-Achse auf 100% Sättigung normiert (d.h., der Wert 2 entspricht einer Verdoppelung der DO-Konzentration gegenüber der DO-Konzentration ohne Zellen). Im Versuch wurde ein Zellkulturmedium nach Zehnder und Gorham²⁴⁰ verwendet. Die Zellen wurden in einem Zellulosefilter immobilisiert (Volumen ca. 7 µl). Die Pumpe wurde 10 min im Stop- und 3 min im Go-Modus betrieben. Um die Eignung der Grünalge als Signalwandler zu zeigen, wurden 1 mg/l Metamitron^{XXV} für eine Stunde in die Fluidzufuhr eingeschleust. Der Rückgang der Photosyntheseaktivität ist deutlich zu erkennen. Wird die Zufuhr des Toxins gestoppt, erreichen die Zellen ihre ursprüngliche Aktivität innerhalb kurzer Zeit zurück.

^{XXV} Metamitron ist ein Unkrautbekämpfungsmittel, das u.a. durch Regen in Oberflächengewässer eingespült wird und dort in gefährlichen Konzentrationen auftreten kann (chemische Formel: 4-amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5 (4H)-on).

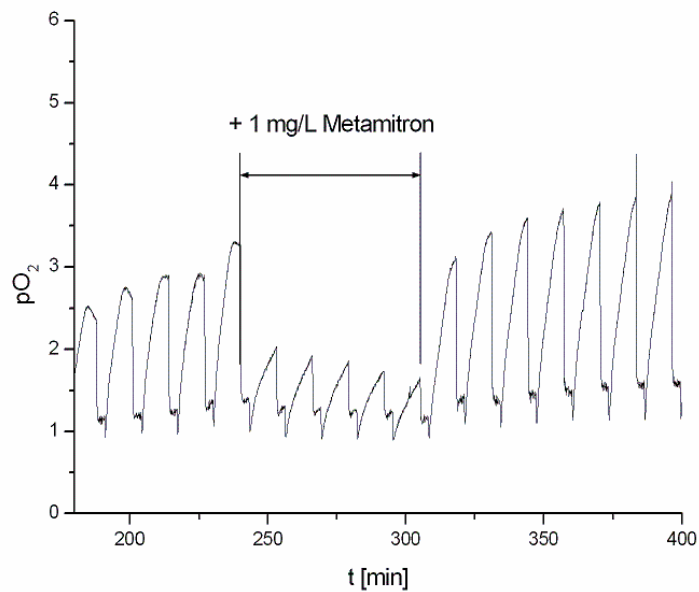


Abbildung 4-26: Monitoring der Photosynthese-Aktivität von Grünalgen und deren Hemmung durch das Herbizid Metamitron²³¹.

Tabelle 4-4 aus Stadthagen²⁴¹ fasst die Ergebnisse, die mit Algen als Signalwandler, mit einem IMOLA-Prototypen und mit BioChips in Siliziumtechnologie ermittelt wurden, zusammen. Diuron, Isoproturon, Metamitron und Metazachlor sind Herbizide, Primiricarb ist ein Insektizid und 17a-Ethinylestradiol (17a-EE) ist ein Östrogen und bildet den Hauptteil der Antibabypille. Solche Untersuchungen zur Wasserqualität gewinnen zunehmend an Bedeutung, da viele Rückstände aus Medikamenten in den Kläranlagen der Großstädte nicht abgebaut werden. Werden Medikamente in großer Anzahl verwendet und die Wirkstoffe z.T. vom Körper wieder abgegeben bzw. umgewandelt, kann es zu einer Aufkonzentration in den umliegenden Gewässern kommen. Am Beispiel des Hormons 17a-EE führt dies zu einer Veränderung der Fischpopulation²⁴². Zur Datenvalidierung wurden statische Analysen wie der Levene Test, die ANOVA-Methode, der Turkey-Test und der Games Howell-Test^{XXVI} durchgeführt.

^{XXVI} Levene Test, ANOVA, Turkey-Test und Games Howell-Test sind Methoden zur Varianzanalyse bzw. zur Untersuchung der statischen Validität bzw. Signifikanz von Daten.

Tabelle 4-4: Nachweis und Signifikanzanalyse verschiedener Toxine mit dem IMOLA (aus Dissertation Stadthagen²⁴¹, Kooperation mit dem Department für Ökologie und Ökosystemmanagement, Fachgebiet Limnologie an der Limnologischen Station Iffeldorf).

Versuch	Konzentration (µg/l)	Parameter	Levene's Test	ANOVA	Turkey-Test			Games-Howell-Test		
					I-II	I-III	II-III	I-II	I-III	II-III
Diuron	100	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,000	0,000
		pH	0,040	0,000				0,000	0,134	0,002
	10	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,349	0,000
		pH	0,664	0,000	0,000	0,345	0,006			
	5	O ₂	0,000	0,001				0,000	0,159	0,047
		pH	0,173	0,722	0,783	0,733	0,995			
1	O ₂	0,332	0,065	0,539	0,054	0,346				
	pH	0,733	0,362	0,486	0,370	0,974				
Isoproturon	100	O ₂	0,003	0,000				0,000	0,946	0,000
		pH	0,010	0,000				0,000	0,858	0,000
	10	O ₂	0,000	0,000				0,005	0,227	0,006
		pH	0,016	0,013				0,008	0,963	0,067
	5	O ₂	0,675	0,002	0,994	0,007	0,006			
		pH	0,047	0,741				0,633	0,985	0,845
Metamitron	500	O ₂	0,001	0,000				0,000	0,943	0,000
		pH	0,397	0,004	0,011	0,966	0,011			
	250	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,000	0,001
		pH	0,000	0,015				0,145	0,223	0,733
	100	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,175	0,000
		pH	0,661	0,564	0,979	0,722	0,564			
Metazachlor	500	O ₂	0,000	0,000				0,001	0,398	0,003
		pH	0,001	0,847				0,927	0,999	0,782
	250	O ₂	0,061	0,119	0,551	0,582	0,099			
		pH	0,050	0,203	0,252	0,255	1,000			
	100	O ₂	0,186	0,000	0,000	0,045	0,105			
		pH	0,604	0,640	0,647	0,973	0,767			
	10	O ₂	0,002	0,000				0,000	0,705	0,005
		pH	0,781	0,155	0,980	0,202	0,239			
Pirimicarb	300	O ₂	0,484	0,001	0,004	0,995	0,001			
		pH								
	200	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,572	0,000
		pH								
	100	O ₂	0,119	0,000	0,001	0,050	0,000			
		pH								
50	O ₂	0,000	0,000				0,016	0,460	0,000	
	pH									
17α-EE	100	O ₂	0,000	0,000				0,000	0,530	0,000
		pH								
	10	O ₂	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000			
		pH								
	1	O ₂	0,062	0,964	0,982	0,961	0,995			
		pH								

Mit dem 6fach Aufbau (Abbildung 4-19) wurden diverse Versuche an Tumorzellen durchgeführt. Exemplarisch wird nachstehend die Wirkung von Doxorubicin auf die humane Tumorzelllinie MCF-7 gezeigt. Im 6fach IMOLA wurden 2 BioChip-C mit Zellen und Wirkstoff, 2 BioChip-C mit Zellen ohne Wirkstoff und 2 BioChip-C ohne Zellen mit Wirkstoff betrieben. Tabelle 4-5 fasst die Versuchsparameter zusammen²³⁷. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt und zeigt mit dem vorliegenden Lab-on-chip-System eine kontinuierliche, Marker-freie Wirksamkeitsbestimmung eines Chemotherapeutikas.

Tabelle 4-5: Versuchsparameter zur Chemosensitivitätsanalyse von Doxorubicin auf MCF-7 Zellen²³⁷.

Parameter	Beschreibung
Aufteilung der 6 Chips pro Versuch:	4 Chips mit MCF-7 Zellen, 2 Chips als Kontrolle (nur Medium)
Vorinkubation der Zellen auf den Chips:	ca. 65 Stunden
Kulturmedium:	DMEM + 3,7 g/l NaHCO ₃ + 5% FCS
Messmedium:	DMEM + 5% FCS + 50 µg/ml Gentamycin
Zugabe von Doxorubicin:	23 bzw. 31 h nach Messbeginn
Konzentration des Doxorubicin im Messmedium:	1µM
Verteilung der Doxorubicinzugabe:	je 3 Chips (2x mit Zellen, 1x Kontrolle) mit Doxorubicin

In Abbildung 4-27 ist die Entwicklung des DO-Verbrauchs der Krebszelllinie MCF-7 dargestellt. Die Daten in dieser Graphik wurden aufgearbeitet, so dass die Pumpzyklen nicht mehr sichtbar sind. Es wurde die Veränderung der Steigung in den Messzyklen bestimmt und normiert. Die Graphik beginnt zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe und zeigt den Rückgang der zellulären Atmung von behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Damit wird eine individualisierte Chemotherapie ermöglicht. Krebspatienten kann nun vor Therapiebeginn eine Nadelbiopsie entnommen werden und die Wirksamkeit unterschiedlicher Chemotherapeutika kann an diesem individuellen Tumor untersucht werden. Damit hat der behandelnde Arzt die Möglichkeit, vor Therapiebeginn das jeweils wirksamste Therapeutikum auszuwählen. Zudem kann ermittelt werden, ob bestimmte Chemotherapeutika in diesem Fall wirkungslos sind. Dies verhindert unnötige Chemotherapien.

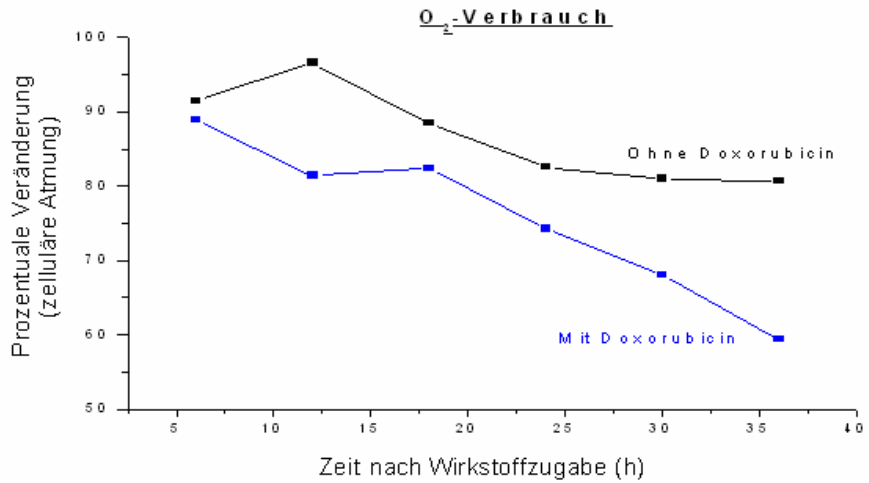


Abbildung 4-27: Prozentuale Änderung der zellulären Atmung von MCF-7 Zellen bei Zugabe von Doxorubicin²³⁷.

Bei den vorstehenden Messungen wurde parallel zum DO auch immer die Änderung im pH (Daten nicht abgebildet) aufgezeichnet.

Wer lange genug forscht, wird die schöpferische Kraft, das Geheimnis und die Wunder in der Natur nur noch schwer leugnen können und zum Mystiker werden und wenn nicht, dann bleibt er eben Chemiker.

Albert Hofmann

5 Bedeutung der neuen Ansätze für Lab-on-chip-Systeme

In diesem Kapitel werden die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und die Bedeutung für die Elektro- und Informationstechnik, die Zellbiologie und die Elektrochemie aufgezeigt.

