Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist an der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt (http://www.ub.tuwien.ac.at).

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology (http://www.ub.tuwien.ac.at/englweb/).



TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

Entwicklung eines mikroelektronischen Impedanzsensors mit mikrofluidischer Medienversorgung zur in vitro Charakterisierung humaner Epithelschichten

ausgeführt am Institut für Festkörperelektronik der Technischen Universität Wien

unter Anleitung von

O.Univ.Prof.Dr. Emmerich Bertagnolli Ass.Prof.Dr. Heinz Wanzenböck

durch

ANDREAS EXLER Matr.Nr. 0525874 Scheffelstraße 11/3/12, 1210 Wien

Wien, am 29.05.2013

(Unterschrift Verfasser)



Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen bedanken, die mich in jeder Situation dieses lehrreichen aber sehr anstrengenden Lebensabschnitts begleitet und unterstützt haben.

Den größten Dank muss ich meiner liebevollen Lebensgefährtin Elisabeth aussprechen, die mich in guten und weniger guten Zeiten des gesamten Studiums tatkräftig unterstützt und immer wieder ermutigt hat. Des Weiteren möchte ich mich für die Ermöglichung der Ausbildung bei meinen Eltern bedanken. Sie haben in allen Belangen meines Lebens an mich geglaubt.

Ich bedanke mich vorallem für das Vertrauen in mein Können und meinen Ehrgeiz bei meinem Betreuer, dem Institutsvorstand für Festkörperelektronik O.Univ.Prof. Dr.phil. Emmerich Bertagnolli. Ein weiteres Dankeschön gilt meinem zweiten Betreuer Ass.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heinz Wanzenböck für seine immerwährende Unterstützung und sein unermüdliches Engagement.

Weiterst bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen Dipl.-Ing. Johann Mika, welcher mir immer mit Verständnis und Rat zur Seite stand.



Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die quantitative Analyse von pharmazeutischen und medizinischen zellbiologischen Fragestellungen ein Impedanzanalysesystem mit einem Multisensor-Interface entwickelt. Die Impedanzspektroskopie eignet sich hervorragenden, um nicht invasive in-vitro-Untersuchungen an lebenden Zellkulturen durchzuführen. Zur Charakterisierung des Impedanzanalysesystems wurde die CaCo2-Zelllinie verwendet, welche die Eigenschaften des Dünndarmepithelgewebes widerspiegelt. Damit wird es möglich humanspezifische Fragestellungen wie z. Β. die Resorptionsfähigkeit oder die Regenerationsfähigkeit des Darmtraktes, nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu analysieren.

Mit dem zum Einsatz kommenden impedanzspektroskopischen Verfahren ist nicht nur eine kontinuierliche Langzeitmessung sondern auch eine präzis auflösende Analyse möglich. Hierfür kommen mikrotechnologisch strukturierte planare Interdigitated Electrodes (IDES) zum Einsatz. Für die Langzeitmessungen wurden zwei Elektrodenpaardesigns eingesetzt, welche jeweils vier getrennte Zellkulturen auf einem Multi Electrode Array, kurz MEA-Chip, vereinen. Die Anschlussgeometrie des MEA-Chips basiert auf dem MEA60 Biochipstandard von Multichannel Systems. Diese beiden Designs wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität und Auflösung miteinander verglichen. In dem IDES-4-Elektrodenpaardesign des einen MEA-Chips ist für jede Zellkultur ein Elektrodenpaar vorgesehen. Beim IDES-8-Elektrodenpaardesign des anderen MEA-Chipdesigns wurden pro Zellkultur je zwei Elektrodenpaare implementiert. Durch diese Weiterentwicklung gelang es zum einen eine höhere Auflösung zu erreichen und zum anderen räumliche Unterschiede in derselben Zellkultur detektieren zu können. Durch die höhere Auflösung sind zellwachstums- und umgebungsbedingte biologische Schwankungen besser erkennbar.

Die Versorgung von lebenden Zellen mittels Nährstoffen ist für Langzeitmessungen von essentieller Bedeutung. Das vorliegende Impedanzanalysesystem, welches über eine PC-Anbindung eine online-Analyse erlaubt, wurde deshalb um ein mikrofluidisches Versorgungssystem erweitert. Das Versorgungssystem besteht aus einer PC-gesteuerten hochpräzisen Spritzenpumpe und einem geschlossenen mikrofluidischen Zellkulturaufsatz. Mit der mikrofluidischen Versorgung kann zum einen eine Mediumsversorgung der Zellen über den Kultivierungszeitraum erfolgen und zum anderen können die vier Einzelreservoirs des MEA-Chips manuell und getrennt voneinander angesteuert werden. Damit die neuartige Medienversorgung mit dem Impedanzanalysesystem gleichzeitig gesteuert werden kann, wurde eine zusätzliche Softwaresteuerung implementiert. Demzufolge kann das komplette Impedanzanalysesystem über einen PC gesteuert und die Messdaten ausgewertet werden.

Die durchgeführten Messungen und Analysen des CaCo2-Zelllayers zeigen den Vorteil des besser aufgelösten IDES-8-Elektrodenpaardesigns und die Funktionalität des mikrofluidischen Versorgungssystems. Des Weiteren wurden erfolgreiche Permeabilitätsmessungen mit Bromelain als Permeation Enhancer und Regenerationsfähigkeitsmessungen nach mechanischen Beschädigungen der Zellschicht analysiert. Für die Grundlagenforschung ist das Wissen über den



Einfluss von pharmazeutischen Präparaten auf die Permeabilität des Darmtrakts und die Regenerationsfähigkeit der Darmwand nach mechanischen Beschädigungen für neuartige Heilungsmethoden und medikamentöse Behandlungen besonders interessant. Mit den vorliegenden Messungen kann die Besonderheit der Impedanzspektroskopie, welche quantitativ messbare Ergebnisse liefert, gezeigt werden.



Abstract

In this thesis an impedance-analyzer-system was developed and used for long-time impedance measurements of living epithelial tissue. The measurement of impedance spectra of cell cultures allows to address a wide range of pharmaceutical and medical cytological issues. As (f. e. on living cell cultures) most conventional analyses are based on qualitative optical results impedance spectroscopy offers an excellent instrument for non-invasive in-vitro investigations. The cells used for this study are the CaCo2-cellline. This cell culture has well defined metabolic and cell-cell contact properties comparable to the human small intestine epithelial cell walls. Combining the CaCo2-cells with the measurement system mentioned above allows to investigating important biological problems such as drug intake and regeneration properties.

The use of microstructural and planar interdigitated electrodes (IDES) provides low signal-to-noise ratio and allows long-time measurement. The IDES based on gold and are fabricated on glass-substrates with microstructural techniques. In the thesis two different electrode designs based on four separated culture wells with 8mm in diameter are presented. The wells are independent from each other and constitute one single cell culture. Using the 4-electrodepair-design each cell culture can be investigated by one electrode only. In contrast to this procedure the further developed 8-electrodepair-design provides two high resolving electrodes for each cell culture. This offers a better spatial resolution of culture-specific proliferation variations and a higher cell-cell contact resolution. This enhances the possibility of detecting environmental changes within the cell culture and provides for a better monitoring of intestinal drug intake. The two electrode designs are compared in order to evaluate different functionalities and resolutions. The contact pad is adapted to the Multichannel System MEA60 biochip standard.

The impedance-analyzer-system contains a specific software solution for monitoring PC-based long-time measurement. By implementing a microfluidic media supply made of biocompatible materials the system can be extended. The microfluidic system includes a high-precision syringe pump and an extended cell-sensor-design. With this system a continuous media supply over the whole culture period is possible. The flow into separated culture wells can be selected manually, thus simulating different cell environments. For the whole system the new microfluidic device includes a control-software to guarantee a continuous online-monitoring. Therefore it is possible to analyze the measured data in real-time. For a successfully measurement system it is necessary to take care of biocompatible materials in the whole system. With this requirement all components such as gold-electrodes, glass-substrate, the PDMS-cell-culture-system, microfluidic components such as silicon tubes and steel-alloys hollow needles are biocompatible.

Finally it can be stated that the measurements carried out with the 8-electrode-design have the advantage it can be concluded of higher resolution. The functionality of the microfluidic supplying device and its control-software has been demonstrated. Furthermore, successful permeability measurements with Bromelain as permeation enhancer as well as measurements of the regenerative properties of the CaCo2-cellmonolayer could be demonstrated. With the improved impedance-analyzer-system not only a good quantitative diagnostic instrument has been implemented but it is also provided for a system which enables reproducible results in the biological distribution.



Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Kurzfassung	v
Abstract	vii
Inhaltsverze	ichnisix
1. Eir	leitung
1.1. Mo	ptivation1
1.2. Zie	۱2
2. Th	eorie
2.1. Mi	krosystemtechnik
2.1.1.	Lithographie4
2.1.2.	Beschichtungsverfahren7
2.1.3.	Ätzverfahren11
2.2. Im	pedanzspektroskopie
2.2.1.	allgemeine Impedanzspektroskopie13
2.2.2.	Impedanzspektroskopie einer Zellmonoschicht14
2.2.3.	Elektrodengeometrie und Elektrodeneigenschaften17
2.3. bio	blogischer Aufbau und Verhalten der Zelle18
2.3.1.	biologischer Zellaufbau18
2.3.2.	Die Epithelzelle
2.3.3.	Human Colon Adenocarcinoma - CaCo2
2.3.4.	Kommunikation und Kontaktierung von Zellverbänden
2.3.5.	Permeation Enhancer
2.4. Mi	krofluidik
2.4.1.	Der mikrofluidische Grundgedanke25
2.4.2.	Physik der Mikrofluidik
2.4.3.	Mikrofluidische Anwendungen27
2.4.4.	Polydimethylsiloxan – PDMS
3. Ex	perimentelle und analytische Entwicklung
3.1. Mi	ulti Electrode Array (MEA) – Chip



3.1	.1.	Reinigung und Aufbereitung	. 31			
3.1	.2.	Chromschicht	. 31			
3.1	.3.	IDES-Strukturierung	. 32			
3.1	.4.	IDES-Herstellung	. 34			
3.1	.5.	Die Definierung der IDES-Elektrodenfläche	. 35			
3.2.	Zellk	ultursysteme	. 38			
3.2	.1.	Offenes Zellkultursystem	. 38			
3.2	.2.	Geschlossenes Zellkultursystem	. 39			
3.3.	Das	Biolabor	. 45			
3.3	.1.	Inkubator	. 45			
3.3	.2.	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	. 45			
3.3	.3.	Autoklav	. 46			
3.3	.4.	weitere Komponenten des Zelllabors	. 46			
3.3	.5.	Zubehör und Verbrauchsmaterialien	. 47			
3.4.	Zellk	ultivierung auf dem MEA-Chip	. 48			
3.4	.1.	Zellmedien	. 48			
3.4	.2.	Die Zellkulturaussaat	. 49			
3.4	.3.	Der Mediumwechsel	. 49			
3.4	.4.	Die Zellpassage	. 49			
3.4	.5.	Bestimmung der Zellzahl	. 50			
3.5.	Das	Impedanzmesssystem	. 52			
3.5	.1.	Das Impedanzspektrometer - SCIOSPEC ISX-3	. 52			
3.5	.2.	Sciospec MEArack	. 53			
3.5	.3.	Mess- und Steuerungssoftware	. 54			
3.6.	Mikı	ofluidikversorgung	. 55			
3.7.	Stan	dardprozedur einer Impedanzmessung	. 58			
4.	Resu	Iltate und Diskussion	. 61			
4.1.	Verv	/erwendbarkeit des gedruckten PDMS-Masters61				
4.2.	Elektrische Charakterisierung der Zellschicht während einer mechanischen Beeinflussung					
4.3.	Elek Beei	Elektrische Charakterisierung der Zellschicht während einer chemischen Beeinflussung				
4.4.	Elek Beei	trische Charakterisierung der geschädigten Zellschicht mit zusätzlicher chemischer nflussung	. 74			



4.5.	Charakterisierung des Mikrofluidiksystems	
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Abbildungsverzeichnis	
8.	Tabellenverzeichnis	





1. Einleitung

1.1. Motivation

Die immer wichtiger werdende interdisziplinäre Zusammenarbeit der naturwissenschaftlichen Disziplinen Mikroelektronik und Medizin, welche historisch gesehen keine oder nur wenig Berührungspunkte besitzen sind heute schon und auch zukünftig untrennbar miteinander verknüpft. Die Medizin und Biologie liefern die zu untersuchenden Objekte. Diese können unter anderem komplexe Organismen in Form von Pflanzen, Tieren oder dem Menschen, aber auch Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze sein. Jedoch sind oft kleinere Teilbereiche eines Organismus, z.B. die Zelle als kleinste lebende Einheit oder die DNA als Träger des Erbguts, leichter zu verstehen, zu analysieren aber auch zu simulieren [1]. Für solche Fragestellungen hat sich die Physik, Chemie und deren Teilbereiche die Elektrotechnik und Pharmazie als idealer Partner herausgestellt.

Die Biochemie und Pharmazie benützen schon seit vielen Jahren und Jahrzehnten chemische Analyseverfahren. In den letzten Jahren hat sich durch den rasanten Fortschritt in Bereichen der Mikrostrukturierung und Nanotechnologie eine weitgehende Miniaturisierung vieler Verfahren durchgesetzt. Die Miniaturisierung ermöglicht mehrere Analysemethoden auf kleinem Raum und ist unter den Begriffen "lab-on-a-chip – LOC" und "micro-total-analysis-system – μ TAS" als Gesamtanalysesystem zusammengefasst. Dazu zählen z.B. zur DNA-Sequenzierung die so genannten DNA-Chips [2].

Neben den chemischen Analyseverfahren gibt es noch eine zweite Analysemöglichkeit, die unter den Begriff elektrische Spektroskopie zusammengefasst werden kann. Hierin hat sich speziell die Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des elektrischen und dielektrischen Verhaltens im Bereich der Zell- und Mikrobiologie als alternatives Instrument zu optischen Verfahren, wie z.B. der Fluoreszenzmikroskopie bewährt. Im Bereich der Zellbiologie wird aufgrund der oftmals schwer umsetzbaren in-vivo-Messmethoden direkt aus einem Gewebe entnommene oder bereits kultivierte pflanzliche oder tierische Zellen in-vitro kultiviert und analysiert. Genau hier kann die Impedanzspektroskopie als Schnittstelle zwischen den biologischen, chemischen Vorgängen und der reinen optisch qualitativen Begutachtung eingesetzt werden. Um dieses Ziel umzusetzen soll in dieser Arbeit, mit Hilfe von Techniken der Mikrostrukturierung, planare Elektroden auf einem biokompatiblen Substrat z.B. aus Glas gefertigt werden. Adhärente Zellen oder Zellen in Suspension können so in mehreren Zellkulturkammern elektrisch beobachten und analysieren werden. Die Fragestellungen, die hiermit beantwortet werden können, sind unter anderem das Zellwachstum auf verschiedenen Oberflächen und unter verschiedenen Umgebungsbedingungen sowie die Zellwanderung und Zellmorphologie [3]. Weitere für die Pharmazie interessante Analysen betreffen die Aufnahmefähigkeit von biochemischen Substanzen der Zellmembran über



Transmembranproteine in den Intrazellulärraum und die Mechanismen der transzellularen und parazellularen Transportwege [4].

Als wichtige Unterscheidungsmerkmale der Impedanzspektroskopie im Vergleich zu chemischen Routineuntersuchungen ist die nicht invasive und label-freie Durchführung von Analysen auf elektrischem Weg zu nennen. Hiermit eröffnet sich der Vorteil, dass ein kontrollierbares Zellwachstum ohne Einfluss von Markern, welche die Zellkultur in ihren Eigenschaften beeinflussen können, zu beobachten. Mit der zusätzlichen rasanten Entwicklung des mikro- und nanotechnologischen Sektors kann die Impedanzspektroskopie zukünftig ein wichtiges Instrument für Standardanalysen werden.

Wesentliche Bereiche die noch umfangreichere Untersuchungen bedürfen, sind die Reaktionen von humanen Epithelschichten nach chemischen oder mechanischen Störungen, wie z.B. Zugabe von Permeation Enhancer oder mechanische Beschädigungen. Die Ziele der Weiterentwicklungen sind in Abschnitt 1.2 dargestellt.

1.2. Ziel

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Entwicklung eines Impedanzanalysesystems zur Analyse von lebenden Zellkulturen. Die Aufgaben wurden im Rahmen dieser Arbeit in drei Zielsetzungen untergliedert (siehe Abbildung 1.1) die systematisch abgearbeitet wurden.



Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der Zielsetzungen

• Impedanzspektroskopie

Ein Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines Impedanzspektroskopie-Messsystems. Das Messsystem besteht aus einem Impedanzspektrometer, einer Steuerungssoftware und den Elektroden. Die Steuerungssoftware soll so implementiert werden, dass eine Messung ständig überwacht und ausgewertet werden kann. Als Sensoren kommen Interdigitated Electrodes (IDES) mit zwei Designs zum Einsatz, welche sich hinsichtlich geometrischer und räumlicher Auflösung unterscheiden.



• Echtzeit-Monitoring biologischer Fragestellungen

Zur elektrischen Charakterisierung werden Epithelzellen aus einer CaCo2-Zelllinie verwendet. Mit diesen CaCo2-Zellen wird der transzellulare Stofftransport bei Permeabilitätsmessungen untersucht. Bei den Permeabilitätsmessungen kommt Bromelain zum Einsatz, welches die Permeabilität und damit die Zell-Zell Kontakte der Zellmonoschicht beeinflusst. Des Weiteren wird die Regenerationsfähigkeit der Zellmonoschicht nach einer simulierten Verletzung des Zellverbundes beobachtet.

• Mikrofluidikversorgung

Für die nährstoffbedingte Versorgung der Zellkultur soll ein adaptives, vom Messsystem unabhängiges, Mikrofluidiksystem implementiert werden. Das Mikrofluidiksystem dient der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und der optionalen Zugabe chemischer Substanzen die die Permeabilität der Zellschicht beeinflussen (z.B. Bromelain). Die Versorgung soll des Weiteren über eine Softwarelösung in die externe Steuerung eingebunden sein.

Die 3 Hauptziele wurden systematisch bearbeitet und sind in einzelne Kapitel dargestellt, wobei folgende Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen der Mikrosystemtechnik, das Impedanzspektroskopie, Mikrofluidik und die biologischen und elektrischen Gegebenheiten der Zellen. Das darauf folgende Kapitel 3 beinhaltet alle relevanten Design- und Herstellungsverfahren sowie einen kleinen Auszug für Gerätschaften in einem Zellkulturlabor und methodische Abläufe für eine erfolgreiche Impedanzmessung. Vor dem letzten Kapitel 5, welches eine kurze Zusammenfassung der Arbeit und Ausblicke über zukünftig interessante Fragestellungen gibt, werden in Kapitel 4 alle Resultate beschrieben. Die Resultate sind dabei in kompakter, übersichtlicher und bildlicher Darstellung zusammengefasst und werden hinsichtlich der Ergebnisse genau diskutiert.



2. Theorie

Die theoretische Aufarbeitung des komplexen Themas der Impedanzspektroskopie und dessen mit eingeschlossenen Bereichen soll in diesem Kapitel aufgearbeitet werden. Zu Beginn wird die Mikrosystemtechnik für die Herstellung des MEA-Chips besprochen. Im Anschluss daran folgt ein Abschnitt über die Impedanzspektroskopie. Nach der technischen Annäherung an das Thema der Impedanzspektroskopie folgt die biologische Aufarbeitung des zu untersuchenden Objekts, die Zelle. Zu guter letzt wird das Thema der Mikrofluidik in einem eigenen Abschnitt behandelt.

2.1. Mikrosystemtechnik

Die Mikrosystemtechnik stellt für die vorliegende Arbeit einen großen und wichtigen Teil dar. Mit einigen in der Mikrosystemtechnik entwickelten Verfahren wird der MEA-Chip gefertigt. Auf alle, für die Herstellung, benötigten Verfahren, wie der Photolithographie, Beschichtungsverfahren, Ätzverfahren und Plasmaveraschung wird in diesem Kapitel genau eingegangen. Es wird hier jedes zum Einsatz kommende Verfahren, die benötigten Komponenten und dessen Funktionsprinzip erklärt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden überblicksweise vorgestellt und die Prozessabfolge im Kapitel 3.1 genau besprochen.

2.1.1. Lithographie

Die Lithographie ist für viele Anwendungen der Mikrosystemtechnik, sei es bei der Herstellung integrierter Schaltkreise, dreidimensionaler Strukturen oder im vorliegenden Fall Oberflächenelektroden in Form von Interdigitated Electrodes (IDES) das Verfahren der Wahl. Heutzutage kommen vorwiegend die Photolithographie, Extreme UV-Lithographie und Elektronenstrahllithographie zum Einsatz [5]. Das Ziel der Verfahren ist es, eine Oberfläche zu strukturieren um, sie direkt zu verwenden oder für nachfolgende Prozessschritte vorzubereiten. Zu diesem Zweck wird ein geeigneter Lack (engl. resist) auf eine zu strukturierende Oberfläche aufgebracht. Die Strukturierung erfolgt bei der Photolithographie und Extreme UV-Lithographie über einen Belichtungsschritt, wobei eine geeignete Maske den Lackbereich abdeckt. Die Elektronenstrahllithographie kommt hingegen gänzlich ohne Masken aus, da der fokussierbare Elektronenstrahl softwaregesteuert die Strukturierung durchführt [6].

Das heißt, die Herangehensweise ist bei allen genannten Verfahren gleich, jedoch ist die Auflösungsgrenze der entscheidende Unterschied. Bei dem ältesten Verfahren, der Photolithographie, werden mit den verwendeten Hg- oder Hg/Xe-Hochdrucklampen durch das Emissionsspektrum die charakteristischen Wellenlängen λ_g =436nm (g-Linie), λ_h =405nm (h-Linie) und λ_i =365nm (i-Linie) erzeugt. Hierdurch kann eine Auflösungsgrenze von 0,8µm erreicht werden



[6]. Die modernen ArF-Excimer-Lasern mit einer Wellenlänge λ =193nm erreichen eine Auflösungsgrenze von 0,3µm. Bei dem modernsten Verfahren, der Elektronenstrahllithographie können ohne Masken, durch Fokussierung des Elektronenstrahls, Auflösungsgrenzen von 20nm erreicht werden [6].

In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich mit der Photolithographie gearbeitet, da das Verfahren für die zu erzielende Strukturgröße ausreichend gute Ergebnisse liefert. Wie bereits erwähnt wird der Photolack mit UV-Licht durch eine Chrom-Maske belichtet. Die gewünschte Maske wird in einem CAD-Programm erstellt und mittels eines Laser-Maskenschreibers entsteht die Chromstruktur auf einem Quarzglas. Bei den Masken unterscheidet man zwischen einer Hellfeld- und einer Dunkelfeldmaske. Die Verwendung einer Hellfeld- oder Dunkelfeldmaske ist abhängig von dem verwendeten Photolack, der gewünschten Struktur und deren Eigenschaften.