5.1 Elektrochemische Bezugssysteme

Aus den Messergebnissen lässt sich ableiten, dass die Langzeitstabilität der Ag/AgCl-Referenzelektroden im Elektrolytgefäß eine Verringerung der Drift um circa den Faktor 100 gegenüber den vormals verwendeten chlorierten Silberdrähten ohne Elektrolytgefäß bedeutet. Weiter lässt sich erkennen, dass nach dem Einschwingen der platinieren Pt-Referenzelektroden die Ergebnisse vergleichbar sind. Damit können in zukünftigen Systemen die Ag/AgCl-Referenzelektroden durch platinbasierte Referenzelektroden ersetzt werden. Platin-Referenzelektroden wurden in der Vergangenheit auch verwendet, um Redox-Potentiale zu vergleichen. Sawyer et al. konnten keinen Vorteil gegenüber Ag/AgCl-Referenzelektroden feststellen⁷³. Dies ist jedoch heute der Fall, da Platin im Gegensatz zu Silber nicht zytotoxisch ist. Die mangelnde Biokompatibilität ist ein Problem bei der Herstellung von On-chip-Referenzelektroden aus Silber¹⁸⁶. Hier gibt es unterschiedliche Lösungsansätze. Zum einen wird versucht den klassischen Ansatz umzusetzen, d.h. ein Elektrolyt durch ein Diaphragma auf einer planaren Ag/AgCl-Schicht zu halten und somit das zytotoxische Silber vom biologischen Material abzutrennen^{79,81-83,109,243}. Dies ist jedoch technologisch sehr aufwändig. Ein anderer Ansatz ist, auf Silber zu verzichten und, wie in dieser Arbeit beschrieben, stattdessen mit Platin-Quasi-Referenzelektroden zu arbeiten. Bergveld et al.⁸⁶ stellten eine weitere Variante einer Quasi-Referenzelektrode vor, in der die pH-Sensitivität eines ISFETs deaktiviert und so als Bezugs-FET für einen realen ISFET verwendet wird. Vorteilhaft bei dieser Variante ist, dass Drifts bedingt durch Sensoralterung im REFET und ISFET gleichermaßen auftreten und so kompensiert werden⁸⁷. Diese Variante scheint für den Betrieb eines O₂-FET geeignet. Für eine amperometrische DO-Bestimmung ist diese Variante jedoch weniger sinnvoll, da die Alterung der Elektroden vom Stromfluss beeinträchtigt wird. Dieser fließt bei der amperometrischen Methode nur über die Arbeitselektrode und nicht über die Referenzelektrode (vgl. Kapitel 2.2.2).

Generell gilt, dass Referenzelektroden in organischen Lösungen nicht so langzeitstabil wie in wässrigen Lösungen sind. Gründe dafür sind Unreinheiten, Hydrolyse der Lösung oder

Reaktionen mit der elektrochemischen Halbzelle⁷³. Daher sollten Referenzelektroden in nicht-wässrigen Elektrolyten regelmäßig überprüft werden.

5.2 O₂-FET

Die Simulationsergebnisse in Abbildung 4-6 zeigen deutliche Übereinstimmungen mit der realen Messung in Abbildung 3-8. Aufgrund des diffusionsbasierten Modells wird angenommen, dass der Grund für die Verschiebung in der Signalhöhe die Produktion von Hydroxid an der Edelmetallelektrode und deren Diffusion in das Messmedium ist. Des Weiteren lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass das diffusionsbasierte Modell ausreicht, um die dominierenden Eigenschaften am O₂-FET zu beschreiben^{196,244,245}. In beiden Abbildungen ist ein geringer Anstieg des pH-Werts zu sehen, dies lässt sich durch eine Akkumulation von Hydroxid über dem Gate des ISFETs erklären.

Die Fickschen Gesetze basieren auf der Annahme, dass die solvatisierten Teilchen aufgrund ihrer niedrigen Konzentration alle ausschließlich mit dem Solventen interagieren. In konzentrierten Lösungen jedoch (die Konzentrationen der Ausgangsstoffe und Reaktionsprodukte haben die gleiche Größenordnung) interagieren alle gelösten Teilchen untereinander und mit sich selbst^{246,247}. Diese Art von Diffusion wird in der Literatur als Multikomponenten-Diffusion bezeichnet und kann mit Hilfe der Maxwell-Stefan-Diffusion modelliert werden. Die Implementierung der Interaktion zwischen den solvatisierten Teilchen wäre ein erster Schritt, das gezeigte physikalische Modell zu verfeinern, um die Anwendung des O₂-FET auf konzentrierte Lösungen, z.B. in der chemischen Analytik zu erweitern. Die Verwendung von Aktivitätskoeffizienten²⁴⁸ anstelle von Konzentrationen wäre eine weitere Möglichkeit zur Verfeinerung. Des Weiteren wurden bereits erste Untersuchungen zur Modellierung biologischer Zellen durchgeführt. Al-Baldawi et al.²⁴⁹ untersuchten die Diffusionskoeffizienten verschiedener intrazellulärer Ionen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Wijmans et al.²⁵⁰ stellten ein Modell zur Beschreibung der Diffusion in Membranen auf, das geeignet ist Diffusionsvorgänge in einer Zellmembran zu beschreiben. Croll et al.²⁵¹ modellierten Sauerstoff-Diffusion und Zellwachstum. Die durchgeführten Messungen (siehe Abbildung 4-8) zeigen gleichwertiges Verhalten des O₂-FET gegenüber herkömmlichen Mikro-Sensoren zur DO-Bestimmung. Nachstehende Tabelle fasst diese Ergebnisse zusammen¹²⁵.

Tabelle 5-1: Vergleich der Eigenschaften des O₂-FETs mit denen eines amperometrischen und eines optischen DO-Sensors²⁴³.

	O ₂ -FET	Amp. Sensor	Opt. sensor
Antwortzeit	Aufgrund der Messmethode nicht vergleichbar	Millisekunden	Sekunden
Hysterese	Gering	Mittel	Mittel
Drift	Mittel	Gering	Gering
Sensorfläche (mm ²)	0,003 (ohne Bezugsselektrode)	1,1	50,3

Durch die nun zusätzlich eingeführte Strommessung wird die Präzision der DO-Bestimmung erhöht (Doppelbestimmung). Zudem ist nun durch frei wählbare Spannung am O₂-FET der Schritt vom DO-Sensor zum Redox-Sensor mit dynamischer Spannungsvorgabe möglich. Dies ermöglicht den Aufbau amperometrischer Metabolisierungstests und die Entwicklung amperometrischer Spektroskopie. Damit können mit den BioChips auf der Basis des IMOLA auch stoffspezifische Detektionssysteme aufgebaut werden. Dies ermöglicht den Marker- und Hilfsreagenzien-freien Nachweis von biologischen Substanzen.

5.3 Kohlenstoff-Nanoröhrchen

Die durchgeführten Versuche werden als „*proof of principle*“ für die Eignung des CNT-Sensors zur DO-Bestimmung gewertet²⁵². Die dargestellten Ergebnisse wurden aufgrund der Vorarbeiten von Kong et al.¹⁹⁷, Ulbricht et al.¹⁹⁹ und Ye et al.²⁰² erwartet. Allerdings war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, diese Versuche so weit zu reproduzieren, dass exakte Aussagen bezüglich Empfindlichkeit, Detektionsgrenzen, Messbereich, Lebensdauer, Drift, Hysterese und Selektivität möglich wurden. Die kürzeste beobachtete Ansprechzeit (siehe Abbildung 4-14) betrug $t_{90}=43$ sec. Dies ist langsam im Vergleich zu anderen Gelöst-Sauerstoff-Sensoren⁸⁸. Allerdings genügt es, Messungen mit 10-Minuten-Zyklen an lebenden Zellen durchzuführen. Im Vergleich zu publizierten Herstellungsmethoden von CNT-basierten biokompatiblen Sensoren, wie der Dickschichttechnologie²⁵³, oder thermischer Methoden²⁵⁴ ist der technologische Aufwand zur Herstellung eines solchen Sensors in der hier vorgestellten und patentierten Art²⁵⁵ minimal. Genauso ist die Miniaturisierbarkeit in den Sub-Millimeter-Bereich gegeben. Wie bereits in den Arbeiten von Shim et al.²⁰⁵ und Sayes et

al.²⁵⁶ untersucht, können CNTs biokompatibel hergestellt und prozessiert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Möglichkeiten, die sich daraus für Medizintechnik, ergeben wurden von Harrison et al.²⁵⁷ und Endo et al.²⁵⁸ diskutiert. Zukünftige Arbeiten umfassen die genaue Charakterisierung des CNT-Sensors, hierbei ist es notwendig genau definierte Ausgangsmaterialien (Art, Größe und Reinheit der verwendeten CNTs) zu verwenden, um exakt gleiche Versuchsbedingungen für die unterschiedlichen Messungen zu schaffen.

5.4 Modulares Lab-on-chip-System

Während dem Fortgang dieser Arbeit hat sich das modulare System bereits bewährt, da es auf einfache Weise möglich war, die Entwicklung des BioChip-C in das Lab-on-chip-System zu integrieren. Wesentliche Verbesserungen des zellbasierten Systems konnten in der Kontaktierung, dem neuen Fluidiksystem und durch den modularen Aufbau erzielt werden.

5.4.1 Kontaktierung

Die neu entwickelte elektrische Kontaktierung mit Goldkontaktstreifen zeigt deutliche Vorteile gegenüber anderen Methoden. Im in dieser Arbeit vorgestellten Fall wurde der Übergangswiderstand um 33% verringert. Die Standardabweichung bei wiederholten Kontaktierungen wurde halbiert. Somit wurde eine günstige Kombination aus geringem und reproduzierbarem Übergangswiderstand und einfacher Wartbarkeit entwickelt.

5.4.2 Fluidsystem, modularer Aufbau

Durch den Wechsel von einem Pumpsystem in ein Saugsystem wurde die Überlaufsicherheit verbessert, da bei einer Leckage Luft angesaugt und nicht wie bei einem Pumpsystem Flüssigkeit, möglicherweise in die Elektronik, ausgepumpt wird. Dennoch sollte zur Verbesserung der Überlaufsicherheit auf hydrostatische Druckunterschiede geachtet werden, damit bei Leckagen ein Auslaufen von Flüssigkeit durch hydrostatischen Druck vermieden werden kann. Die Verwendung eines geschlossenen Systems bringt mehrere Vorteile: Es besteht eine geringere Kontaminationsgefahr, da selbst bei kontaminierter Umgebung (z.B. durch Sporen) keine Keime oder Pilze in das Messsystem gelangen können und dort durch

deren Stoffwechsel die Messergebnisse der eigentlich zu untersuchenden biologischen Probe verfälschen können. Zudem ist es mit geringem Aufwand möglich, die Gas-Partialdruckverhältnisse zu regeln und somit In-vivo-Systeme (wie z.B. Tumorgewebe in hypoxischem Milieu) in vitro besser nachzubilden. Die Kombination von Saug- und geschlossenem System verringert schließlich die Gefahr der Luftblasenbildung, die Messergebnisse verfälschen könnte. Da das komplett mit Flüssigkeit befüllte, geschlossene Fluidiksystem sich innerhalb der luftundurchlässigen Schläuche in einem leichten Unterdruck-Zustand befindet, neigen Gasansammlungen eher zur Lösung in der Flüssigkeit. Ein Ausgasen durch fallenden Druck in der Schlauchstrecke kommt in der Praxis nicht vor, da (wie aus Gleichung 4-6 berechnet) der Druckverlust in der Schlauchstrecke vernachlässigbar ist. Das Auftreten von Gasblasen konnte durch gleich bleibende Temperierung gelöst werden. Schließlich wurde durch die Modularität eine Systempalette für unterschiedliche biohybride Sensoren (siehe Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24), sowie für unterschiedliche Anwendungsszenarien (siehe Abbildung 4-18 und Abbildung 4-19) geschaffen. So ist es beispielsweise einfach möglich, verschiedene IMOLAs seriell zu betreiben und somit Untersuchungen an metabolischen Wirkungsketten durchzuführen. Des Weiteren können sowohl mobile als auch stationäre und parallelisierte Aufbauten realisiert werden und über den bereitgestellten CAN-Bus mit Standard-Komponenten erweitert werden. Die Realisierung der dynamischen Spannungsregelung an der NME des O₂-FET ermöglicht die direkte Kombination von amperometrischen Redox-Messungen mit pH-Messungen. Damit steht ein völlig neues Analysewerkzeug für elektrochemische Messungen zur Verfügung. Das Prinzip der kombinatorischen Messung kann auch in andere Herstellungstechnologien wie Dünnschichttechnologie, Laserablation oder AlGaN-basierte Technologien übertragen werden^{259,260}.