Ein Photolack besteht grundsätzlich aus einem Harz, einer lichtempfindlichen Komponente und einem Lösungsmittel. Das Harz bestimmt im Wesentlichen die Eigenschaften wie Haftung, thermische und chemische Widerstandsfähigkeit. Die lichtempfindliche Komponente wird benötigt, um den Lack strukturieren zu können. Das Lösungsmittel, welches die Viskosität einstellt, hält den Lack in seinem flüssigen Zustand. Wie in Abbildung 2.1 ersichtlich ist gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Photolacktypen. Bei dem positiv-Photolack werden die belichteten Bereiche für einen anschließenden Entwicklungsschritt löslich. Im Falle eines negativ-Phototolackes (z.B. SU-8-Photolacke [7]) können bei der Entwicklung die unbelichteten Stellen entfernt werden. Die dritte Photolackvariante ist die eines Images Reversal Photoresists (z.B. AZ 5214E-Photolack [8]), welcher durch einen Image Reversal Bake von einem positiv-Photolack in einen negativ-Photolack umgewandelt werden kann.



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Photolacktypen [6].



Da nun die Begriffe der Hellfeld- und Dunkelfeldmaske erklärt wurden, können in Verbindung mit den unterschiedlichen Photolacken die Wirkungsweisen erläutert werden. Im Falle des positiv-Photolacks in Abbildung 2.2 wird eine Hellfeldmaske verwendet, welche die belichteten Bereiche des Lacks im Entwickler löslich macht. Die unbelichteten Gebiete sind dagegen im Entwickler unlöslich und es entsteht ein Positiv-Bild. Bei einem negativ-Lack in Verbindung mit einer Hellfeldmaske (Abbildung 2.2) bewirkt eine Belichtung den gegenteiligen Effekt. Hier werden die belichteten Bereiche vernetzt und damit für den Entwickler unlöslich. Die unbelichteten Bereiche bleiben hingegen löslich und werden von dem Entwickler entfernt, es entsteht eine Negativ-Bild. Bei einer Dunkelfeldmaske entsteht genau das gegenteilige Bild der beschriebenen Vorgänge.

Wie bereits beschrieben erfolgt die Belichtung des Photolacks über eine Chrom-Maske, welche die gewünschten Bereiche abdeckt. Hierfür haben sich drei Belichtungsverfahren etabliert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren wird als Kontaktbelichtung bezeichnet. Dabei wird die Maske mittels eines Mask-Aligners (Karl Suss MJB 3) ausgerichtet und in direkten mechanischen Kontakt mit dem Photolack gebracht (siehe Abbildung 2.2-a). Dies hat den Vorteil, dass die Auflösung der Struktur jener der Maske entspricht. Jedoch kann die Probe durch den Kontakt beschädigt werden. In Abbildung 2.2-b sieht man die so genannte Proximitybelichtung bei der zwischen Maske und Photolack ein Abstand bleibt der mechanische Beschädigung vorbeugt, jedoch wird dadurch die Auflösung reduziert. In der Industrie wird vor allem das Projektionsbelichtungsverfahren (Abbildung 2.2-c) eingesetzt bei dem über ein Linsensystem die Belichtung erfolgen kann. Die Projektionsbelichtung sorgt in Verbindung mit einer, von der Umwelt, abgeschlossenen Produktion für einen höheren Durchsatz bei geringerer Verunreinigung. Durch das Linsensystem lässt sich weiters eine Verkleinerung der Struktur erzielen.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Belichtungsverfahren in der Photolithographie: (a) Kontaktbelichtung, (b) Proximitybelichtung, (c) Projektionsbelichtung [6].



2.1.2. Beschichtungsverfahren

Für das Beschichten von Oberflächen existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren mit speziellen Eigenschaften. Generell ist das Ziel eine dünne Schicht, im nm- bis um-Bereich, aus leitfähigen oder nicht leitfähigen Materialen isotrop oder anisotrop auf einer Zieloberfläche aufzubringen. Hierfür haben sich die physikalischenund die chemischen-Gasphasenabscheidungsverfahren als zielführend erwiesen. Diese sollen im Folgenden besprochen werden. Zunächst soll auf physikalische Abscheideverfahren eingegangen werden. Diese Prozesstypen können grob in das Aufdampfen und das Sputtern unterteilt werden (siehe Abbildung 2.3).



Abbildung 2.3: Schematische Ansicht der physikalische Gasphasenabscheidungen.

Aufdampfen

Das Aufdampfen kann noch in ein thermisches Aufdampfen (siehe Abbildung 2.4) und ein Elektronenstrahlaufdampfen unterteilt werden. Beide Verfahren haben jedoch gemein, dass das Targetmaterial stark erhitzt (500-3000°C) und damit in die Gasphase übergeführt wird [5]. In einem Fall erfolgt die Aufheizung großvolumig über ein Widerstandselement, im anderen Fall kommt ein Elektronenstrahl zum Einsatz. Dieser Vorgang geschieht in einem Ultra-Hochvakuum. Bei diesem Verfahren können Schichten nacheinander aus unterschiedlichen Materialien aber durch gleichzeitiges Bedampfen auch Legierungen erzeugt werden [9]. Die Aufdampfrate kann über ein Schwingquarz-Messsystem gemessen werden. Beim Vorgang des Aufdampfens erfolgt eine Materialablagerung auch am Schwingquarz, welcher dadurch seine Resonanzfrequenz ändert. Die Änderung der Resonanzfrequenz korreliert mit der Masse an abgelagertem Material. Mit der spezifischen Dichte des Materials und der gemessenen Aufdampfrate kann die Temperatur kontrolliert werden [5].





Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer thermischen Aufdampfanlage [5].

Sputtern

Das zweite Verfahren im Bereich der physikalischen Gasphasenabscheidung ist das so genannte Sputtern. Auch hier werden Spezialvarianten wie DC-/RF-Sputtern, Magnetron-Sputtern, Bias-Sputtern, Ionenstrahl-Sputtern, Reaktiv-Sputtern, Dioden/Trioden-Sputtern unterschieden. Diese Spezialvarianten besitzen jedoch das gleiche Grundprinzip. Diesem Grundprinzip liegt im Gegensatz zum Aufdampfen, bei dem das Targetmaterial in die Gasphase übergeführt wird, ein mechanischer Abtrag des Targetmaterials durch Beschuss von Fremdionen zugrunde.

Diese Abscheidung erfolgt wiederum im Vakuum, damit eine homogene Schichtbildung erfolgen kann. Dazu wird wie in Abbildung 2.5 ersichtlich ist, das Substrat mit einem Rotationsteller unterhalb des Targetmaterials angeordnet. Innerhalb der Vakuumkammer wird ein Plasma, aus z.B. inerten Ar⁺-Ionen, gezündet. Den Ar⁺-Ionen werden Energien im Bereich E=200-1000eV über eine angelegte Gleichspannung oder RF-Wechselspannung zugeführt [9]. Das Targetmaterial dient hierfür als Kathode zu der die Ar⁺-Ionen hinbeschleunigt werden. Mit der zugeführten Energie, welche höher als die jeweilige Bindungsenergie sein muss, sind die Ar⁺-Ionen in der Lage, Atome oder Moleküle aus dem Gitterverbund das Targetmaterial herauszuschlagen. Bei diesem Vorgang werden deutlich höhere Energien als beim Aufdampfverfahren erreicht. In Folge dessen, kann das abgesputterte Targetmaterial in das Substrat tiefer eindringen. Dieser Effekt erhöht die Bindung an der Substratoberfläche [9]. Durch die Verwendung von nicht reaktionsfähigen Edelgasionen gelangt das reine Targetmaterial zum Substrat und bildet eine konforme Schicht. Das hat zunächst den Vorteil, dass nur das Targetmaterial, seien es Metalle, z.B. Gold, Titan, Silber, Chrom, Platin, etc. aber auch Oxide wie Indiumzinnoixd, auf die Substratoberfläche gelangen. Damit muss allerdings das gewünschte Material als Target vorliegen. Beim reaktiven Sputtern hingegen kann ein reaktives Gas, z.B. Sauerstoff, dem Sputterprozess zusätzlich zugeführt werden. Hierdurch ist auch eine, vom Targetmaterial, abweichende Schichtbildung von z.B. Titanoxid möglich.





Schema einer DC-Sputteranlage 1: Rezipient, 2: Kathode, 3: Target, 4: Kühlwasserzufuhr, 5: Isolator, 6: Vakuumdichtung, 7: Gaseinlass, 8: Spannungsversorgung, 9: Hochvakuumventil, 10: Substratträger, 11: Substrate



chemische Gasphasenabscheidung

Bei der physikalischen Gasphasenabscheidung, wird das abzuscheidende Material von einem Target zum Substrat, bedingt durch thermische oder mechanische Effekte, transportiert. Im Falle der chemischen Gasphasenabscheidung (CVD) erfolgt die Schichtbildung, über eine chemische Reaktion, direkt am Substrat. Die chemische Reaktion kann durch unterschiedliche Effekte in Gang gesetzt werden. Damit ergibt sich eine Verfahrensunterteilung (siehe Abbildung 2.6) in die "thermische CVD", "plasmaunterstützte CVD", "laserunterstützte CVD" oder eine Kombination einzelner Verfahren.



Abbildung 2.6: Schematische Ansicht chemische Gasphasenabscheidungen.

Generell können die CVD-Verfahren zu den isotropen Abscheidungsverfahren gezählt werden, da die chemische Reaktion an der Substratoberfläche erfolgt [5]. Die Einsatzgebiete der CVD liegen vorallem in der Herstellung von dielektrischen Schichten (z.B. Siliziumoxid, Siliziumnitrid) und Halbleiterschichten (z.B. poly-Silizium). Die Dielektrika dienen als Isolationsschichten in der Schaltungs- und Bauteilentwicklung aber auch als Hartmasken für spätere Ätzvorgänge. Die Qualität der aufgebrachten Schicht hängt wesentlich von der Substrattemperatur, Abscheiderate und dem verwendeten Prozessdruck ab [5].



Für die chemische Reaktion an der Substratoberfläche bedarf es mindestens eines Reaktanten, bezeichnet als Precursor. Für viele Dielektrika sind zwei Precursor gebräuchlich. Im Falle der Si₃N₄-Abscheidung diffundieren die Precursor Silan – SiH₄ und Ammoniak – NH₃ zu der Oberfläche. Hier findet nun eine Adsorption der Reaktanten an der Oberfläche statt. Die unterschiedlichen Precursor-Gase reagieren miteinander, das flüchtige Reaktionsprodukt desorbiert von der Oberfläche und es kommt somit zur Schichtbildung. Nun wird das Reaktionsprodukt über die Gasphase abtransportiert [9]. Im Falle der Precursor Silan und Ammoniak entsteht durch Abspaltung von Wasserstoff eine Siliziumnitridschicht (siehe Formel (2.1)).

$$3 \operatorname{SiH}_4(g) + 4 \operatorname{NH}_3(g) \rightarrow \operatorname{Si}_3\operatorname{N}_4(f) + 12 \operatorname{H}_2(g)$$
 (2.1)

Bei dem Spezialverfahren der PECVD (siehe Abbildung 2.7) kann z.B. das Substrat auf einem Probenteller liegen, der auf eine bestimmte Temperatur aufgeheizt wird. Zusätzlich wird ein elektrisches Wechselfeld angelegt und damit ein Plasma gezündet, welches den Precursor-Gasen zusätzlich Energie zuführt. Dies hat den Vorteil, dass die Temperaturen im Vergleich zu thermischen CVD-Verfahren relativ gering gehalten werden können.



Abbildung 2.7: Schematische Darstellung einer PECVD-Anlage [6].