5.5 Resümee und Ausblick

Es wurden verschiedene Bezugssysteme für elektrochemische Messungen evaluiert, verbessert und diskutiert. Für das IMOLA-System konnte dadurch die Langzeitstabilität um den Faktor 100 erhöht werden. Zudem zeigte sich die prinzipielle Eignung von platinierterm Platindraht als Referenzelektrode. Dies eröffnet die Möglichkeit, direkt auf einem Sensorchip mit Platinstrukturen kostengünstig eine Referenzelektrode zu integrieren. Die On-chip-Integration einer solchen Referenzelektrode sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

Sowohl die Kontaktierung zur Elektronik als auch zur Fluidik wurden untersucht, verbessert und bewertet. Eigenschaften wie Übergangswiderstand, Wartbarkeit, Leckagensicherheit, Kontaminationssicherheit, Luftblasensicherheit und Modularität wurden verbessert und erlauben die Verwendung unterschiedlicher Sensorchips, sowie die Bereitstellung stationärer sowie mobiler Systeme als auch parallelisierte Systeme^{52,116}. Unterschiedliche Applikationsmöglichkeiten (Umweltmonitoring^{212,241}, Chemosensitivitätsuntersuchungen²²⁹) wurden mit den IMOLA-Systemen gezeigt und publiziert. Es können nun zuverlässige und langzeitstabile Untersuchungen an biologischen Zellen durchgeführt werden. Erstmals ist es zudem möglich, hypoxische Bedingungen in einem zellbasierten System nachzubilden. Zukünftig Arbeiten streben die Kombination der zellbasierten Systeme mit anderen Analysemethoden wie Gen- oder Protein-Analytik an. Die Machbarkeit der gleichzeitigen Messung des amperometrischen Stroms und der pH-Wert-Verschiebung am O₂-FET wurde gezeigt und die Eigenschaften des O₂-FET wurden mit anderen DO-Sensoren verglichen^{88,125,261}. Hier zeigt sich, dass der O₂-FET nur im Bereich der Drift nachteilig ist. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Verwendung einer Zwei-Elektroden-Anordnung. Durch Wechsel zu einer Drei-Elektroden-Anordnung ist eine weitere Verringerung der Sensordrift möglich. Zudem wurde die vollständige Interpretation der Messsignale am O₂-FET durch die Modellierung ermöglicht^{244,245}. Die gleichzeitige Durchführung einer pH-Messung sowie einer Voltametrie (Erweiterung auf einen Redox-Sensor) an einem Mikropot bietet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der chemischen Analytik und ist Gegenstand weiterer Arbeiten.

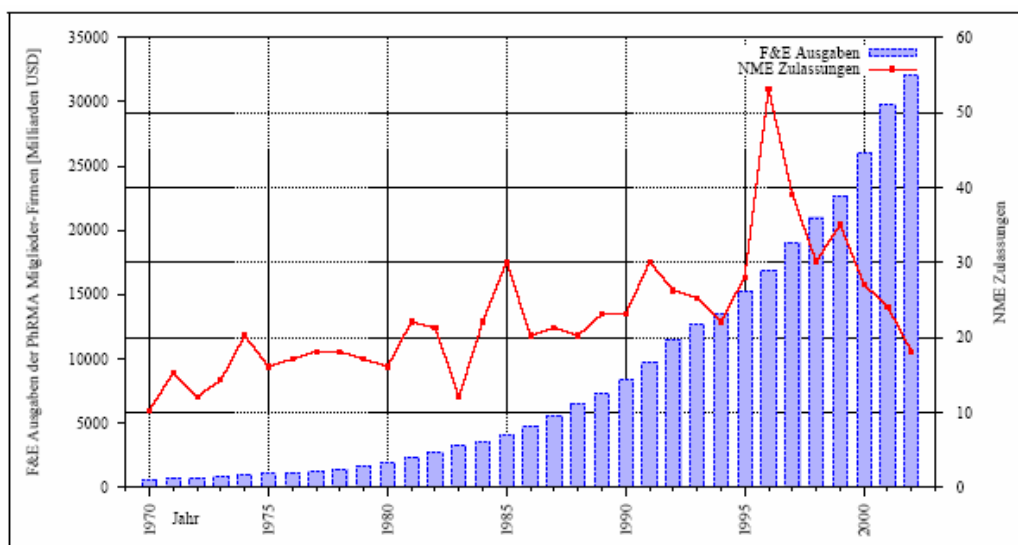


Abbildung 5-1: Gegenüberstellung der steigenden Ausgaben in der pharmakologischen Forschung und Entwicklung mit deren Ergebnissen (dargestellt am Beispiel der Zulassung von New Molecular Entities (NME), entnommen aus Dissertation Geisler⁶).

Die Möglichkeit, DO-Sensoren auf CNT-Basis herzustellen, wurde gezeigt und eine einfache technologische Vorgehensweise wurde beschrieben und patentiert²⁵⁵. Im Weiteren gilt es nun, den neuen Sensor bezüglich Reproduzierbarkeit und Qualitätssicherheit zu verbessern und die exakten Eigenschaften zu evaluieren. Das in dieser Arbeit beschriebene IMOLA-System bzw. zellbasierte Systeme²⁶² bietet eine Möglichkeit, die Kostenexplosion im Bereich der Pharmakologie einzudämmen. Abbildung 5-1 aus der Dissertation von Geisler⁶ zeigt die Kostenentwicklung im Bereich der pharmakologischen Forschung.

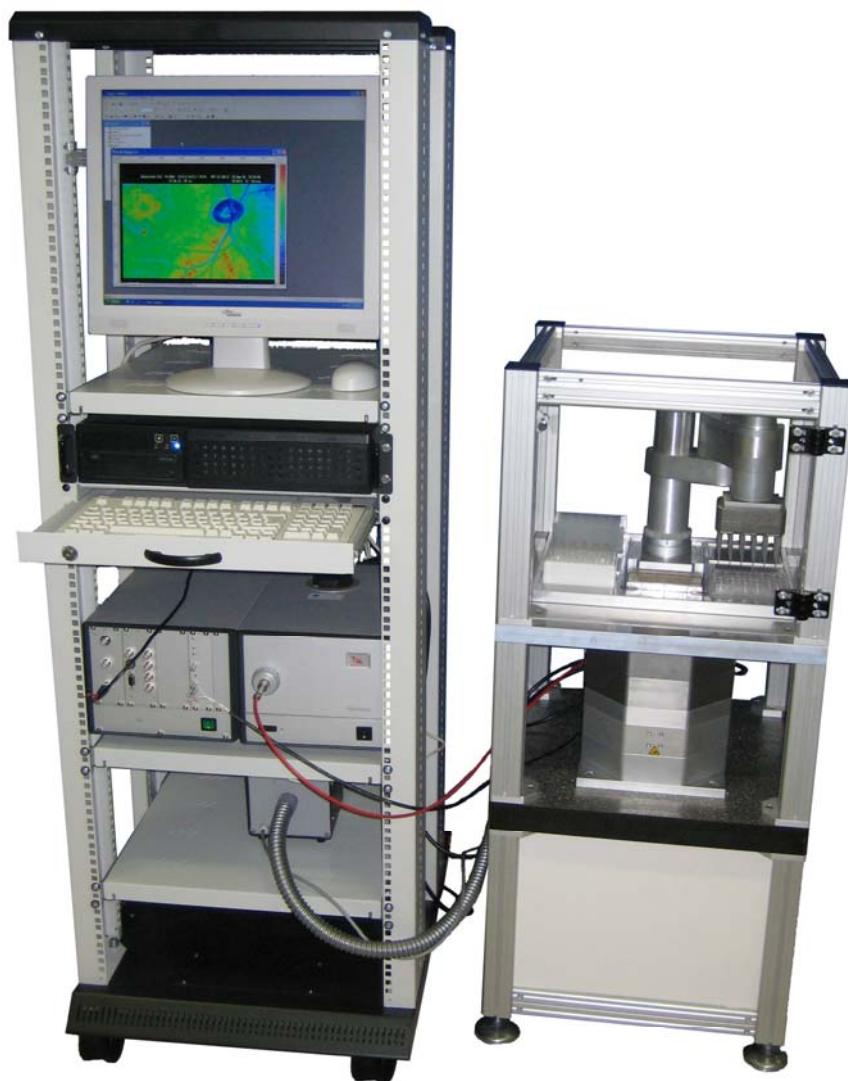


Abbildung 5-2: High-Content-Vollautomat. Rechts oben: Pipettierroboter zur Fluidversorgung der biologischen Zellen in der 24-well Sensorplatte. Rechts Mitte: Mikroskop zur automatisierten optischen Analyse der Zellen. Links: Steuer- und Auswerteelektronik (Quelle: Dissertation V. Lob, in Vorbereitung 2008).

Die steigende Bedeutung der Systembiologie als Fortführung der zellbiologischen Forschung in den Bereichen Genanalyse und Proteinanalyse zeigt sich auch in der Bereitstellung von Fördergeldern in Europa. So stellt die Schweiz bis 2011 400 Mio. CHF (etwa 240 Mio. EUR) für die Forschung im Bereich Systembiologie bereit, Deutschland wird im selben Zeitraum etwa 37 Mio. EUR bereitstellen.

Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte System ermöglicht nunmehr eine deutliche technische Verbesserung zur vergleichenden Analyse metabolischer Daten. Es stellt die Grundlage für die Erprobung und Entwicklung von entsprechenden High-Content-Vollautomaten dar, wie sie gegenwärtig entwickelt werden. Abbildung 5-2 zeigt ein solches System aus der Dissertation von V. Lob (in Vorbereitung 2008). Schließlich eröffnet sich durch die Integration des IMOLA in umweltanalytische Messnetze, wie beispielsweise in Bojen zum Oberflächengewässermonitoring, ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld.

A.1 Publikationsliste

A.1.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

J. Wiest, M. Brischwein, J. Ressler, A.M. Otto, H. Grothe, B. Wolf: Cellular Assays with Multiparametric Bioelectronic Sensor Chips, *Chimia*, 2005, 59(5), 243-246

J. Wiest, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Miniaturisierbare, biokompatible Gelöst-Sauerstoff-Sensoren, *Chemie Ingenieur Technik*, 2005, 77, (8), 1115-1116, DOI 10.1002/cite.200590381

M. Brischwein, H. Grothe, A.M. Otto, J. Ressler, V. Lob, **J. Wiest**, B. Wolf: Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosensortechnologie in zellulärer Diagnostik und Pharmascreeing, *Chemie Ingenieur Technik*, 2005, 77 (12), 55-59, DOI 10.1002/cite200500067

M. Brischwein, T. Geisler, V. Lob, J. Ressler, **J. Wiest**, B. Wolf: Chip statt Maus: Mikrosensorarrays zur Chemikalienprüfung, *Nachrichten aus der Chemie*, 2006, 54, 115-120

J. Wiest, T. Stadthagen, M. Schmidhuber, M. Brischwein, J. Ressler, U. Raeder, H. Grothe, A. Melzer, B. Wolf: Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring, *Analytical Letters*, 2006, 39, 8, 1759-1771, DOI 10.1080/00032710600714089

B. Wolf, M. Brischwein, V. Lob, J. Ressler, **J. Wiest**: Cellular signaling: aspects for tumor diagnosis and therapy, *Biomedizinische Technik*, 2007, 52, 164-168, DOI 10.1515/BMT.2007.030

M. Koch, A. Otto, **J. Wiest**, B. Wolf: Can single electrons initiate fusion of biological membranes?, *Biophysical Reviews and Letters*, 2007, 2 (1), 23-31, DOI 10.1142/S1793048007000416

A.1.2 Publikationen in Tagungsbänden (international)

J. Wiest, M. Schmidhuber, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Microcontrolled Bioelectronic Cell Chip Module, *MipTec 2005*, Proceedings, Basel, Switzerland, P121

J. Ressler, **J. Wiest**, H. Grothe, M. Brischwein, T. Asmus, K. Wienand, B. Wolf: Ceramic-Based Multi-Parametric Sensorchip for Cost-Effective Monitoring of Living Cells or Tissue, *IFMBE Proceedings Volume 2005, 10*, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul, Korea, 37 – 41