2.1.3. Ätzverfahren

Alle Ätzverfahren lassen sich zunächst grob in Ätzverfahren mit Ätzlösung, dem nasschemischen Ätzen, und jene ohne Ätzlösung, dem Trockenätzen, unterscheiden (siehe Abbildung 2.8). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das Ätzverhalten. Das nasschemische Ätzen zeigt meist ein isotropes Verhalten, indem das zu ätzende Material in jeder Raumrichtung gelöst wird. Die Selektivität des nasschemischen Ätzens wird primär durch die Ätzlösung beeinflusst. In dieser Arbeit wird vorallem das anisotrope Verhalten des Trockenätzens verwendet und wird daher genauer beschrieben.



Abbildung 2.8: Schematische Ansicht der Ätzverfahren.

Alle Trockenätzvarianten können sowohl isotropes als auch anisotropes Verhalten aufweisen. Die Selektivität ist jedoch stark von der Prozessart abhängig. Das Trockenätzen hat sich bedingt durch die gute Herstellbarkeit strukturierter Bereiche gegenüber den nasschemischen Verfahren weitgehend durchgesetzt. Aus diesem Grund sollen hier die grundlegenden Unterschiede der ursprünglichen Ionenstrahlprozesse und Plasmaprozesse, sowie der Kombination beider Verfahren herausgearbeitet werden.

Für das Ionenstrahlätzen wird ein gerichteter Ionenstrahl zumeist aus Ar⁺-Ionen verwendet. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld, in Richtung der Probe, beschleunigt und treffen dort mit hoher Energie auf der Oberfläche auf. Der Einsatz von Edelgasen hat hier den Vorteil, dass keine chemische Reaktion zwischen den Ar⁺-Ionen und der zu ätzenden Oberfläche auftritt. Dieser Ionenstrahl trägt an der Angriffsfläche das vorhandene Material ab. Damit erzeugt dieses Verfahren einen anisotropen, physikalischen Materialabtrag. Ein Nachteil des Ionenstrahlätzens ist die geringe Selektivität, da das Absputtern weitestgehend unabhängig von dem vorhandenen Material erfolgt. Damit entsteht z.B. für eine photolithographisch aufgebrachte Maskierung und das eigentliche Ätzgut näherungsweise eine ähnliche Ätzrate. Hierdurch können keine tiefen Ätzprofile erzeugt werden [6], [9].



Der Nachteil der geringeren Selektivität kann mit dem Plasmaätzverfahren deutlich verbessert werden. Hier wird in einer Reaktorkammer ein Sauerstoffplasma über ein RF-Wechselfeld gezündet. Dieses Sauerstoffplasma führt im Gegensatz zum Ionenstrahlätzen zu einem reinen chemischen Abtrag der Substratoberfläche von organischen und kohlenstoffhaltigen Verbindungen. Der Abtrag erfolgt großflächig über die gesamte Probenfläche, um damit z.B. Photoresistmaterialien zu entfernen.

In der vorliegenden Arbeit wird nicht die Funktionalität des Materialabtrags genutzt. Jedoch kann bei kurzer Aktivierung des O₂-Plasmas eine hydrophile Oberfläche erzeugt werden. Diese hilfreiche Begleiterscheinung kann z.B. dazu genutzt werden, um das an sich hydrophobe Silikonpolymer Polydimethylsiloxan (PDMS) in einen reversiblen hydrophilen Zustand zu versetzen. Dadurch können starke Verbindungen zwischen PDMS und Glas oder PDMS und PDMS hergestellt werden (siehe Abschnitt 2.4.4).

Viele Trockenätzverfahren kombinieren den anisotropen Vorteil des Ionenstrahlätzens mit der hohen Selektivität des Plasmaätzverfahrens. Dieses Verfahren wird als Reaktives Ionenätzen – RIE bezeichnet (siehe Abbildung 2.9). Hier wird der physikalische Materialabtrag mit einem chemischen Ätzvorgang vereint. Ein Argon-Plasma schwächt z.B. eine Siliziumnitridschicht – Si₃N₄ an der Substratoberfläche und stellt damit dem physikalischen Abtrag des Verfahrens bereit. An der so geschwächten Oberfläche können fluorhaltige Gase z.B. fluorhaltige Zersetzungsprodukts des Schwefelhexafluorids – SF₆ leichter die Oberfläche abtragen. Damit findet an der Oberfläche eine chemische Reaktion statt und die flüchtigen Reaktionsprodukte können abtransportiert werden (siehe Formel(2.2)).

$$Si_3N_4(s) + 3 SF_6(g) + Ar-Plasma \rightarrow 3 SiF_4(g) + 3 SF_2(g) + 2N_2(g) [10]$$
 (2.2)



Abbildung 2.9: Schematische Darstellung einer RIE-Anlage [5].



2.2. Impedanzspektroskopie

Dieser Abschnitt soll eine kurze allgemeine Einführung in die Impedanzspektroskopie und deren Anwendungen geben. Anschließend wird anhand der Impedanzspektroskopie am Beispiel biologischer Zellen das technische Grundprinzip, physikalische Phänomene und die Anforderungen an das System erläutert. Schlussendlich werden noch die für diese Arbeit entworfenen Elektroden, deren Geometrie und die daraus resultierenden Eigenschaften beschrieben.

2.2.1. allgemeine Impedanzspektroskopie

Das Verfahren der Impedanzspektroskopie hat sich geschichtlich aus einer Vielzahl einzelner wissenschaftlicher und technologischer Schritte entwickelt. Die beiden wichtigsten technologischen Entwicklungsschritte sind die Entwicklung des ersten elektrischen Potentiostats in den 1940er und die Entwicklung des ersten Frequenzganganalysators in den 1970er [11]. Mit diesen Entwicklungen war der Grundstein der heutigen Impedanzspektroskopie gelegt. Die ersten Anwendungen in diesem Gebiet, waren die Analyse von Wasserstoffelektroden und Sauerstoffelektroden. Sowohl die Wasserstoffelektrode als Referenzelektrode als auch die Sauerstoffelektrode (Clark-Elektrode) zur Sauerstoffkonzentrationsbestimmungen in Lösungen werden heute noch bei chemischen Fragestellungen verwendet [11].

Im Laufe der Zeit hat sich die heute gebräuchliche Bezeichnung "Electrochemical Impedance Spectroscopy" (EIS) für alle chemischen, physikalischen und biologische Fragestellungen, welche mit einer elektrischen Impedanzmessung beantwortet werden, entwickelt. In der heutigen Zeit lässt sich die EIS in die zwei großen Bereiche der nicht-biologischen und der biologischen Anwendungen unterteilen. Die nicht-biologischen Verwendung deckt dabei die Gebiete Korrosionsphänomene, Beschichtungen, elektrochemische Aktivität von Batterien, Brennstoffzellen-Performance und Charakterisierung von leitfähigen Polymeren ab. Im Bereich der biologischen Anwendungen kommen Biosensoren oder Biochips für DNA-Analysen, Antibody-Antigen-Interaktionen, Enzyme, tierisches und pflanzliches Gewebe sowie Bakterien und Mikroorganismen zum Einsatz [12], [13], [14].

Vor Allem für den biologischen Einsatz hat die Impedanzspektroskopie als "label-free" und "noninvasive"-Technologie hohe Akzeptanz erfahren. Das heißt, ein biologisches System kann von außen und ohne direkten Einfluss beobachtet werden. Die Beobachtung biologischer Systeme konnte meist nur rein qualitativ mit hohem zeitlich- und ressourcenintensiven Aufwand erfolgen. Die EIS's liefert eine quantitative Analyse auf elektrischem Weg ohne dabei auf z.B. zurückgreifen Fluoreszenzmarker oder invasive Methoden zu müssen. Mit der Impedanzspektroskopie wird ein System quantitativ analysiert um dies mit ähnlichen Systemen vergleichen zu können. Dazu kann das Gesamtsystem zum einen als elektrisches Ersatzschaltbild passiver Bauelemente (Widerstand, Kondensator, Spule) abgebildet oder als mathematisches Model (z.B. Finite Element Analysis) simuliert werden [14].



2.2.2. Impedanzspektroskopie einer Zellmonoschicht

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, entwickelte sich eine Vielzahl von EIS-Anwendungen. Eine spezielle und gut etablierte Anwendung, ist die elektrische Untersuchung einer Zellkultur. Die Ersten, die dies, mit Hilfe eines elektrischen Wechselfeldes, beschrieben und weiter entwickelten waren Ivar Giaever und Charles R Keese im Jahre 1984 [15], [16]. Sie waren es auch die für diese spezielle Art der Impedanzspektroskopie den Begriff "Electric Cell-Substrate Impedance Sensing" (ECIS) einführten.

Bei der ECIS wird an das biologische System, bestehend aus Zellkultur und Zellmedium, eine elektrische Wechselspannung $\underline{u} = \hat{U} \cdot \cos(\omega t + \varphi_u)$ kleiner Amplitude \hat{U} angelegt. Daraus resultiert ein elektrischer Wechselstrom $i = \hat{I} \cdot \cos(\omega t + \varphi_i)$. Als Ergebnis erhält man eine komplexe Impedanz $Z = Z(\omega) \cdot e^{j\varphi}$. Das Impedanzspektrometer liefert als Ausgangsgrößen die frequenzabhängige Impedanz Z(ω) und den frequenzabhängigen Phasenwinkel $\varphi(\omega) = \varphi_u - \varphi_i$ [14]. Abhängig von der Anwendung ist z.B. bei biologischen Zellen darauf zu achten, dass durch das Anlegen der Eingangsspannung keine Beschädigung der Zellmembran aufgrund zu großer Potentialunterschiede entsteht. Anfangs wurden die Messungen mit Gleichstrom durchgeführt. Erst durch die Einführung des elektrischen Wechselfeldes in die Impedanzspektroskopie von Zellen durch Giaever und Keese, konnte sowohl der ohmsche als auch der kapazitive Charakter des biologischen Systems analysiert werden. Demzufolge wird eine Frequenzanalyse in einem großen Frequenzbereich f = 1Hz - 1MHz durchgeführt [17]. In der frequenzabhängigen Impedanz Z(ω) befinden sich weitere frequenzabhängige Größen, in Form der komplexen Permittivität $\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega)$ und der komplexen Konduktivität $\gamma(\omega) = \gamma'(\omega) - j\gamma''(\omega)$. In der klassischen Elektrotechnik können diese beiden physikalischen Größen den passiven Bauelementen des elektrischen Widerstandes $R = \frac{l}{\gamma'(\omega) \cdot A}$ und der Kapazität $C = \frac{l}{\varepsilon'(\omega) \cdot A}$ zugeordnet werden. Mit diesen Bauelementen kann abhängig von der Komplexität des biologischen Systems ein elektrisches Ersatzschaltbild generiert werden. Als Beispiel sei hier das Ersatzschaltbild nach [14] in Abbildung 2.10 angeführt:



Das Constant Phase Element – CPE mit der Formel $CPE = \frac{1}{Y^0 j \omega^{\alpha}}$ ist die Darstellung der systemspezifischen Kapazität. Der Systemfaktor α liegt dabei zwischen 0 und 1. Im Falle α =1 stellt das Constant Phase Element eine ideale Kapazität dar [14], [18]. Das Ersatzschaltbild nach [14] aus Abbildung 2.10 bildet lediglich das Verhalten einer einzelnen Zelle im Medium ab. Da die Zellen der Monoschicht auch Zell-Zell Kontakte ausbilden, führen Erweiterungen zu einer Monoschicht mit Zellkontakten untereinander zu einem sehr komplexen System.