J. Ressler, **J. Wiest**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe B. Wolf: 24-Well-Microplate with Sensors for Metabolic, Morphologic and Electrophysiologic Parameters of Living Cells or Tissue, *IFMBE Proceedings Volume 2005, 10*, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul, Korea, 54 - 58

J. Wiest, M. Schmidhuber, J. Ressler, A. Scholz, M. Brischwein, B. Wolf: Cell Based Assays for Diagnostic and Therapy on Multiparametric Biosensor Chips With an Intelligent Mobile

Lab, IFMBE Proceedings Volume 2005, 10, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul, Korea, 29 – 32

J. Wiest, M. Schmidhuber, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Intelligent mobile lab for metabolics, 2nd International Workshop on “Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring”, Agadir, Morocco, 10.11.2005, O3

J. Wiest, M. Schmidhuber, E. Cabala, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Modular, wireless bioelectronic cell chip system, IFMBE Proceedings 2005, 11(1), The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference EMBEC’05, Prague, Czech Republic, ISSN: 1727-1983

M. Schmidhuber, **J. Wiest**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Intelligent Mobile Lab for Cellular Analysis, MipTec 2006, Proceedings, Basel, P78

J. Wiest, E. Cabala, M. Schmidhuber, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Intelligent Mobile Lab for detection and processing of cell vitality parameters, Proceedings of the 5th European Symposium on Biomedical Engineering 2006, Patras, Greece

J. Wiest, M. Brischwein, S. Blank, H. Grothe, B. Wolf: Measurement and Simulation of the Dissolved Oxygen Concentration and the pH Value at the O₂-FET, IFMBE Proceedings 2006, 14, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Seoul, Korea, 545 – 548

J. Wiest, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Metabolic profiling with electrochemical microsensors, Advances in Metabolic Profiling, London, UK, 18-19.10.2006

J. Wiest, M. Brückl, M. Schmidhuber, D. Grundl, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Multiparametric, six channel, online analysis of MCF-7 cells, MipTec 2007, Proceedings, Basel, P116

J. Wiest, M. Schmidhuber, D. Grundl, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Environmental Engineering using Living Cells as Signal Transducers, IEEE Africon 2007, Windhoek/Namibia, ISBN: 0-7803-8606-X, IEEE Catalog number: 04CH37590C

M. Brückl, D. Grundl, A.M. Otto, M. Schmidhuber, **J. Wiest**, B. Wolf: Real-time analysis of tumor cell metabolism and chemo-sensitivity testing using multiparametric sensor chips, Integrative Cancer Genomics, Munich, Germany, 11-13.02.2008

J. Wiest, S. Blank, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Simulation of the dissolved oxygen concentration and the pH value at the O₂-FET, Proceedings of the Sixth IASTED International Conference BIOMEDICAL ENGINEERING, February 13-15.2008, Innsbruck, Austria, 151-155, ISBN: 978-0-88986-721-5

M. Schmidhuber, **J. Wiest**, D. Grundl, M. Brückl, N. Büchels, B. Wolf: Detection of detrimental effects on health in point-of-care scenarios using a multiparametric biosensor, Proceedings of the Sixth IASTED International Conference BIOMEDICAL ENGINEERING, February 13-15.2008, Innsbruck, Austria, 298-301, ISBN: 978-0-88986-721-5

A.1.3 Publikationen in Tagungsbänden (national)

Ch. Stepper, B. Wolf, **J. Wiest**, M. Loeser, M. Brischwein, H. Grothe, W. Hansch, D. Schmitt-Landsiedel: Technological Pre-Investigations on the Realization of a Local Resolution Microphysiologic Cell Chip for Medical Diagnostics and Pharmaceutical Screening, Sensors 2003 Proceedings, 335 - 338

M. Brischwein, **J. Wiest**, H. Grothe, B. Wolf: Monitoring of cellular oxygen exchange on planar microstructures: Amperometric and potentiometric methods. 6. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, 08.-10.12.2003, 179 - 182

Ch. Stepper, **J. Wiest**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Local resolution assays for cellular and histological multiparametric diagnostics, Biomedizinische Technik – Biomedical Engineering 2004, 49, Ergänzungsband 2 Teil 1, 402 – 403

J. Wiest, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Planar pO₂ micro sensors in biomedical applications, Biomedizinische Technik – Biomedical Engineering 2004, 49, Ergänzungsband 2 Teil 1, 404 - 405

M. Schmidhuber, **J. Wiest**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Intelligent Mobile Lab for Cellular Analysis, 6. Würzburger Medizintechnik Kongress 9.-11. Mai 2005, Fachverband Biomedizinische Technik e.V., Wetzlar, 358 - 359

J. Wiest, M. Brischwein, H. Grothe, A.M. Otto, B. Wolf: Planar Microsensors for measurement of cellular respiration, SENSOR 2005 Proceedings II, 249 – 254

J. Wiest, J. Ressler, M. Schmidhuber, A. Scholz, M. Brischwein, B. Wolf: Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips. Biological Medical Defense Conference 2005, 129

J. Wiest, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: O₂-FET: Measurement of changes in dissolved oxygen and pH with a single sensor, Biomedizinische Technik – Biomedical Engineering 2005, 50, Supplemental Appendix, 7-8

J. Wiest, J. Ressler, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Multiparametric electrochemical microsensor chips for measurement of pH, pO₂, impedance and temperature,ACHEMA 2006 28th International Exhibition – Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, 244

J. Wiest, M. Schmidhuber, T. Stadthagen, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: Intelligentes mobiles Labor für Bioassays und zur Analyse von lebenden Zellen, BMT 2006 – Gemeinsame Jahrestagung der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik - Proceedings, Zürich, 04.09-09.09 2006, ISSN 0939-4990

T. Stadthagen, U. Raeder, **J. Wiest**, A. Melzer, B. Wolf: Intelligent mobile Laboratory (IMOLA). Biomonitoring mittels Biosensorchip-Technologie, Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Limnologie e.V. (DGL), 165

M. Brischwein, J. Ressler, H. Grothe, D. Schiopu, **J. Wiest**, B. Wolf: Mikroelektrodenstrukturen in Dünnschichttechnik für das Monitoring von

Atoffwechselaktivitäten, 7. Vortragstagung des Arbeitskreises Elektrochemische Analysemethoden der Fachgruppe Analytische Chemie (ELACH 7), 2007, S. 29-32

M. Schmidhuber, **J. Wiest**, M. Brischwein, A.M. Otto, H. Grothe, B. Wolf: Multiparametric sensor chips for the metabolic analysis of live cells, European Bioprospectives 2007 – Book of Abstracts, Köln, 74

M. Schmidhuber, **J. Wiest**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf: μ Lab: Mobile miniaturisierte Point of Care Diagnostik, 41. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2007

D. Grundl, **J. Wiest**, V. Lob, M. Schmidhuber, J. Ressler, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf: Zellchipsysteme zur biologischen Grundlagenforschung, 41. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2007

A.1.4 Patent

J. Wiest, B. Wolf: Chemischer Sensor sowie Verfahren zu dessen Herstellung, DE102005011012A1

A.1.5 Veröffentlichungen in sonstigen Medien

J. Wiest: www.O2-FET.de

J. Wiest, A. Scholz, M. Schmidhuber: Drahtlos-Voltmeter via Bluetooth, Elektronik 2005, 24, 62-64

J. Wiest: Chip statt Maus. TU Mitteilungen, 2006, 1, 59 – 60

T. Stadthagen, **J. Wiest**: „Toxische Stoffe durch Biomonitoring erkennen“, Die Wasserlinse, 2006, 3, 9

J. Wiest: Zum Weltkongress nach Seoul, TU Mitteilungen, 2006, 5, 35

J. Wiest, D. Grundl: RS-232 kann CAN, Design&Elektronik, 2007, 2, 64 – 66

M. Koch, **J. Wiest**: Discussion of magnetic field saturation phenomenons by interpretation of Maxwell's second equation, 2007, PHILICA.COM Article number 92

M. Koch, **J. Wiest**: Field wave impedance linked electromagnetically to the von-Klitzing constant, 2007, PHILICA.COM Article number 99

D. Grundl, **J. Wiest**: Integrating RS-232 devices into CAN networks, CAN Newsletter, 2007, 3, 37-38

J. Wiest: www.cellasys.com

B. Wolf, H. Grothe, F. Ilchmann, V. Lob, J. Meyer, J. Ressler, B. Wankerls, **J. Wiest**: Cell based Screening: Automated cell analytics, Screening 1, 2008, 21-23

A.2 Symbole, Konstanten und Abkürzungen

Tabelle A.2-1: Verwendete physikalische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
α_{BU}	Bunsenscher Absorptionskoeffizient	[1]
α_{OS}	Ostwaldscher Absorptionskoeffizient	[1]
η	Dynamische Viskosität	Bar [bar]
μ	Chemisches Potential	Joule [J]
$\tilde{\mu}$	Elektrochemisches Potential	Joule [J]
τ	Abklingzeit	Sekunde [s]
ϕ	Phasenverschiebung	[1]
φ	Elektrisches Potential	Volt [V]
a_i	Aktivität	$[\frac{mol}{l} = M]$
A	Fläche	$[mm^2]$
B_{11}	Zweiter Virialkoeffizient	$[\frac{l}{mol}]$
c_i	Molare Konzentration, Molarität	$[\frac{mol}{l} = M]$
d	Durchmesser	[mm]
E	Redoxpotential	Volt [V]
E_0	Standard Redoxpotential	Volt [V]
f_i	Aktivitätskoeffizient	$[\frac{mol}{l} = M]$
f	Frequenz	Hertz [$\frac{1}{s} = Hz$]
G	Gibbs Energie (auch Freie Enthalpie)	$[\frac{kJ}{mol}]$
H_c, H_{x_1}	Henry-Koeffizient	Je nach Version des Henry-Gesetzes
I_R	Intensität	$[\frac{W}{m^2}]$
I, i	Elektrischer Strom	Ampere [A]
k_q	Quenching-Konstante	$[\frac{l}{s \cdot mol}]$
k_{s_i}	Sechenov-Konstante	[1]

k_{SV}	Stern-Volmer-Parameter	[1]
l	Länge	[m]
K_L	Löslichkeitsprodukt	$[\frac{mol}{l} = M]$
n_i	Stoffmenge	Mol [mol]
P_i	Druck	Bar [bar]
q	Löslichkeitskoeffizient	[1]
R	Elektrischer Widerstand	Ohm [Ω]
Re	Reynoldszahl	[1]
$S_v(f)$	Rauschen	$[\frac{V^2}{Hz}]$
T	Temperatur	Kelvin [K]
U	Elektrische Spannung	Volt [V]
ν	Kinematische Viskosität	$[\frac{m^2}{s}]$
V	Volumen	Kubikmeter [m^3]
\bar{V}	Molares Volumen, Molvolumen	$[\frac{m^3}{mol}]$
w	Charakteristische Geschwindigkeit	$[\frac{m}{s}]$
x_i	Stoffmengenanteil, Molenbruch	[1]
z_i	Wertigkeit der Ionensorte i	[1]

Tabelle A.2-2: Verwendete chemische Symbole

Symbol	Bedeutung
<i>Ag</i>	Silber
<i>AgCl</i>	Silberchlorid
<i>AlGaN</i>	Aluminiumgaliumnitrid
<i>Au</i>	Gold
<i>C</i>	Kohlenstoff
<i>C₆H₁₂O₆</i>	Traubenzucker
<i>CO₂</i>	Kohlendioxid
<i>Cl</i>	Chlor
<i>H</i>	Wasserstoff
<i>HCl</i>	Chlorwasserstoff
<i>HO₂⁻</i>	Wasserstoffdioxid
<i>H₂O</i>	Wasser
<i>H₂O₂</i>	Wasserstoffperoxid
<i>I</i>	Iod
<i>KCl</i>	Kaliumchlorid
<i>MgCl₂</i>	Magnesiumchlorid
<i>Mn(II)</i>	Mangan II
<i>Mn(III)</i>	Mangan III
<i>Mn(OH)₂</i>	Mangan(II)-hydroxid
<i>Mn(OH)₃</i>	Mangan(III)-oxidhydrat
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>Na₂SO₃</i>	Natriumsulfit
<i>Na₂SO₄</i>	Natriumsulfat
<i>O</i>	Sauerstoff
<i>OH⁻</i>	Hydroxid
<i>Pb(CH₃COO)₂</i>	Bleiacetat
<i>Pt</i>	Platin
<i>S₂O₃²⁻</i>	Thiosulfat
<i>S₄O₆²⁻</i>	Tetrathionat

Tabelle A.2-3: Konstanten

Symbol	Bedeutung	Wert	Einheit
F	Faraday-Konstante	96485.3383	$[\frac{C}{mol}]$
k	Boltzmann-Konstante	1.38065E-23	$[\frac{J}{K}]$
R_m	Allgemeine Gaskonstante	8.314472	$[\frac{J}{mol \cdot K}]$

Tabelle A.2-4: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
17 α -EE	17 α -Ethinylestradio
μ TAS	Mikro-Totales Analyse System (<i>micro total analysis system</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ARNT	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (aryl hydrocarbon nuclear translocator)
ATP	Adenosintriphosphat
AUX	Hilfselektrode
bHLH	(<i>basic helix-loop-helix</i>)
BOLD MRI	Blut-Sauerstoff-Level abhängige Magnetresonanztomographie (<i>blood oxygen-level dependend magnetic resonance imaging</i>)
C-TAD	C-terminale transaktivierende Domäne
CE	Hilfselektrode (<i>counter electrode</i>)
CNT	Kohlenstoff-Nanoröhrchen (<i>carbon nanotube</i>)
D	Drain
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DO	Gelöst-Sauerstoff (<i>dissolved oxygen</i>)
EPO	Erythropoetin
EPRI	Elektronenparamagnetische Resonanz (<i>electron paramagnetic resonance imaging</i>)
FET	Feldeffekttransistor
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GOD	Glukoseoxidase
HIF	„Hypoxie induzierbarer Faktor“ (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HRE	Hypoxie-responsives Element
I ² C	Bussystem (inter-integrated circuit)
IMOLA	Intelligentes Mobiles Labor (<i>intelligent mobile lab</i>)

ISFET	Ionen sensitiver Feldeffekttransistor
IDES	Interdigitale Elektroden Struktur (<i>interdigitated electrode structure</i>)
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MRI	Magnetresonanztomographie (<i>magnetic resonance imaging</i>)
NME	Edelmetallelektrode (<i>noble metal electrode</i>)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
ODD	Sauerstoffabhängige Degradations-Domäne (<i>oxygen dependent degradation domain</i>)
OUR	Sauerstoffverbrauchsrate (<i>oxygen uptake rate</i>)
PAS	(<i>period-ARNT-single-minded</i>)
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PIC	Mikrokontrollerfamilie von Microchip
REFET	Referenz-Feldeffekttransistor
RE, REF	Referenzelektrode (<i>reference electrode</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am: <u>R</u> osewell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute)
S	Source
SPI	Serielle Peripherie-Schnittstelle (<i>serial peripheral interface</i>)
SECM	Abtastende elektrochemische Mikroskopie (<i>scanning electrochemical microscopy</i>)
WE, WORK	Arbeitselektrode (<i>working electrode</i>)

A.3 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zuallererst bei meiner Familie und bei meinen Freunden, durch die der Antrieb für dieses Projekt stets aufrechterhalten wurde. Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Wolf für die Themenstellung und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ihm sowie Dr. Helmut Grothe, Dr. Martin Brischwein, Dr. Angela Otto und allen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern am und um den Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik danke ich für die Anleitung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich den finanziellen Förderern des Projekts. Dies sind die *SHZ Softwarehaus Zuleger GmbH*, der *Bund der Freunde der Technischen Universität München*, die *Heinz Nixdorf Stiftung*, die *Bayerische Forschungstiftung* und die *Deutsche Forschungsgemeinschaft*.

A.4 Literatur

- (1) Bousse L. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 1996;34:270-275.
- (2) Fandrey J. Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *Biospektrum*. 2007;13:26-28.
- (3) Alberts B, Bray D, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. London: Taylor & Francis; 2002.
- (4) Bellamy WT. Prediction of Response to Drug-Therapy of Cancer - A Review of Invitro Assays. *Drugs*. 1992;44:690-708.
- (5) Blumenthal RD. Chemosensitivity: In vivo models, imaging, and molecular Regulators. *Methods in Molecular Medicine*. 2006;2:109-125.
- (6) Geisler Th. Echtzeitumgebung (Hard- und Firmware-Plattform) für ein Mikroskop-basiertes "Machine-Vision" System. Dissertation. Technische Universität München, 2007.
- (7) Glauner B. Stromausschlussverfahren: Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *Biospektrum*. 2006;4:394-395.
- (8) Otto AM, Brischwein M, Motrescu ER, Cabala E, Grothe H, Stepper Ch, Wolf B. Chips statt Mäuse: Zellen auf bioelektronischen Sensorchips als Alternative zu Tierversuchen. *ALTEX*. 2004;21:70-76.
- (9) Védrine Ch, Leclerc J-C, C.Durrieu, C.Tran-Minh. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors & Bioelectronics*. 2003;18:457-463.
- (10) Podola B, Melkonian M. Selective real-time herbicide monitoring by an array chip biosensor employing diverse microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 2005;17:261-271.
- (11) Van der Schalie WH, Shedd TR, Knechtges PL, Widder MW. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001;16:457-465.
- (12) Rodriguez-Mozaz S, de Alda MJL, Marco MP, Barcelo D. Biosensors for environmental monitoring - A global perspective. *Talanta*. 2005;65:291-297.
- (13) Bannwarth H, Kremer B, Schulz A. *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.
- (14) Kraus M, Lais P, Wolf B. Structured Biological Modelling: a method for the analysis and simulation of biological systems applied to oscillatory intracellular calcium waves. *BioSystems*. 1992;27:145-169.
- (15) Henning T, Kraus M, Brischwein M, Otto AM, Wolf B. Relevance of tumor microenvironment for progression, therapy and drug development. *Anti-Cancer Drugs*. 2003;15:7-14.

- (16) Wolf B, Kraus M, Sieben U. Potential of microsensor-based feedback bioactuators for biophysical cancer treatment. *Biosensors & Bioelectronics*. 1997;12:301-309.
- (17) Kraus M, Wolf B. Physicochemical microenvironment as key regulator for tumor microevolution, invasion, and immune response: Targets for endocytotechnological approaches in cancer treatment. *Endocytobiosis and Cell Research*. 1998;12:133-156.
- (18) Kraus M, Wolf B. *Structured Biological Modelling - A new approach to biophysical cell biology*. Florida: CRC Press, Inc.; 1995.
- (19) Wightman RM, Runnels P, Troyer K. Analysis of chemical dynamics in microenvironments. *Analytica Chimica Acta*. 1999;400:5-12.
- (20) Wolf B, Kraus M, Brischwein M, Ehret R, Baumann W, Lehmann M. Biofunctional hybrid structures - cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1998;46:215-225.
- (21) Hoinkis J, Lindner E. *Chemie für Ingenieure*. 12 ed. Weinheim: WILEY-VCH; 2001.
- (22) Liu LP, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular Cell*. 2006;21:521-531.
- (23) Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93:266-276.
- (24) Gallez B, Baudelet C, Jordan BF. Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *Nmr in Biomedicine*. 2004;17:240-262.
- (25) Hofer T, Desbaillets I, Höpfl G, Wenger RH, Gassmann M. Characterization of HIF-1 overexpressing HeLa cells and implications for gene therapy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2002;133:475-481.
- (26) Liu L, Simon MC. Regulation of Transcription and Translation by Hypoxia. *Cancer Biology & Therapy*. 2004;3:492-497.
- (27) Kraus M, Baumann W, Brischwein M, Ehret R, Leroux C, Wolf B. Biosensorik mit zellulären Systemen. *BIOSCOPE*. 1993;24-33.
- (28) inden T. Die Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1alpha durch den Eisenchelator Ciclopiroxolamin und das Übergangsmetall Kupfer. Medizinische Fakultät der Universität zu Lübeck, 2005.
- (29) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271-275.
- (30) Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR. Oxygen sensing in the body. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 2006;91:249-286.

- (31) Ivan M, Kondo K, Yang HF, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O-2 sensing. *Science*. 2001;292:464-468.
- (32) RCSB-Protein Data Bank. www.rcsb.org . 2007.
- (33) Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, Eck MJ. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:5367-5372.
- (34) Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha s mediated by an O-2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:7987-7992.
- (35) Zhu H, Bunn HF. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes. *Respiration Physiology*. 1999;115:239-247.
- (36) Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Research*. 2006;71:642-651.
- (37) Mortimer CE, Müller U. *Chemie*. 8 ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
- (38) *The Merck Index*. 13 ed. Merck & Co., Inc.; 2001.
- (39) Lide DR. *Handbook of Chemistry and Physics*. 85 ed. CRC Press; 2004.
- (40) Adam G, Läger P, Stark G. *Physikalische Chemie und Biophysik*. 4 ed. 2003.
- (41) Whitfield M, Turner DR, Ben-Yaakov S et al. *Marine Electrochemistry - A Practical Introduction*. New York: John Wiley & Sons; 1981.
- (42) Rettich TR, Battino R, Wilhelm E. Solubility of gases in liquids. 22. High-precision determination of Henry's law constants of oxygen in liquid water from T = 274 K to T = 328 K. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2000;32:1145-1156.
- (43) Battino R, Rettich TR, Tominaga T. The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids. *Journal of physical and chemical reference data*. 1983;12:163-178.
- (44) Battino R. The Ostwald coefficient of gas solubility. *Fluid Phase Equilibria*. 1984;15:231-240.
- (45) Näser K-H, Lempe D, Regen O. *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure*. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; 1990.
- (46) Schumpe A, Quicker G, Deckwer WD. Gas solubilities in microbial culture media. *Advances in Biochemical Engineering*. 1982;24:1-38.
- (47) Ducommun P, Ruffieux P-A, Furter M-P, Marison I, von Stockar U. A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 2000;78:139-147.

- (48) Hitchman ML. Measurement of Dissolved Oxygen. *Chemical Analysis*. 1978;49:1-246.
- (49) Rasmussen HN, Rasmussen UF. Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements. *Analytical Biochemistry*. 2003;319:105-113.
- (50) Narita E, Lawson F, Han KN. Solubility of oxygen in aqueous electrolyte solutions. *Hydrometallurgy*. 1983;10:21-37.
- (51) Fischer K, Wilken M. Experimental determination of oxygen and nitrogen solubility in organic solvents up to 10 MPa at temperatures between 298 K and 398 K. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 2001;33:1285-1308.
- (52) Brischwein M, Grothe H, Otto AM, Ressler J, Lob V, Wiest J, Wolf B. Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosensortechnologie in zellulärer Diagnostik und Pharmascreeing. *Chemie Ingenieur Technik* 2005. 2005;77:55-59.
- (53) Ruffieux P-A, von Stockar U, Marison IW. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 1998;63:85-95.
- (54) Gea T, Barrena R, Artola A, Sánchez A. Monitoring the Biological Activity of the Composing Process: Oxygen Uptake Rate (OUR), Respiriometric Index (RI), and Respiratory Quotient (RQ). *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;88:520-527.
- (55) Singh V. On-Line measurement of Oxygen Uptake in Cell Culture Using the Dynamic Method. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;52:443-448.
- (56) Yamada K, Furushou S, Sugahara T, Shirahata S, Murakami H. Relationship between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells cultured in serum-free media. *Biotechnology and Bioengineering*. 1990;36:759-762.
- (57) Winkler LW. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 1888;21:2843-2854.
- (58) Glazer BT, Marsh AG, Stierhoff K, Luther III GW. The dynamic response of optical oxygen sensors and voltammetric electrodes to temporal changes in dissolved oxygen concentrations. *Analytica Chimica Acta*. 2004;518:93-100.
- (59) Zeuthen E. A Cartesian Diver micro respirometer with a gas volume of 0.1 ml. *CRT Lab Carlsber, Ser Chim*. 1943;24:479-518.
- (60) Laitinen HA, Higuchi T, Czuba M. Potentiometric Determination of Oxygen Using the Dropping Mercury Electrode. *Journal of the American Chemical Society*. 1947;70:561-565.
- (61) Oehme F, Schuler P. *Gelöst-Sauerstoff-Messung*. Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH Heidelberg; 1983.
- (62) Wightman RM, Wipf DO. Voltammetry at ultramicroelectrodes. A.J.Bard, editor. [15]. 1989. New York, M. Dekker. *Electroanalytical chemistry*.