Theorie



Die bereits angesprochene komplexe Permittivität stellt in biologischen Systemen einen wesentlichen frequenzabhängigen Parameter dar. Diese frequenzabhängige Permittivität wird vor allem durch die Membraneigenschaften der Zelle, durch biologische Makromoleküle und durch die intra- und extrazellulären Komponenten bestimmt. Bereits 1957 hat H.P. Schwan dieses Phänomen beschrieben und in die drei charakteristischen Bereiche α -, β -, γ -Dispersion unterteilt (siehe Abbildung 2.11) [19].



Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der α-, β-, γ-Dispersion der relative Permittivität eines biologischen Systems [20].

α-Dispersion (Hz-kHz)

Die Permittivitätsänderung im niederfrequenten Bereich ist vor allem auf die Frequenzabhängigkeit der Ionenkanäle in und die Ionenwanderung an der Zellmembran zurückzuführen. Jedoch sind die physikalischen Phänomene als nicht gänzlich geklärt [19], [21].

β-Dispersion (50kHz-100MHz)

Das Auftreten der β-Dispersion ist vor allem auf das Vorhandensein einer Zellmembran zurückzuführen. Bei membranfreien biologischen Systemen ist diese Permittivitätsänderung nicht vorhanden. Diese Dispersion wird durch die Zellmembrankapazität, den Zellradius und den intrazellularen Widerstand bestimmt [19], [21].

γ-Dispersion (100MHz – 30GHz)

Im hohen Frequenzbereich tritt vor allem die Orientierungspolarisation einzelner polare Moleküle auf, welche dem angelegten elektrischen Feld folgen können. Dies sind in zellulärer Flüssigkeit weitestgehend Wassermoleküle aber auch Proteine. Die γ-Dispersion lässt Rückschlüsse auf den Wassergehalt einer biologischen Flüssigkeit zu [21], [22].



Betrachtet man aber das Gesamtsystem bestehend aus Zellmonoschicht und Medium mit Hilfe der ECIS, kann man gut interpretierbare Rückschlüsse auf Gewebeschichten oder sogar ganze Organe erhalten. Zu den wichtigsten Informationen zählen hier das Zellwachstum und deren morphologische Veränderungen aufgrund geänderter Zellzahl und Zelldichte, sowie Veränderungen durch äußere Einflüsse. Im Laufe einer Impedanzmessung ist meist nach kurzer Zeit ein Impedanzanstieg, aufgrund der Anhaftung der Zellen auf der Elektrodenoberfläche, feststellbar. Jeder weitere Anstieg der Impedanz lässt sich auf die Ausbildung der Tight Junction (siehe Abschnitt 2.3.4) zwischen den Zellen und einen dadurch begrenzten Stromfluss zwischen den Zellen erklären [23]. Da die ECIS meist über viele Stunden oder Tage verläuft, entstehen Impedanzänderungen des Gesamtsystems, welche auf die Zelldynamik zurückzuführen sind. Dieses diagnostische Tool wurde bereits zur Zellausbreitung, Zelladhäsion, Proliferation, Zellwanderung aber auch zur Zytotoxizität durch Medikamente, elektrochemische Vorgänge im Gewebe und umweltbedingte physiologische Änderungen herangezogen [24].



2.2.3. Elektrodengeometrie und Elektrodeneigenschaften

Generell können die Elektroden bei der Impedanzspektroskopie transepithelial als auch basolateral ausgeführt sein. Bei der transepithelialen Impedanzmessung wird auf der Oberseite und auf der Unterseite des biologischen Systems mindestens je eine Elektrode angebracht. Demzufolge wird das gesamte biologische System analysiert. Im Falle einer lokaleren Untersuchung, z.B. Zellen die nur auf einer Seite wachsen, werden basolaterale Impedanzmessungen vorgezogen. Die basolaterale Impedanzmessung am Beispiel der IDES und dessen Elektrodengeometrie soll im Folgenden untersucht werden.



Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Geometrieabhängigkeit der elektrischen Feldverteilung [13].

Für den Spezialfall der basolateralen IDES ist die Eindringtiefe des elektrischen Feldes in das biologische System und damit in die Zellmonoschicht abhängig von der verwendeten Elektrodengeometrie. In Abbildung 2.12 erkennt man, dass sich 80% des elektrischen Feldes in einer Tiefe von etwa $\frac{L}{2}$ ausbreitet. Wobei $L = W_{sp} + W_{el}$ die Summe aus Elektrodenabstand W_{sp} und Elektrodenbreite W_{el} bedeutet [25]. Bei einer angenommenen kugelförmigen Zellgröße von 20µm und einer Elektrodenbreite sowie einem Elektrodenabstand von je 20µm würden 80% des elektrischen Feldes genau in die Zellmonoschicht vordringen können. Damit erfolgt der Großteil des Stromflusses transzellulär und parazellulär durch die Zellmonoschicht und das Zellmedium, welches zur Versorgung der Zellen dient. Das Zellmedium hat dadurch keinen großen Einfluss auf das Messergebnis. So ist sichergestellt, dass die Physiologie und Morphologie der Zellen und nur im geringen Ausmaß das verstoffwechselte Medium messungsrelevant, sind. Mit diesem Wissen ist, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, vor der Impedanzspektroskopie die Elektrodengeometrie auf das zu beobachtende biologische System individuell abzustimmen.



2.3. biologischer Aufbau und Verhalten der Zelle

In der vorliegenden Arbeit wird für die Impedanzspektroskopie humanes Epithelgewebe als biologisches Untersuchungsobjekt verwendet. Um allgemeine Kenntnis über den Aufbau und Funktion einzelner Zellen, sowie deren Verbindung untereinander verstehen zu können, soll in diesem Abschnitt zunächst auf den biologischen Zellaufbau näher eingegangen werden. Dabei werden die, für die Impedanzspektroskopie, wichtigsten Bestandteile der Zelle herausgegriffen und detailliert erklärt. Im Weiteren sind die Epithelzelle und deren erweiterten Aufgaben und Funktionen als der Zelltyp der Wahl zu verstehen. Mit dieser Anforderung werden die Epithelzelle im Allgemeinen und der verwendete CaCo2-Zelltyp im speziellen besprochen. Der letzte Teilabschnitt soll den Einfluss und die Auswirkungen verschiedener Zusätze auf die Epithelzelle unterstreichen.

2.3.1. biologischer Zellaufbau

Die Zelle ist die kleinste Funktionseinheit der eukaryotischen Lebensformen und ist der Grundbaustein dieser Organismen. In einem Organismus ist als eine der grundlegendsten Funktionen dieser Zellen der Metabolismus untereinander zu nennen. Zu dieser großen Gruppe an Lebensformen zählen auch die Säugetiere und damit der Mensch. In Abbildung 2.13 ist eine menschliche Zelle und deren näherer Aufbau, im Zellverbund angedeutet, dargestellt. Zu den wichtigsten Bestandteilen dieser Zellen zählen unter anderem die Zellmembran, der Zellkern (Nucleus) und das Zytoplasma. Als Zytoplasma versteht man eine Zusammenfassung unerlässliche Bestandteile bestehend aus den Zellorganellen, dem Zytosol (intrazelluläre Flüssigkeit) und dem Zytoskelett [26].



Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Zellaufbaus einer Epithelzelle und deren Bestandteile [1].



Die Zellorganellen erfüllen innerhalb der Zelle wichtige eigenständige Funktionen. Wichtige Zellorganellen sind der Golgi-Apparat, welcher Ausscheidefunktionen aufweist, und die Mitochondrien, die als Kraftwerk der Zelle zu bezeichnen sind. Mitochondrien bilden das Adenosintriphosphat (ATP), welches als Energieträger fungiert und zu den nötigen Bereichen innerhalb der Zelle transportiert werden kann. Weiters zählen zu den Organellen das Endoplasmatische Retikulum, die Ribosomen und die Lysosomen. Der Nucleus ist die größte Struktur einer Zelle und beinhaltet den Chromosomensatz, die Erbinformation.

Aus elektrischer Sicht und damit auch entscheidend für die Impedanzspektroskopie ist nicht der funktionelle Ablauf der einzelnen Bestandteile im Zytoplasma. Vielmehr kann das Zytoplasma für elektrische Messungen vereinfacht als wässrige Salzlösung und weiter vereinfacht für eine grobe Abschätzung damit als rein ohmscher Widerstand, mit einer Konduktivität von $\gamma = 0.5 - 10 \frac{s}{m}$, angesehen werden [27], [28]. Ein weiterer wichtiger Bestandteil für das elektrische Verständnis einer Zelle ist die Zellmembran und soll aus diesem Grund näher betrachtet werden.

Zellmembran

Die Zellmembran dient der Zelle als mechanischer Schutz und als Abgrenzung zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Raum. Dabei ist die Membran kein starres Konstrukt, sondern besteht aus speziellen Phospholipiden und eigenständigen Transmembranmechanismen wie z.B. Ionenkanäle, welche als Proteine ausgeführt sind (Abbildung 2.14). Diese Komponenten bilden ein Gerüst starker Fluidität [21]. Die Phospholipide der Zellmembran besitzen einen hydrophilen Kopfteil und zwei 2nm lange hydrophobe Kohlenwasserstoffketten, bezeichnet als Schwanzteile. Durch eine doppelreihige Anordnung dieser Lipide entsteht die spezielle, etwa 8nm dicke Zellmembran, bezeichnet als Lipiddoppelschicht [21]. Die Anordnung ist für viele Transportvorgänge durch die Membran entscheidend. Die polaren Lipidköpfe der Lipiddoppelschicht sind nach außen gerichtet und können dadurch sowohl mit der intrazellulären als auch mit der extrazellulären Flüssigkeit interagieren. Die nicht polaren, lipophilen Schwanzteile sind nach innen gerichtet und bilden eine natürliche Barriere für hydrophile Moleküle.



Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Lipiddoppelschicht mit spezifischen Membranproteinen [1].



Um dennoch einen Stofftransport durch die Zellmembran gewährleisten zu können, ist diese mit verschiedenen Transmembranproteinen ausgestattet. Spezielle Transmembranproteine sind Ionenkanäle. Diese besitzen sehr vielfältige Mechanismen, um einen selektiven Stoffaustausch zwischen dem intra- und extrazellulären Bereich gewährleisten zu können. Für elektrische Messungen sind vor allem die Na⁺-, K⁺-, Cl⁻- und Ca²⁺-Ionen relevant, die in unterschiedlicher Konzentrationen beteiligt sind (siehe Tabelle 2.1). Generell existiert ein Konzentrationsunterschied zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Raum. Dieser Gradient wird über einen passiven, nach außen gerichteten, Transport, der Diffusion, durch K⁺-Kanäle herabgesetzt. Die K⁺-Kanäle haben des Weiteren die wichtigen Aufgaben der osmotische Regulierung des Zellvolumens, die Regulierung des intrazellularen pH-Wertes und die Aufrechterhaltung der Membranruhespannung U_M [29]. Der Konzentrationangleichung der intra- und extrazellulären Bereich wirkt ein schwacher, nach innen gerichtete, Na⁺-Fluss über geeignete Na⁺-Kanäle entgegen. Dadurch stellt sich eine experimentell ermittelte und über die Goldmann-Gleichung (siehe Formel (2.3)) berechenbare statische Membranruhespannung $U_M = \varphi_i - \varphi_e = -70 mV$ ein. Die Goldmann-Gleichung ist eine auf mehrere Konzentrationen erweiterte Nernst-Gleichung. Die Nernst-Gleichung spiegelt den Potentialgradienten zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum wieder [21].