- (63) Krishna MC, Subramanian S, Kuppusamy P, Mitchell JB. Magnetic resonance imaging for in vivo assessment of tissue oxygen concentration. *Seminars in Radiation Oncology*. 2001;11:58-69.
- (64) Servinghaus JW, Astrup PB. History of blood gas analysis. V. Oxygen measurement. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. 1986;2:174-189.
- (65) Berntsson M, Tengberg A, Hall POJ, Josefson M. Multivariate experimental methodology applied to the calibration of a Clark type oxygen sensor. *Analytica Chimica Acta*. 1997;355:43-53.
- (66) Parkhill KL, Gulliver JS. Indirect measurement of oxygen solubility. *Water Research*. 1997;31:2564-2572.
- (67) Wasserbeschaffenheit; Bestimmung des gelösten Sauerstoffs; iodometrisches Verfahren. [ISO 5813]. 1983.
- (68) Wasserbeschaffenheit; Bestimmung des gelösten Sauerstoffs; Iodometrisches Verfahren. [DIN EN 25813]. 1993.
- (69) Carpenter JH. The accuracy of the winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnol Oceanogr*. 1965;10:135-140.
- (70) Roland F, Caraco NF, Cole JJ. Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity. *Limnol Oceanogr*. 1999;44:1148-1154.
- (71) Labasque T, Chaumery Ch, Aminot A, Kergoat G. Spectrophotometric Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability. *Marine Chemistry*. 2004;88:53-60.
- (72) Ives DJ, Janz GJ. *Reference Electrodes*. New York: Academic Press; 1961.
- (73) Sawyer DT, Sobkowiak A, Roberts Jr JL. *Electrochemistry For Chemists*. Second ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1995.
- (74) Atkins PW. *Physikalische Chemie*. Weinheim: WILEY-VCH; 2001.
- (75) Hamann CH, Vielstich W. *Elektrochemie*. 3 ed. Wiley-VCH; 1998.
- (76) Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc.; 1969.
- (77) Huang I-Y, Huang R-S, Lo L-H. Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications. *Sensors and Actuators*. 2003;94:53-64.
- (78) Kitade T, Kitamura K, Takegami S, Miyata Y, Nagatomo M, Sakaguchi T, Furukawa. Needle-Type Ultra Micro Silver/Silver Chloride Reference Electrode for Use in Micro-Electrochemistry. *Analytical Sciences*. 2005;21:907-912.

- (79) Suzuki H, Hirakawa T, Sasaki S, Karube I. An integrated three-electrode system with a micromachined liquid-junction Ag/AgCl reference electrode. *Analytica Chimica Acta*. 1999;387:103-112.
- (80) Hassel AW, Fushimi K, Seo M. An agar-based silver vertical bar silver chloride reference electrode for use in micro-electrochemistry. *Electrochemistry Communications*. 1999;1:180-183.
- (81) Matsumoto T, Ohashi A, Ito N. Development of a micro-planar Ag/AgCl quasi-reference electrode with long-term stability for an amperometric glucose sensor. *Analytica Chimica Acta*. 2002;462:253-259.
- (82) Cranny AWJ, Atkinson JK. Thick film silver-silver chloride reference electrodes. *Measurement Science and Technology*. 1998;9:1557-1565.
- (83) Sun XJ, Wang M. Fabrication and characterization of planar reference electrode for on-chip electroanalysis. *Electrochimica Acta*. 2006;52:427-433.
- (84) Lee Y-C, Sohn B-K. Development of an FET-Type Reference Electrode for pH Detection. *Journal of the Korean Physical Society*. 2002;40:601-604.
- (85) Kim Y-J, Lee Y-C, Sohn B-K, Lee J-H. A Novel pH Microsensor with a Built-in Reference Electrode. *Journal of the Korean Physical Society*. 2003;43:769-772.
- (86) Bergveld P, Vandenberg A, Vanderwal PD, Skowronskaptasinska M, Sudholter EJ, Reinhoudt DN. How Electrical and Chemical-Requirements for Refets May Coincide. *Sensors and Actuators*. 1989;18:309-327.
- (87) Fligge F, Wiest J. Herstellung und Charakterisierung von Platinreferenzelektroden und deren Verwendung als Pseudoreferenzelektroden. *Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik*. 2006.
- (88) Wiest J, Brischwein M, Grothe H, Wolf B. Planar pO₂ micro sensors in biomedical applications. *Biomedizinische Technik*. 2004;49:404-405.
- (89) Land SC, Porterfield DM, Sanger RH, Smith PJS. The self-referencing oxygen-selective microelectrode: Detection of transmembrane oxygen flux from single cells. *Journal of Experimental Biology*. 1999;202:211-218.
- (90) Kaya T, Torisawa Y, Oyamatsu D, Nishizawa M, Matsue T. Monitoring the cellular activity of a cultured single cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). A comparison with fluorescence viability monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*. 2003;18:1379-1383.
- (91) Mitsubayashi K, Wakabayashi Y, Murotomi D, Yamada T, Kawase T, Iwagaki S, Karube I. Wearable and flexible oxygen sensor for transcutaneous oxygen monitoring. *Sensors and Actuators*. 2003;95:373-377.
- (92) McLaughlin GW, Braden K, Franc B, Kovacs GTA. Microfabricated solid-state dissolved oxygen sensor. *Sensors and Actuators*. 2005;83:138-148.
- (93) Ji B-I, Kim Y-T. Spacer-Inserted Dissolved Oxygen Sensor. patent WO 02/06805 A1. 2002 2002.

- (94) Lambrechts M, Sansen W. Biosensors: Microelectrochemical Devices. Philadelphia and New York: Institute of Physics Publishing Bristol; 1992.
- (95) Wiest J, Brischwein M. Measurement of pH and pO₂ change at an ISFET surrounded by a noble metal electrode. Diplomarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2002.
- (96) Züllig H. Erfahrungen in der Wasserwirtschaft mit unbedeckten, selbstreinigenden Sauerstoffelektroden. *gwf-wasser*. 1977;118:227-234.
- (97) L'Her M. Redox Properties, Electrochemistry of Oxygen. In: Scholz F, Pickett ChJ, eds. Encyclopedia of Electrochemistry, Volume 7a Inorganic Electrochemistry. Weinheim: WILEY-VCH; 2006:117-142.
- (98) Brischwein M, Grothe H, Otto AM et al. Living Cells on Chip: Bioanalytical Applications. In: V.M.Mirsky, ed. Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors. 2004:159-180.
- (99) Tang TE, Murphy VG, Hahn AW, Barr RE. The operation of platinum oxygen sensing microelectrodes. *Journal of Bioengineering*. 1987;2:381-388.
- (100) Stepper Ch. Entwurf, Herstellung und Charakterisierung von Biosensorchips. Dissertation. Technische Universität München. 2005.
- (101) Wittstock G, Zhao Ch, Wilhem Th, Sklyar O. Untersuchung enzymatisch aktiver Oberflächen mit dem elektrochemischen Rastermikroskop (SECM). *Chemie Ingenieur Technik* 2005. 2005;77:853-857.
- (102) Wightman RM. Probing cellular chemistry in biological systems with microelectrodes. *Science*. 2006;311:1570-1574.
- (103) Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*. 2005;44:13214-13223.
- (104) Kelleher DK, Thews O, Vaupel P. Hypoxyradiotherapy: lack of experimental evidence for a preferential radioprotective effect on normal versus tumor tissue as shown by direct oxygenation measurements in experimental sarcomas. *Radiotherapy and Oncology*. 1997;45:191-197.
- (105) Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M. Oxygenation of Human Tumors -Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast Cancers by Computerized O₂ Tension Measurements. *Cancer Research*. 1991;51:3316-3322.
- (106) De Cássia Silva Luz R, Damos FS, Tanaka AA, Kubota LT. Dissolved oxygen sensor based on cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized in poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators*. 2005;1-9.
- (107) Lin MS, Leu HJ, Lai CH. Development of Vitamin B12 based disposable sensor for dissolved oxygen. *Analytica Chimica Acta*. 2006;561:164-170.

- (108) Nei L, Compton RG. An improved Clark-type galvanic sensor for dissolved oxygen. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 1996;30:83-87.
- (109) Vonau W, Enseleit U, Gerlach F, Herrmann S. Conceptions, materials, processing technologies and fields of application for miniaturized electrochemical sensors with planar membranes. *Electrochimica Acta*. 2004;49:3745-3750.
- (110) Linek V, Vacek V, Sinkule J, Benes P. Measurement of oxygen by membrane-covered probes. 1988. England, Ellis Horwood Limited. Ellis Horwood series in analytical chemistry. R.A.Chalmers and M.Masson.
- (111) Gavaghan DJ, Rollett JS, Hahn CEW. Numerical simulation of the time-dependent current to membrane-covered oxygen sensors: Part I. The switch-on transient. *Journal of electroanalytical chemistry*. 1992;325:23-44.
- (112) Gavaghan DJ, Rollett JS, Hahn CEW. Numerical simulation of the time-dependent current to membrane-covered oxygen sensors. *Journal of electroanalytical chemistry*. 1993;348:1-14.
- (113) Gavaghan DJ, Rollett JS, Hahn CEW. Numerical simulation of the time-dependent current to membrane-covered oxygen sensors: Part III. Use of a microcathode in pulse amperometry. *Journal of electroanalytical chemistry*. 1993;348:15-27.
- (114) Sutton L, Gavaghan DJ, Hahn CEW. Numerical simulation of the time-dependent current to membrane-covered oxygen sensors. Part IV. Experimental verification that the switch-on transient. *Journal of electroanalytical chemistry*. 1996;408:21-31.
- (115) Otto AM, Brischwein M, Niendorf A, Henning T, Motrescu ER, Wolf B. Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. *Cancer Detection and Prevention*. 2003;27:291-296.
- (116) Wiest J, Brischwein M, Ressler J, Otto AM, Grothe H, Wolf B. Cellular Assays with Multiparametric Bioelectronic Sensor Chips. *Chimia*. 2005;59:243-246.
- (117) Heiskanen A, Yakovleva J, Spégel Ch, Taboryski R, Koudelka-Hep M, Emnéus J, Ruzgas T. Amperometric monitoring of Redox activity in living yeast cells: comparison of menadione and menadione sodium bisulfite as electron transfer mediators. *Electrochemistry Communications*. 2003;6:219-224.
- (118) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, Abe H, Hoshi H, Kasai S, Ohya H, Matsue T. Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2004;522:51-58.
- (119) Eklund SE, Cliffel DE, Kozlov E, Prokop A, Wikswø J, Baudenbacher F. Modification of the Cytosensor™ microphysiometer to simultaneously measure extracellular acidification and oxygen consumption rates. *Analytica Chimica Acta*. 2003;496:93-101.
- (120) Hoare JP. *The Electrochemistry of Oxygen*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1968.

- (121) Tang TE, Barr RE, Murphy VG, Hahn AW. A working equation for oxygen sensing disk electrodes. *Advances in experimental medicine and biology*. 1977;4:9-15.
- (122) Barr RE, Tang TE, Hahn AW. Variations on the response characteristics of oxygen electrodes. *Advances in experimental medicine and biology*. 1977;17-23.
- (123) Sohn B-K, Kim C-S. A new pH-ISFET based dissolved oxygen sensor by employing electrolysis of oxygen. *Sensors and Actuators*. 1996;34:435-440.
- (124) Lehmann M, Baumann W, Brischwein M, Gahle H-J, Freund I, Ehret R, Drechsler S, Palzer H, Kleintges M, Sieben U, Wolf B. Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001;16:195-203.
- (125) Wiest J, Brischwein M, Grothe H, Otto AM, Wolf B. Planar Microsensors for measurement of cellular respiration. *SENSOR 2005 Proceedings*. 2005;II:249-254.
- (126) Wiest J. Chip instead of mice: Planar and miniaturized microelectronic oxygen sensors for tumour chemosensitivity analysis. www.O2-FET.de . 2005.
- (127) Lehmann M, Baumann W. New insights into the nanometer-scaled cell-surface interspace by cell-sensor measurements. *Experimental Cell Research*. 2004;305:374-382.
- (128) Bergveld P. The operation of an ISFET as an electronic device. *Sensors and Actuators*. 1981;1:17-29.
- (129) Bergveld P. Thirty years of ISFETOLOGY What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators*. 2002;88:1-20.
- (130) Chou JC, Huang KY, SLin J. Simulation of time-dependent effects of pH-ISFETs. *Sensors and Actuators*. 1999;62:88-91.
- (131) Bousse LJ. The chemical sensitivity of electrolyte/insulator/silicon structures - Fundamentals of ISFET operation. 1982.
- (132) Meixner LK, Koch S. Simulation of ISFET operation based on the site-binding model. *Sensors and Actuators*. 1992;6:315-318.
- (133) Van Hal REG, Eijkel JCT, Bergveld P. A novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters. *Sensors and Actuators*. 1995;24-25:201-205.
- (134) Kühnhold R, Ryssel H. Modeling the pH response of silicon nitride ISFET devices. *Sensors and Actuators*. 2000;68:307-312.
- (135) Chou JC, Wang YF. Preparation and study on the drift and hysteresis properties of the tin oxide gate ISFET by the sol-gel method. *Sensors and Actuators*. 2001;86:58-62.
- (136) Bergveld P, van Hal REG, Eijkel JCT. The remarkable similarity between the acid-base properties of ISFETs and proteins and the consequences for the design of ISFET biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. 1994;10:405-414.

- (137) Schubnell D, Lehmann M, Baumann W, Rott FG, Wolf B, Beck DhF. An ISFET-algal (Chlamydomonas) hybrid provides a system for eco-toxicological tests. *Biosensors & Bioelectronics*. 1999;14:465-472.
- (138) Martinoia S, Rosso N, Grattarola M, Lorenzelli L, Margesin B, Zen M. Development of ISFET array - based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001;16:1043-1050.
- (139) Yates DE, Levine S, Healy ThW. Site-binding Model of the Electrical Double Layer at the Oxide/Water Interface. *Journal of The Chemical Society*. 1973;1807-1818.
- (140) Oehme F. *Chemischen Sensoren heute und morgen*. SENSORIK ed. Renningen-Malmsheim: Oehme,F.; 1994.
- (141) Hendrikse J, Olthuis W, Bergveld P. The EMOSFET as a potentiometric transducer in an oxygen sensor. *Sensors and Actuators*. 1998;47:1-8.
- (142) Hendrikse J, Olthuis W, Bergveld P. The EMOSFET as an oxygen sensor: constant current potentiometry. *Sensors and Actuators*. 1999;59:35-41.
- (143) Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg,Berlin; 1998.
- (144) Wikipedia - Die freie Enzyklopädie. <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite> . 2005.
- (145) Lochmann C, Hansel T, Haupl T, Beuthan J. An oxygen imaging system for medical applications: preliminary results. *Biomedizinische Technik*. 2006;51:111-115.
- (146) O'Riordan TC, Buckley D, Ogurtsov V, O'Connor R, Papkovsky DB. A Cell Viability Assay Based on Monitoring Respiration by Optical Oxygen Sensing. *Analytical Biochemistry*. 2000;278:221-227.
- (147) Basu BJ, Thirumurugan A, Dinesh AR, Anandan C, Rajam KS. Optical oxygen sensor coating based on the fluorescence quenching of a new pyrene derivative. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005;104:15-22.
- (148) John GT, Klimant I, Wittmann Ch, Heinzle E. Integrated Optical Sensing of Dissolved Oxygen in Microtiter Plates: A Novel Tool for Microbial Cultivationi. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;81:829-836.
- (149) Tsukada K, Sakai S, Hase K, Minamitani H. Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation. *Biosensors & Bioelectronics*. 2002;18:1439-1445.
- (150) Gillanders RN, Tedford MC, Crilly PJ, Bailey RT. Thin film dissolved oxygen sensor based on platinum octaethylporphyrin encapsulated in an elastic fluorinated polymer. *Science Direct*. 2003;502:1-6.
- (151) Papkovsky DB. New oxygen sensors and their application to biosensing. *Sensors and Actuators*. 1995;29:213-218.
- (152) Huber Ch, Klimant I, Krause Ch, Werner T, Mayr T, Wolfbeis OS. Optical sensor for seawater salinity. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2000;368:196-202.

- (153) Holst G, Glud RN, Kühl M, Klimant I. A microoptode array for fine-scale measurement of oxygen distribution. *Sensors and Actuators*. 1997;38-39:122-129.
- (154) Alderman J, Hynes J, Floyd SM, Krüger J, O'Connor R, Papkovsky DB. A low-volume platform for cell-respirometric screening based on quenched-luminescence oxygen sensing. *Biosensors & Bioelectronics*. 2003;19:1535.
- (155) Presley T, Kuppusamy P, Zweier JL, Ilangoan G. Electron paramagnetic resonance oximetry as a quantitative method to measure cellular respiration: A consideration of oxygen diffusion interference. *biophysical Journal*. 2006;91:4623-4631.
- (156) Marsh AG, Manahan DT. A method for accurate measurements of the respiration rates of marine invertebrate embryos and larvae. *Marine Ecology Progress Series*. 1999;184:1-10.
- (157) Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov AV, Margreiter R. Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1365:249-254.
- (158) Schneider H, Moser A. On the methodology of dissolved oxygen saturation concentration measurements. *Biotechnology Letters*. 1984;6:295-300.
- (159) Denantes P, Wiest J. Vorabstudie zur Gelöst-Sauerstoffbestimmung mittels Suszeptibilitätsmessung. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2006.
- (160) Proulx J. Respiratory Monitoring: Arterial Blood Gas Analysis, Pulse Oximetry, and End-tidal Carbon Dioxide Analysis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 1999;14:227-230.
- (161) Baumann WH, Lehmann M, Schwinde A, Ehret R, Brischwein M, Wolf B. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators*. 1999;B 55:77-89.
- (162) Ehret R, Baumann WH, Brischwein M, Lehmann M, Henning T, Freund I, Drechsler S, Friedrich U, Hubert M-L, Motrescu ER, Kob A, Palzer H, Grothe H, Wolf B. Multiparametric microsensor chips for screening applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2001;369:30-35.
- (163) Henning T, Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Freund I, Kammerer R, Lehmann M, Schwinde A, Wolf B. Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. *Anti-Cancer Drugs*. 2001;12:21-32.
- (164) Sprague LD, Beregov V, Sternbach GV, Brischwein M, Otto AM, Adam M, Wolf B, Molls M. Multiparametric sensor chip-based technology for monitoring metabolic activity: A proof-of-Principle study with live tissue. *Clinical Laboratory*. 2006;52:375-384.
- (165) Motrescu ER, Otto AM, Brischwein M, Zahler S, Wolf B. Dynamic analysis of metabolic effects of chloroacetaldehyde and cytochalasin B on tumor cells using bioelectronic sensor chips. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131:683-691.

- (166) Geisler Th, Ressler J, Harz H, Wolf B, Uhl R. Automated Multiparametric Platform for High-Content and High-Throughput Analytical Screening on Living Cells. *IEEE Transactions on Science and Engineering*. 2006;3:169-176.
- (167) Brischwein M, Geisler T, Lob V, Ressler J, Wiest J, Wolf B. Chip statt Maus: Mikrosensorarrays zur Chemikalienprüfung. *Nachrichten aus der Chemie*. 2006;54:115-120.
- (168) Brischwein M, Herrmann S, Vonau W, Berthold F, Grothe H, Motrescu ER, Wolf B. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing with Screen Printed Electrode Structures. *Lab on a Chip*. 2006;6:819-822.
- (169) Lob V, Brischwein M, Grothe H, Ressler J, Kaufmann K, Wolf B. Cell-bases assays: Mikrosensorarray-basiertes Screening an lebenden Zellen und Geweben. *Biospektrum*. 2005;511-512.
- (170) Deshpande RR, Koch-Kirsch Y, Maas R, John GT, Krause C, Heinzle E. Microplates with integrated oxygen sensors for kinetic cell respiration measurement and cytotoxicity testing in primary and secondary cell lines. *Assay and Drug Development Technologies*. 2005;3:299-307.
- (171) Wittmann Ch, Kim HM, John G, Heinzle E. Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnology Letters*. 2002;25:377-380.
- (172) Anderlei T, Buchs J. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*. 2001;7:157-162.
- (173) Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Buchs J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;17:187-194.
- (174) Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. High-resolution respirometry-a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology*. 2006;41:103-109.
- (175) Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA. 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*. 2007;292:C125-C136.
- (176) Thedinga E, Ullrich A, Drechsler S, Niendorf R, Kob A, Runge D, Keuer A, Freund I, Lehmann M, Ehret R. In Vitro System for the Prediction of Hepatotoxic Effects in Primary Hepatocytes. *ALTEX*. 2007;24:22-34.
- (177) Ceriotti L, Kob A, Drechsler S, Ponti J, Thedinga E, Colpo P, Ehret R, Rossi F. Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Analytical Biochemistry*. 2007;371:92-104.
- (178) Vonau W, Herrmann S, Berthold F, Mayer W, Bieger W. Sensorsignale aus dem Blut - Multiparameter-Messsystem. *Chemie Ingenieur Technik*. 2007;79:1385.

- (179) Vilkner T, Jansek D, Manz A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Analytical Chemistry*. 2004;76:3373-3386.
- (180) Owicki JC, Parce JW. Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry a cell biology of extracellular acidification. *Biosensors & Bioelectronics*. 1991;7:255-272.
- (181) Pancrazio JJ, Whelan JP, Borkholder DA, Ma W, Stenger DA. Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*. 1999;27:697-711.
- (182) Haruyama T. Micro- and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55:393-401.
- (183) Brischwein M, Motrescu ER, Cabala E, Otto AM, Grothe H, Wolf B. Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips. *Lab Chip*. 2003;3:234-240.
- (184) Vogel WM, Baris JM. Reduction of Oxygen on Platinum Black in Acid Electrolytes. *Electrochimica Acta*. 1977;22:1259-1263.
- (185) Sandison ME, Anicet N, Glidle.A., Cooper JM. Optimization of the Geometry and Porosity of Microelectrode Arrays for Sensor Design. *Analytical Chemistry*. 2002;74:5717-5725.
- (186) Cai X, Klauke N, Glidle A, Cobbold P, Smith GL, Cooper JM. Ultra-Low-Volume, Real-Time Measurements of Lactate from the Single Heart Cell Using Microsystems Technology. *Analytical Chemistry*. 2002;74:908-914.
- (187) Sosna M, Denuault G, Pascal RW, Prien RD, Movlem M. Development of a reliable microelectrode dissolved oxygen sensor. *Sensors and Actuators B*. 2007;123:344-351.
- (188) Pletcher D, Sotiropoulos S. Towards a microelectrode sensor for the determination of oxygen in waters. *Analytical Chemistry*. 1995;322:83-90.
- (189) Nilsson E. Modelling of the electrochemical treatment of tumors. Department of Chemical Engineering and Technology Applied Electrochemistry Royal Institute of Technology Stockholm, 2000.
- (190) Kolev SD, van der Linden WE, Olthuis W, Bergveld P. Mathematical modelling and optimisation of a coulometric sensor-actuator system based on three-dimensional diffusion. *Analytica Chimica Acta*. 1994;285:247-263.
- (191) Curtiss CF, Bird RB. Multicomponent Diffusion. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1999;38:2515-2522.
- (192) Christen HR, Meyer G. *Grundlagen der Allgemeinen und Anorganischen Chemie*. Frankfurt am Main: Salle + Sauerländer; 1997.
- (193) Gray D. *American Institute of Physics Handbook*. New York: McGraw-Hill; 1982.
- (194) Landolt H, Börnstein R, Eucken A. *Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*. Berlin: Springer Verlag; 1969.