Goldmann-Gleichung:

$$U_{M} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{g_{K} \cdot [K^{+}]_{e} + g_{Na} \cdot [Na^{+}]_{e} + g_{Cl} \cdot [Cl^{-}]_{i}}{g_{K} \cdot [K^{+}]_{i} + g_{Na} \cdot [Na^{+}]_{i} + g_{Cl} \cdot [Cl^{-}]_{e}}$$
(2.3)

$$R \dots \text{ Gaskonstante}$$

$$F \dots \text{ Faraday-Konstante}$$

$$T \dots \text{ Temperatur}$$

 $g_{K}, g_{Na}, g_{Cl} \dots$ Permeabilität [K⁺], [Na⁺], [Cl⁻] ... Ionenkonzentration

R

Beispiele zu Ionen-Konzentrationen an zellulären Membranen in mMol/I (M Muskel, N Motoneuron, TA Tintenfisch-Axon). Die diversen Literatur- stellen entnommenen Werte verstehen sich als punktuelle Resultate konkreter La- bortests. Die tatsächlich auftretenden Konzentrationen zeigen starke Streuungen											
	extrazelluläre Konzentration			intrazelluläre Konzentration			Konzentr. Verhältnis	Diffus. richtung			
	М	N	TA	М	Ν	TA	für M				
[Na+]	120	150	460	9	15	50	13:1	\Rightarrow			
[K+]	2,5	5,5	10	140	150	400	1:56	\rightleftharpoons			
[Cl ⁻]	120	125	540	4	9	50	30:1	\Rightarrow			
[Ca ²⁺]	1			0,001			1000 : 1	\Rightarrow			

Tabelle 2.1: Ionen-Konzentrationen der zellulären Membran [21]

Die konstante Membranruhespannung spiegelt jedoch nicht die tatsächlichen Transportvorgänge wieder. Um einen Konzentrationsgradienten aufrecht zu halten, ist dem passiven Ionentransport ein aktiver Ionentransport, als aktive Ionenpumpe bezeichnet, gegenübergestellt. Die Ionenpumpe vollführt, unter Verbrauch von ATP, einen aktiven Na⁺/K⁺-spezifischen Transport entgegen der passiven Diffusion und erzeugt ein stationäres Fließgleichgewicht [21], [26]. Neben diesem aktiv gesteuerten Mechanismus gibt es in der Zellmembran noch zahlreiche andere passiv und aktiv ablaufende Vorgänge. Hierzu zählen unter anderem die für Kälte, Hitze, Menthol und Capsaicin sensitiven Rezeptor-gesteuerten Ca²⁺-Kanäle, die volumsregulierenden Cl⁻-Kanäle und die Ca²⁺ aktivierbaren K^* -Kanäle (für eine genauere Betrachtung der Ionenkanäle sei an dieser Stelle an [21], [29] verwiesen).



2.3.2. Die Epithelzelle

Der allgemeine Aufbau und die Funktion einer Zelle wurde bereits in Anschnitt 2.3.1 vorgestellt. Die Epithelzelle weißt spezielle, von ihren Vorkommen und Aufbau abhängige, Funktionen auf. Grundsätzlich findet eine Differenzierung für das Oberflächenepithel, das Drüsenepithel und das Sinnesepithel statt. Das Sinnesepithel erfüllt die Funktion der Reizaufnahme z.B. in Form der Netzhaut im Auge oder als Mechanorezeptoren (Merkel-Zellen) auf der Hautoberfläche verteilt. Das Drüsenepithel ermöglicht in Form der exokrinen und endokrinen Drüsen eine Sekretion flüssiger Stoffgemische oder Hormone an ihre Umgebung. Dabei kann das Drüsenepithel zum einen lokal im Darmbereich oder als ganzes epitheliales Organ beispielsweise als Schweißdrüse, Bauchspeicheldrüse (Pankreas) oder Schilddrüse ausgebildet sein.

Die dritte Art des Epithels, das Oberflächenepithels, ist der in diese Arbeit verwendete Epitheltyp und bedarf daher eingehender Betrachtung. Da das Oberflächenepithel als eine große Ansammlung einzelner verbundener Epithelzellen vorkommt, spricht man in diesem Zusammenhang von Epithelgewebe. Abhängig von der Geometrie der einzelnen Zelle und deren Anordnung wird das Epithelgewebe in eigene Formen unterteilt (siehe Abbildung 2.15). Das Oberflächenepithel kleidet sowohl innen als auch außen alle Organe des menschlichen Körpers aus. Damit bietet z.B. die Haut, als größtes Organ, eine Schutzfunktion gegen äußere Einflüsse, wie UV-Strahlung oder mechanische Beanspruchung. Im Bereich des Verdauungstraktes, speziell im Dünndarm (Intestinum tenue), erfüllt das Oberflächenepithel vor allem eine resorbierende Funktion der Nährstoffe aus der aufgenommenen Nahrung.

Lungenbläschen, Mehrschichtiges Umschlagfalten **Einschichtiges** Brust-, Bauchfell, hochprismatisches der Konjunktiva, Plattenepithel Endothel Epithel (selten) Nasenvorhof **Einschichtiges** Harnblase, isoprismatisches Drüsenausfüh-Mehrschichtiges Harnleiter, Epithel rungsgänge Übergangsepithel Nierenbecken Ohne Flimmer-Einschichtiges härchen: Gallen-Mundhöhle. hochprismatisches blase, Darmkanal; Mehrschichtiges Speiseröhre. Epithel, links mit Flimmerhärunverhorntes Vaginalschleim-Flimmerepithel chen: Atemwege Plattenepithel haut Mehrreihiges hochprismatisches Mit Flimmer-Mehrschichtiges Epithel, links härchen: Nasenverhorntes 00000 Flimmerepithel schleimhaut Plattenepithel

Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der vorhandenen Epithelformen und deren Vorkommen [1].

Äußere Haut

Theorie



Das Oberflächenepithel des Dünndarms hat die Form eines einschichtigen hochprismatischen Epithels. Die einzelnen Zellen stehen dabei in engen Kontakt und verfügen daher nur über wenig Interzellularsubstanz. Für die resorbierende Funktion des Oberflächenepithels stellen neben den Zellen selbst, die Kontakte zwischen den Zellen, welche einen flächenhaften Zellverbund bilden, einen wichtigen Transportweg dar. Diese Zell-Zell-Kontakte beinhalten unter anderem Tight Junctions, Adherens Junctions und Desmosome und werden in Abschnitt 2.3.4 näher beschrieben [1], [30]. Um die resorbierbare Oberfläche des Dünndarms zu vergrößern befinden sich Ausstülpungen, so genannte Zotten, auf der Dünndarminnenseite (Abbildung 2.16). Die Zotten sind zusätzlich mit einer Vielzahl an stäbchenartigen Zytoplasmafortsätzen, den Mikrovillis, welche eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung bieten, versehen (Abbildung 2.17).





Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Vergrößerung der Resorptionsfläche des Dünndarms [11]

Abbildung 2.17: (a) Zotten des Duodenum; (b) Mikrovilli des Duodenum [12]

2.3.3. Human Colon Adenocarcinoma - CaCo2

Im Zuge dieser Arbeit werden für die Langzeitmessungen enterozytische Dickdarmkrebszellen vom Typ CaCo2 verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einem menschlichen Adenokarzinom gewonnen. Durch ihre Eigenschaft der spontanen enterozytischen Differentiation weisen sie alle Eigenschaften artverwandter Dünndarmzellen auf. Da die Enterozyten des Dünndarms essentielle Bedeutung für die Nährstoffaufnahme besitzen, kann diese Zellkultur für viele Studien im Bereich der mechanischen Belastung, Versorgung und Arzneimittelaufnahme dienen. Diese Zelllinie bildet in-vitro an den Zell-Zellkontakten sehr gut ausgeprägte Tight Junctions. Durch diese Tight Junctions entsteht eine Permeabilitätscharakteristik, die der in-vivo vorkommenden Charakteristik der Intestinal Mukosa (Darmschleimhaut) sehr gut angenähert ist [31], [32], [33].

Die Vergleichbarkeit von CaCo2-Zelllinien in unterschiedlichen Labors ist schwierig. Abhängig von dem vorhanden Selektionsdruck, Passagennummer, Kulturzeit, extrazellulären Versorgung und dem Zellkulturmedium kann sich die Permeabilität und das Wachstumsverhalten beträchtlich unterscheiden [4].



2.3.4. Kommunikation und Kontaktierung von Zellverbänden

Wie bereits in den vorangegangen Abschnitten angedeutet, sind einzelne Zellen zu einem Zellverbund über verschiedene Zellkontakte miteinander verbunden. Die einzelnen Zellkontakte, dazu zählen Tight Junctions, Adherens Junctions, Desmosome, erfüllen unterschiedliche Funktionen und sollen in diesem Abschnitt besprochen werden (Abbildung 2.16).

Das Epithelgewebe des Dünndarms erfüllt die wichtige Aufgabe der Nährstoffresorption. Diese Resorption kann im Wesentlichen über den passiven oder aktiven transzellularen Weg über die Zelle oder durch den parazellularen Weg zwischen den einzelnen Zellen entstehen. Der passive transzellulare Weg ist, bedingt durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran, nur für lipophile Moleküle geeignet. Der parazellulare Transport kann nur selektiv für hydrophile Moleküle genutzt werden [4], [33]. Diese Unterteilung stellt eine wichtige Separationsfunktion des Körpers für, über die Nahrung aufgenommene toxisch Substanzen dar [30]. Diese Eigenschaft stellt jedoch für die Pharmaindustrie eine zum Teil unüberwindbare Barriere dar. Viele therapeutisch oral verabreichte Arzneimittel sind von hydrophiler Natur und können vorallem die Tight Junctions der Zellkontakte nicht überwinden. Damit ergibt sich die Möglichkeit der intravenösen Verabreichung des Stoffes oder die Umwandlung des hydrophilen Stoffes in ein lipophiles Arzneimittel. Eine sehr elegante Alternative ist das kontrollierte und reversible erweitern der Zellkontakte (z.B. Tight Junction) über so genannte Permeation Enhancers (siehe Abschnitt 2.3.5) [33].



Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Tight Junction und der Adherens Junction eines Epithelgewebes [19].



Im Folgenden sollen die zwei wesentlichen Typen von Zellkontakten genauer betrachtet werden, die Tight Junction und die Adherens Junction.

a) Tight Junction (zonula occludens)

Die Tight Junction bei einem Plattenepithel erstellt eine verschließende Verbindung an der apikal zugewandten Membranseite zwischen den einzelnen Zellen. Aufgrund der ionenundurchlässigen Zellkontakte ist der hochohmige Zellkontakt auch die primäre Barriere für den Transport hydrophiler Stoffe. Die Eigenschaften der Ionenundurchlässigkeit und die damit verbundenen hochohmigen Zellkontakte werden von den Transmembranproteinen Occludin, Claudin 1, Claudin 2 und JAM (junction adhesion molecules) erfüllt [30], [34]. Des Weiteren liegt eine elektrische Polarität zwischen der apikalen Seite und der basolateralen Seite der Zelle durch die kontinuierliche Tight Junction-Verbindung des gesamten Zellverbundes vor [35].

Damit die größenabhängige und ladungssensitive Eigenschaft der Tight Junction für den parazellularen Transport beeinflusst werden kann, können Permeation Enhancer (siehe Abschnitt 2.3.5) eingesetzt werden.

b) Adherens Junction

Die Adherens Junction stellt die primäre, mehrfach ausgeführte, mechanische Verbindung zwischen den einzelnen Zellen dar. Je nach Typ behindern sie im Vergleich zu der Tight Junction den parazellularen Transport einzelner Moleküle deutlich weniger bis gar nicht. Das wichtigste Transmembranprotein ist für diese Verbindung das E-Cadherin. Die Lokalisation beschränkt sich auf die basolateralen Seite. Für die Impedanzspektroskopie spielt dieser Zell-Zellkontakt eine untergeordnete Rolle, da vorallem die Tight Junction eine Molekülbarriere darstellt und damit die Impedanz wesentlich stärker beeinflusst [19], [34], [36].

2.3.5. Permeation Enhancer

Um den parazellularen Transportweg für oral verabreichte hydrophile Arzneimittel beeinflussen zu können, werden so genannte Permeation Enhancer eingesetzt. Permeation Enhancer wirken vorallem auf die Tight Junctions eines Zellverbundes z.B. im gastrointestinalen Trakt. Dabei werden eine Vielzahl in ihrer Wirkung unterschiedliche Permeation Enhancer eingesetzt. Hierzu zählen unter anderem die proteolytischen Enzyme, high-molecular-mass Polymere und Thiomere. Da die proteolytischen Enzyme zum Teil bereits gut erforscht sind, wurde für die vorliegende Arbeit der Permeation Enhancer Bromelain ausgewählt. Weitere bekannte Enzyme aus dieser Gruppe sind Trypsin und Papain [37], [38]. Durch Einwirkung dieser proteolytischen Enzyme, auf eine Zellschicht, kommt es zu einer Auflösung der interzellularen Verbindungen [39]. Bei richtiger Konzentration und Einwirkzeit werden die Zell-Zellkontakte gelockert und verlieren dadurch die Barriereeigenschaft für hydrophile Moleküle. Somit kann ein parazellularer Transport stattfinden. Dieser Vorgang ist unter geeigneten Bedingungen ein reversibler Prozess. Das bedeutet durch ein anschließendes Fernbleiben des auf die Zellkontakte wirkenden Permeation Enhancers können sich die Tight Junctions wieder regenerieren. Bei zu hoher Konzentration oder zu langer Einwirkzeit wird jedoch die Zellschicht nachhaltig geschädigt.


2.4. Mikrofluidik

In diesem Abschnitt soll die Mikrofluidik als Gesamtsystem und Miniaturisierungstool vorgestellt werden. Dabei wird die grundsätzliche Idee, deren Vor- und Nachteile und die physikalischen Gegebenheiten zur Sprache gebracht. In Folge werden einige Anwendungen kurz vorgestellt, um schlussendlich der zellbiologischen Analyse die größte Aufmerksamkeit zu schenken. Im letzten Teil dieses Abschnittes ist dem Werkstoff Polydimethylsiloxan (PDMS) als besonders interessantes Material für die Mikrofluidik ein eigener Bereich gewidmet.

2.4.1. Der mikrofluidische Grundgedanke

Die ursprüngliche Idee der Mikrofluidik ist in der analytischen Chemie und der Mikrobiologie zu suchen. In diesen Bereichen erfolgen Analysen mit zum Teil sehr geringen Probenvolumina und Reagenzien. Dadurch stellt die Nachweisgrenze für herkömmliche Analysemethoden eine deterministische Barriere dar. Zu den ersten mikrofluidischen Anwendungen sind aufgrund des die Gasphasenchromatographie (GPC), high-pressure liquid geringen Probenvolumens chromatography (HPLC) und die Kapillarelektrophorese (CE) zu nennen [40]. Hierfür werden als Anforderungen an das mikrofluidisches System die richtige Einbringung der Reagenzien und Proben, meist in flüssiger Form, und die Weiterleitung, Durchmischung und Separation der Flüssigkeiten gestellt [40]. In der heutigen Zeit hat sich die Mikrofluidik zu einem interdisziplinären Forschungsgebiet der Biochemie, Physik, Elektrotechnik und Mikro-, Nanoelektronik weiterentwickelt. Die Anwendungsgebiete lassen sich dabei grob in die Bereiche molekularer Analyse, Molekular- und Zellbiologie und Mikroelektronik unterteilen [41]. Im Zuge dieser Entwicklungen haben sich die beiden Begriffe "lab-on-a-chip" (LOC) und "micro-total-analysissystem" (µTAS) als Synonym für eine mikrofluidisches Analysesystem herauskristallisiert [42], [43]. Dabei ist eine vollständige Analyse auf einen "Chip" ohne weitere Verfahren oder Arbeitsschritte vorgesehen. Aus diesen groben Richtlinien haben sich weitere Anforderungen ergeben. Das System soll demzufolge tragbar und einfach in ihrer Anwendung konstruiert sein, sowie hohe Sensitivität, Spezifität und kurze Reaktionszeiten aufweisen. Weitere, für kommerzielle Anwendungen, wichtige Voraussetzungen sind geringe Kosten für eine Analyse, hohe Zuverlässigkeit und der Wegfall von teuren und schwer einsetzbaren Laboreinrichtungen [44], [45]. Für spezielle Anwendungen der medizinischen Diagnostik ergeben sich zusätzliche Anforderungen, welche die geringe Kontamination in Form von wegwerfbaren Produkten und so genannte "point-of-care" (POC) Anwendungen, also eine schnelle Diagnose am Patienten, betreffen [46].

Der große Vorteil der Mikrofluidik ist, durch die Miniaturisierung aller Komponenten gegeben. Die Miniaturisierung hat aber nicht nur Größenvorteile gegenüber herkömmlichen Labor- und klinischen Einrichtungen, sondern auch Vorteile aufgrund der geringen Reagenzien und Probenmengen, die notwendig sind. Des Weiteren ist durch das geringe Volumen ein schneller Wärmetransport, Massentransport und eine hohe Parallelisierung möglich [44], [47].

Theorie



2.4.2. Physik der Mikrofluidik

Die physikalischen Gesetzmäßigkeiten der makroskopischen Welt behalten auch in mikroskopischen Systemen ihre Gültigkeit. Jedoch sind die Effekte der Strömung, Diffusion, Strömungswiderstand, Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und die Oberflächenspannung in diesen beiden Welten unterschiedlich stark ausgeprägt.

Strömung

Die Art der Strömung einer Flüssigkeit lässt sich anhand ihres Flussprofils ablesen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem turbulenten und dem laminaren Fluss. Der turbulente Fluss und damit die Mischung verschiedener Flüssigkeiten, welcher vorwiegend in makroskopischen Größenordnungen vorkommt, ist chaotisch und zeitlich sowie räumlich nicht vorhersagbar. Der laminare Fluss beschreibt ein inhomogenes Flussprofil, bei dem sich verschiedene Flüssigkeitsschichten in z.B. einem Mikrokanal nicht mischen. Dieser laminare Fluss ist ein Hauptmerkmal der meisten Mikrofluidiksysteme und wird durch die so genannte Reynoldszahl (siehe Formel (2.4)) beschrieben.

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\mu}$$
(2.4)
$$\rho \dots \text{ Dichte}$$

$$v \dots \text{ charakteristische Geschwindigkeit}$$

$$\mu \dots \text{ Viskosität}$$

$$D_h \dots \text{ hydraulischer Durchmesser}$$

Die Reynoldszahl ist eine dimensionslose Größe und gibt an ob das Flüssigkeitsprofil turbulent oder laminar ist. Bei einer Reynoldszahl kleiner als 2300 handelt es sich um einen laminaren Fluss. Dies ist oftmals aufgrund des geringen hydraulischen Durchmessers der meisten mikrofluidischen Anwendungen gegeben [48], [49].

Diffusion

Aufgrund des laminaren Flusses ist die Diffusion eine passive ablaufende Eigenschaft eines mikrofluidischen Systems, um Flüssigkeiten zu durchmischen. Daneben kann die Diffusion durch mikrofluidisch konstruierte Mixer schneller ablaufen, als in einfachen Mikrofluidikkanälen. Dabei ist die Diffusion ein zeit- als auch längenabhängiger Vorgang. Das bedeutet zum einen, dass der laminare Fluss als Separationsinstrument benutzt werden kann. Zum anderen ist es jedoch sehr schwierig Flüssigkeit ausschließlich über Diffusionseigenschaften zu mischen [47].

Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis

Das "surface area to volume ratio" (SAV) ist das Verhältnis zwischen der Kanaloberfläche und dem Volumen im Kanal. Im Vergleich zu makroskopischen Größenordnungen vergrößert sich das SAV um den Faktor 500-1000 und in extremen Fällen sogar mehr als 10000. Dies kann einerseits sehr vorteilhaft bei einer on-chip Chromatographie oder bei sehr schnellen Aufheizraten ausgenützt werden. Andererseits können so Analyten leicht an der Oberfläche adsorbiert werden [48].



2.4.3. Mikrofluidische Anwendungen

Durch die Miniaturisierung ist es möglich geworden, ein für in-vitro Experimente mikrofluidisches Gesamtsystem bestehend aus der Probeneinbringung, Probenaufbereitung und Datenanalyse zu entwickeln.

Die Probeneinbringung erfolgt zu meist in flüssiger Form. Bei der weit verbreiteten PDMSbasierenden Mikrofluidik erfolgt die Probeneinbringung und Probenweiterleitung oftmals druckgesteuert in Form von externen mechanischen Spritzen- oder Peristaltikpumpen. Die Weiterleitung mittels Druck wird auch für die hydrodynamische Fokussierung verwendet, bei dem ein orthogonal zum Analysestrom stehender zweiter Flüssigkeitsstrom diesen in seiner Breite begrenzt und damit fokussiert. Dies wird z.B. bei der Durchflusszytometrie verwendet, um aus einem breiten Suspensionsstrom einen "single-cell-Strom" zu erzeugen, welcher anschließend sortiert und analysiert werden kann [44].

Wenn die flüssige Probe eine ionische Lösung ist, dann kann der elektroosmotische Fluss (EOF) durch anlegen einer Gleichspannung an einen Mikrokanal als Weiterleitung verwendet werden. Ein großer Vorteil ist das entstehende rechteckige Strömungsprofil beim EOF, welches für eine sehr hohe räumliche Auflösung sorgt. Damit ergeben sich sehr genau Separationsmöglichkeiten für z.B. eine DNA-Analyse in einem Mikrofluidiksystem [40].

Des Weiteren können auch ganze Systeme basierend auf der Zentrifugalkraft aufgebaut sein. Hier wird über die Kanalgeometrie die Oberflächenbehandlung und die Zentrifugalkraft die gesamte Flüssigkeitsverteilung gesteuert. Diese Systeme sind meist in Form einer Compact-Disc (CD) aufgebaut. Die Steuerung erfolgt ausschließlich über den globalen Parameter der Rotationsgeschwindigkeit. Mittels so gesteuerter Systeme kann auf einfache Weise eine hohe Parallelisierung von z.B. Immunoassays erzeugt werden [41].

Mikrofluidische Anwendungen findet man in vielen verschiedenen Forschungsgebieten. Dazu zählen unter anderem die Pharmazie für DNA-Analysen und Immunoassays, Tissue Engineering für Organsimulationen, Zell- und Neurobiologie für cell-based Assays und die chemische Synthese. Die Zellbiologie in Verbindung mit PDMS-Mikrofluidiksystemen stellt ein breites Anwendungsgebiet dar und soll daher näher beschrieben werden. Ein Beispiel ist die Miniaturisierung der Zellkultur, um eine hohe Kontrolle auf die Mikro-Umgebung, schnelle Optimierungen und eine geringe Zellzahl erreichen zu können. Mit einer geringen Zellzahl können auch einfache magnetische, optische, mechanische und elektrische Manipulationen direkt an der Zellkultur oder an einzelnen Zellen durchgeführt werden. Hierzu zählen mitunter das magnetische und mechanische Sortieren von Zellen aufgrund der Zellbeweglichkeit, Zellgröße und Deformierbarkeit. Aber auch das dielektrophoretische Cell-Trapping ist hier zu erwähnen, um anschließend die gefangenen Einzelzellen elektrisch selektiv untersuchen zu können. Eine weitere wichtige Anwendung ist die Zelllyse, bei der die Zelle durch eine thermische, mechanische chemische oder elektrische Beschädigung der Zellmembran in ihre Einzelteile aufgelöst wird. Hiermit kann z. B. eine simulierte Apoptose durchgeführt und analysiert werden. Die Zelllyse dient aber auch dazu, um Zugang zu bestimmten Proteinen oder der DNA zu erhalten [40], [42], [46], [50].