- (195) Lautenschlager K-H, Schröter W. Taschenbuch der Chemie. Frankfurt am Main: Harri Deutsch; 2002.
- (196) Blank S, Wiest J. Finite Elemente Modellierung und experimentelle Validierung der physikalisch-chemischen Prinzipien biohybrider Mikrosensoren. Diplomarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2006.
- (197) Kong J, Franklin NR, Zhou C, Chapline MG, Peng S, Cho K, Dai H. Nanotube Molecular Wires as Chemical Sensors. *Science*. 1999;287:622-625.
- (198) Zhao J, Buldum A, Han J, Lu JP. Gas molecule adsorption in carbon nanotubes and nanotube bundles. *Nanotechnology*. 2002;13:195-200.
- (199) Ulbricht H, Moos G, Hertel T. Physisorption of molecular oxygen on single-wall carbon nanotube bundles and graphite. *Physical Review B*. 2002;66:1-7.
- (200) Suehiro J, Zhou G, Hara M. Fabrication of a carbon nanotube-based gas sensor using dielectrophoresis and its application for ammonia detection by impedance spectroscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2004;36:L109-L114.
- (201) Ong KG, Zeng K, Grimes CA. A Wireless, Passive Carbon Nanotube-Based Gas Sensor. *IEEE Sensors Journal*. 2002;2:82-88.
- (202) Ye J-S, Wen Y, De Zhang W, Cui H-F, Gan LM, Xu GQ, Sheu F-S. Application of multi-walled carbon nanotubes functionalized with hemin for oxygen detection in neural solution. *Journal of electroanalytical chemistry*. 2003;562:241-246.
- (203) Qi P, Vermesh O, Grecu M, Javey A, Wang Q, Dai H, Peng S, Cho KJ. Toward Large Arrays of Multiplex Functionalized Carbon Nanotube Sensor for Highly Sensitive and Selective Molecular Detection. *Nano Letters*. 2003;3:347-351.
- (204) Novak JP, Snow ES, Houser EJ, Park D, Stepnowski JL, McGill RA. Nerve agent detection using networks of single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters*. 2003;83:4026-4028.
- (205) Shim M, Kam NWS, Chen RJ, Li Y, Dai H. Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition. *Nano Letters*. 2002;2:285-288.
- (206) Besteman K, Lee J-O, Wiertz FGM, Heering HA, Dekker C. Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors. *Nano Letters*. 2003;3:727-730.
- (207) Lin Y, Lu F, Tu Y, Ren Z. Glucose Biosensors Based on Carbon Nanotube Nanoelectrode Ensembles. *Nano Letters*. 2003;4:191-195.
- (208) Baker SE, Cai W, Lasseter TL, Weidkamp KP, Hamers RJ. Covalently Bonded Adducts of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Oligonucleotides with Single-Wall Carbon Nanotubes: Synthesis and Hybridization. *Nano Letters*. 2002;2:1413-1417.
- (209) Yamamoto K, Shi G, Zhou T, Xu F, Xu J, Kato T, Jin J-Y, Jin L. Study of carbon nanotubes-HRP modified electrode and its application for novel on-line biosensors. *The Analyst*. 2003;128:249-254.

- (210) Poh WC, Loh KP, De Zhang W, Triparthy S. Biosensing properties of diamond and carbon nanotubes. *Langmuir*. 2004;20:5484-5492.
- (211) Franklin NR, Wang Q, Tomblor TW, Javey A, Shim M, Dai H. Integration of suspended carbon nanotube arrays into electronic devices and electromechanical systems. *Applied Physics Letters*. 2002;81:913-915.
- (212) Wiest J, Stadthagen T, Schmidhuber M, Brischwein M, Ressler J, Raeder U, Grothe H, Melzer A, Wolf B. Intelligent mobile lab for metabolics in environmental monitoring. *Analytical Letters*. 2006;39:1759-1771.
- (213) DeBusschere BD, Kovacs GTA. Portable cell-based biosensor system using integrated CMOS cell-cartridges. *Biosensors & Bioelectronics*. 2001;16:543-556.
- (214) Liao W-Y, Lee Y-G, Huang C-Y, Lin H-Y, Weng Y-C, Chou T-C. Telemetric electrochemical sensor. *Biosensors & Bioelectronics*. 2004;20:482-490.
- (215) Wiest J, Schmidhuber M, Cabala E, Brischwein M, Grothe H, Wolf B. Modular, wireless bioelectronic cell chip system. *IFMBE Proceedings*. 2005;11:3609-3613.
- (216) Grundl D, Wiest J. Konzeptionierung und Entwicklung eines Hochdurchsatzsystems zur Kalibrierung multiparametrischer Keramiksensoren. Diplomarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (217) Wiest J, Grundl D. RS232 kann CAN. *Design & Elektronik*. 2007;2:64-66.
- (218) Moradiellos-Rios S, Wiest J. Entwicklung einer Mehrfachventilsteuerung mit integrierter Controller-Area-Network Schnittstelle. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2006.
- (219) Wiest J, Cabala E, Schmidhuber M, Brischwein M, Grothe H, Wolf B. Intelligent mobile lab for detection and processing of cell vitality parameters.: 2006.
- (220) Grundl D, Wiest J. Entwicklung einer Langzeitspannungsversorgung und eines Softwaremoduls für das Intelligent Mobile Lab. Bachelorarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (221) Schmidhuber M, Wiest J. Design eines Messplatzes zur mobilen Analyse von lebenden Zellen für medizinische Diagnostik und Umweltanalytik. Diplomarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2004.
- (222) Milling J, Wiest J. Modulare Realisierung von Betriebskomponenten eines "intelligent mobile lab" Systems. Diplomarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2006.
- (223) Eireiner M, Wiest J. Vermessung von Ag/AgCl-Referenzelektroden. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (224) Katz S, Wiest J. Preliminary tests with pH and pO₂ sensors based on carbon nanotubes. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.

- (225) Zhao L, Gao L. Stability of multi-walled carbon nanotubes dispersion with copolymer in ethanol. *Colloids and Surfaces*. 2003;224:127-134.
- (226) Katz S, Wiest J. Carbon nanotube based sensors for oxygen measurement. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (227) Katz S, Wiest J. Development of a CNT based sensor for measurement of dissolved oxygen in fluids. Bachelorarbeit. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (228) Brown E, Markman M. Tumor chemosensitivity and chemoresistance assays. *Cancer*. 1996;77:1020-1025.
- (229) Wolf B, Brischwein M, Lob V, Ressler J, Wiest J. Cellular signaling: aspects for tumor diagnosis and therapy. *Biomedizinische Technik*. 2007;52:164-168.
- (230) Ding J, Feng Y, Wang H. From cell signaling to cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007;28:1494-1498.
- (231) Grundl D, Wiest J. Integrating RS-232 devices into CAN networks. *CAN Newsletter* [3], 37-38. 2007.
- (232) Wiest J, Brückl M, Schmidhuber M, Grundl D, Lob V, Brischwein M et al. Multiparametric, six channel, online analysis of MCF-7 cells. *MIPTEC 2007*: 2007.
- (233) Ilchmann F, Wiest J. Vergleich verschiedener niederohmiger, lösbarer Kontaktierungsverfahren. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2005.
- (234) Grote K-H, Feldhusen J. Taschenbuch für den Maschinenbau. Berlin: Springer Verlag; 2005.
- (235) Siekmann. Strömunglehre für den Maschinenbau, Technik und Beispiele. Berlin: Springer Verlag; 2001.
- (236) Diehl Th, Wiest J. Mikrofluidik des μLa . Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2007.
- (237) Brückl M. Verwendbarkeit des IMOLA für Chemosensitivitätstest. Protokoll. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2007.
- (238) Stadthagen T, Raeder U, Wiest J, Melzer A, Wolf B Intelligent mobile Laboratory (IMOLA). Biomonitoring mittels Biosensorchip-Technologie. Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Limnologie e.V.: 2006.
- (239) M.Rodriguez, Jr, Ch.A.Sanders, E.Greenbaum. Biosensors for rapid monitoring of primary-source drinking water using naturally occurring photosynthesis. *Biosensors & Bioelectronics*. 2002;17:843-849.
- (240) Zehnder A, Gorham PR. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz, emend, Elenkin. *Can J Microbiol*. 1960;6:645-660.

- (241) Stadthagen T. Entwicklung eines online Gewässermonitoringsystems mittels Biosensorchips zum Nachweis ausgewählter Xenobiotika. Dissertation. Technische Universität München. 2007.
- (242) Willems W. Umweltrisiko Medikament: Schmerzmittel im Grundwasser. Süddeutsche Zeitung 2007 Sep 1.
- (243) Herrmann S, Vonau W. Online-Analyse mit Lab-on-Chip-Systemen. Technisches Messen. 2004;71:613-618.
- (244) Wiest J, Brischwein M, Blank S, Grothe H, Wolf B Measurement and Simulation of the Dissolved Oxygen Concentration and the pH Value at the O₂-FET. 2006.
- (245) Wiest J, Blank S, Brischwein M, Grothe H, Wolf B Simulation of the dissolved oxygen concentration and the pH value at O₂-FET. Proceedings of the Sixth IASTED International Conference on Biomedical Engineering. 2008. ISBN: 978-0-88986-721-5.
- (246) Agmon N. Mechanism of hydroxide mobility. Chemical Physics Letters. 2000;319:247-252.
- (247) Tuckerman E, Marx D, Parrinello M. The nature and transport mechanism of hydrated hydroxide ions in aqueous solution. Nature. 2002;417:925-929.
- (248) Kielland J. Individual Activity Coefficients of Ions in Aqueous Solutions. Journal American Chemical Society. 1937;59:1675-1678.
- (249) Al-Baldawi NF, Abercrombie RF. Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient. biophysical Journal. 1992;61:1470-1479.
- (250) Wijmans JG, Baker RW. The solution-diffusion model: a review. Journal of Membrane Science. 1995;107:1-21.
- (251) Croll TI, Gentz S, Mueller K, Davidson M, O'Connor AJ, Stevens GW, Cooper-White JJ. Modelling oxygen diffusion and cell growth in a porous, vascularising scaffold for soft tissue engineering applications. Chemical Engineering Science. 2005;60:4924-4934.
- (252) Katz S, Wiest J. Reproduzierbarkeit von Messergebnissen an CNT Sensoren. Projektpraktikum. Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. 2006.
- (253) Wang J, Musameh M. Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors. The Analyst. 2003;129:1-2.
- (254) Britto PJ, Santhanam KSV, Rubio A, Alonso JA, Ajayan PM. Improved Charge Transfer at Carbon Nanotube Electrodes. Advanced Materials. 1999;11:154-157.
- (255) Wiest J, Grothe H, Wolf B. Chemischer Sensor sowie Verfahren zu dessen Herstellung. patent DE102005011012A1. 2006 Sep 2006.
- (256) Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo WH, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL. Functionalization density

- dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters*. 2006;161:135-142.
- (257) Harrison B, Atala A. Carbon Nanotube Applications for Tissue Engineering. *Biomaterials*. 2007;28:344-353.
- (258) Endo M, Hayashi T, Kim YA, Terrones M, Dresselhaus MS. Applications of Carbon Nanotubes in the Twenty-First Century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*. 2004;362:2223-2228.
- (259) Technische Universität München. IMETUM Das Zentralinstitut für Medizintechnik der Technischen Universität München. 2006.
- (260) Yu J, Jha SK, Xiao L, Liu Q, Wang P, Surya Ch, Yang M. AlGaIn/GaN heterostructures for non-invasive cell electrophysiological measurements. *Biosensors & Bioelectronics*. 2007;23:513-519.
- (261) Wiest J, Brischwein M, Grothe H, Wolf B. Miniaturisierbare, biokompatible Gelöst-Sauerstoff-Sensoren. *Chemie Ingenieur Technik*. 2005;77:1115-1116.
- (262) Wang P, Xu GX, Qin LF, Xu Y, Li Y, Li R. Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2005;108:576-584.