Somit kann abschließend die Mikrofluidik als Tool für die Zellbiologie zur Untersuchung des Wachstums, Selektion und Separation, Zelllyse und physiologische Parameter herangezogen werden.



2.4.4. Polydimethylsiloxan – PDMS

Polydimethylsiloxan, kurz PDMS, gehört zur Gruppe der Silikonpolymere. Es besitzt die chemische Summenformel $(H_3C)_3SiO[Si(CH_3)_2O]_nSi(CH_3)_3$ und hat damit eine flexible Si-O Hauptkette aus wiederkehrenden -Si(CH₃)₂-O-Einheiten. Die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten bestimmt das Molekulargewicht und auch die Viskositität des PDMS [51], [52]. PDMS ist ein reversibel deformierbares Silikonpolymer mit vielen hervorragenden Eigenschaften wie der Biokompatibilität, nicht vorhandenen Toxizität und optischen Transparenz. Es kann sich an glatte, nicht planare sehr feine Strukturen anpassen und härtet schon bei niedrigen Temperaturen aus [52]. Damit kommt PDMS in den unterschiedlichsten Bereichen der Medizin aber auch in der Chemie und Technik für z.B. Immunoassays, Cell-based Assays, Mikrofluidik und der Zellkultivierung, wie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Jedoch muss das hydrophobe Verhalten beachtet und gegebenenfalls durch zusätzliche Oberflächenbehandlung beseitigt werden.

PDMS wird vielfältig, bedingt durch sein chemisch inertes Verhalten, in medizinischen Bereichen der Versorgung in Form von Kathetern, Drainageschläuche und zur Isolation für Herzschrittmacher eingesetzt. Aber es kommt auch in der plastischen Chirurgie als Ohr- und Nasenimplantat zu Einsatz [53]. Dies hat zur Folge, dass auch aus PDMS hergestellte technische Geräte, wie z.B. drug delivery systems ohne größere Komplikationen in-vivo implantierbar sind [52]. Für technische Anwendungen sind weiters die Eigenschaften der thermischen Stabilität und optischen Transparenz bis zu einen Wellenlängenbreich von λ =300nm von entscheidender Bedeutung [53]. Die thermische Langzeitstabilität in einem Temperaturbereich von ϑ =-45°C – 200°C ist für viele Herstellungs- und Verfahrensschritte, sei es Sterilisationsverfahren oder Oberflächenbehandlung, unumgänglich [53], [54]. Die optische Transparenz kann bei "Lab on a Chip" (LOC), "Microelektromechanical Systems" (MEMS) und Mikrofluidiksystemen als sekundäres Hilfsmittel zur optischen Begutachtung und Diagnose dienen [51].

In den meisten Anwendungsfällen hat PDMS den unerwünschten Effekt, dass es für Gase Permeabilität zeigt. Das heißt Gase wie z.B. Luft, welche in einem Mikrofluidiksystem eingeschleust wurden, können langsam aus dem System entweichen. Im Gegenzug können unerwünschte Gase in ein System eindringen, Gasblasen bilden und hier negativen Einfluss auf Konzentrationen oder Messergebnisse bewirken [55].

Neben den vielen Einsatzmöglichkeiten konnte die Mikrofluidik durch den Einsatz von PDMS revolutioniert werden. PDMS ist als Werkstoff leicht strukturierbar, kostengünstig in der Anschaffung und ist somit für die Massenproduktion geeignet. Einen großen Nachteil für Mikrofluidik-Anwendungen stellt hier jedoch die hohe Hydrophobität dar [51], [55]. In der Mikrofluidik werden kleine Strukturen im submikrometer-Bereich hergestellt, welche als Kanäle, Pumpen, Ventile, Mixer, etc. dienen [56]. Durch die starke Hydrophobität können wässrige Lösungen die PDMS-Oberfläche nicht benetzten und Mikrofluidiksysteme werden in ihrer Funktionalität stark eingeschränkt. Diese Eigenschaft bedarf in vielen Fällen einer nachträglichen Oberflächen an der PDMS-Oberfläche polare Gruppen, so genannte Silanole, welche an der behandelten Oberfläche eine reversible Hydrophilität erzeugen. Diese Hydrophilität kann nur aufrechterhalten werden, indem nach der Sauerstoffplasmabehandlung die PDMS-Oberfläche



schnellst möglich mit einer polaren Lösung z.B. einer wässrigen NaCl-Lösung benetzt wird. Die Benetzung muss bis zur Verwendung beibehalten werden [52].

In weiten Bereichen der Mikrofluidik aber auch z.B. bei "Lab on Chip's" muss für die Fertigstellung eines Systems, PDMS mit anderen Materialen in Kontakt gebracht werden. Dieser Kontakt kann aus einer reversiblen Verbindung oder einer irreversiblen Verbindung bestehen. Bei einer reversiblen Verbindung wird aufgrund von van-der-Waals-Kräften eine wasserdichte Verbindung hergestellt, indem das PDMS-System beispielsweise auf ein Glassubstrat aufgesetzt wird. Damit die Verbindung auch in Mikrofluidiksystemen dicht bleibt, darf kein größerer Druck als p=34,5kPa auf das System einwirken. Eine irreversiblen Verbindung hingegen hält Druck p=206,8-344,7kPa stand [52]. Eine solche irreversible Verbindung kann durch ein Sauerstoffplasma erzeugt werden. Dabei entstehen, wie bereits erwähnt, an der PDMS-Oberfläche aber z.B. auch an einer Glasoberfläche Hydroxygruppen, welche in Kontakt mit weiteren Hydroxygruppen unter Abgabe von H₂O eine irreversible Si-O-Si-Verbindung herstellen [52]. Indem diese Verbindung bei 150°C für 2h ausgeheizt wird, kann die Verbindung zusätzlich verstärkt werden [55].

Neben einer irreversiblen Verbindung zwischen PDMS und Glas gibt es noch eine Fülle von anderen mit PDMS verbindbaren Materialen, wie PDMS selbst, Silizium, Siliziumoxid, Siliziumnitrid, Polyethylene und Polystyrene [52]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich irreversible Verbindungen über ein Sauerstoffplasma zwischen PDMS und Glas bzw. zwischen PDMS und PDMS hergestellt.

Des Weiteren kann die Oberfläche von PDMS silanisiert werden, um eine chemische Funktionalität zu erzeugen. Bei der PDMS-Verarbeitung können Nanomaterialien z.B. Carbon-Nanotubes oder Nanopartikeln zum Einsatz kommen, welche die thermische und elektrische Leitfähigkeit bzw. die mechanische Festigkeit verändern. Mit diesen Veränderungen lassen sich innovative aktive μ -Ventile, Heizelemente, Sortierer, Pumpen, elektrochemische Sensoren und Drucksensoren herstellen [55].

Die Herstellung von PDMS erfolgt aus einem flüssigen Prepolymer und einem flüssigen Vernetzer. Diese beiden Komponenten können in unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen z.B. 5:1, 10:1, 20:1 gemischt werden. Dadurch kann die Flexibilität gezielt beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit, wurde ausschließlich das Standardverhältnis 10:1 gewählt [54]. Das reproduzierbare Herstellen von Strukturen im submikrometer-Bereich kann über verschiedene Verfahren erfolgen. Ein Verfahren, welches hier zum Einsatz kommt ist das so genannte Gussverfahren [51]. Dabei wird im Vorfeld ein PDMS-Master aus Silizium mittels eines photolithographischen Verfahres aus einem nicht nachbelichteten SU-8 Photolack hergestellt (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Das angemischte und anfänglich noch flüssige PDMS wird über diese Gussform gegossen und bei 150°C für 10min gebacken [54]. Beim Aushärten von PDMS schrumpft dieses um etwa 3% [57]. Dieses Verhalten ist beim Design des PDMS-Masters zu berücksichtigen.

Weitere Herstellungsverfahren sind das Extrudieren, Beschichten und die Soft-Lithography. Die Soft-Lithography wie z.B. micro-contact printing, replica molding, micro-transfer molding oder micro-molding ist ein Überbegriff für verschiedene Verfahren mit einem wichtigen Zusammenhang [53]. Dieser Zusammenhang ist ein, im Vorhinein erzeugter, Master aus PDMS. Dieser Master kann wiederum über einen Siliziummaster erzeugt werden, jedoch ist darauf zu achten ob eine negative oder eine positiv Form benötigt wird.



3. Experimentelle und analytische Entwicklung

In Abbildung 3.1 ist der experimentelle und analytische Aufbau der vorliegenden Arbeit graphisch dargestellt. Die Abbildung deckt auch den inhaltlichen Teil dieses Kapitels ab. Zusätzlich wird vor dem Abschnitt 3.4 über Zellkultivierung in Abschnitt 3.3 mit dem Titel – "Das Biolabor" ein kurzer Einblick über die wichtigsten Gerätschaften und Materialen gegeben.





3.1. Multi Electrode Array (MEA) – Chip

Im folgenden Abschnitt wird ausgehend von Reinigungs- und Aufbereitungsprozeduren, über das Kerngebiet der Prozessierung bis hin zu den verschiedene Zellkulturaufsätzen, zur MEA-Chip-Herstellung, detailliert auf alle einzelnen Fertigungsschritte eingegangen. Der MEA-Chip ist das wichtigste Verbindungselement zwischen der biologischen Probe, den Zellen und der messtechnischen Ebene, bestehend aus Impedanzspektrometer und Ansteuerung. Daher muss diesem Teilgebiet und den prozesstechnologischen Herausforderungen besondere Aufmerksamkeit zu Teil werden.

3.1.1. Reinigung und Aufbereitung

Zu Beginn der MEA-Chip-Herstellung ist es besonders wichtig das Borosilicatglas-Substrat BOROFLOAT[®] 33, bezogen von pgo (<u>www.pgo-online.com</u>), mit größter Gewissheit zu reinigen. Wenn Unreinheiten zu Beginn der Fertigung nicht entfernt werden, kann dies vor allem bei sehr kleinen Strukturen negativen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des MEA-Chips haben.

Die Reinigung erfolgt über ein Aceton- und Isopropanolultraschallbad. Damit möglichst schnell alle Lösungsmittelrückstände entfernt werden, wird das Glassubstrat mittels Stickstoff getrocknet. Dieser Vorgang wird optisch kontrolliert und bis zu einer ausreichenden Oberflächenqualität mehrfach durchzuführen.

Nach der Reinigung wird das Substrat von letzten Lösungsmittelrückständen befreit, in dem es auf einer Heizplatte bei 100°C für 5min ausgeheizt wird.

3.1.2. Chromschicht

Bevor der eigentliche Strukturierungsprozess beginnen kann, wird auf das gereinigte Glassubstrat eine Chromschicht aufgebracht. Die Chromschicht wird mit der Sputteranlage von Ardenne LS 320 aufgebracht. Mit den verwendeten Parametern (siehe Tabelle 3.2) ergibt sich eine Schichtdicke von 30nm (siehe Abbildung 3.5-a). Die Chromschicht verbessert die Adhäsion des in weiterer Folge aufgebrachten Photolacks [5], [58]. Die verbesserte Haftung ist vorallem für sehr feine Strukturen, wie dem IDES-8-Elektrodenpaardesign (siehe Abbildung 3.3) entscheidend.



3.1.3. IDES-Strukturierung

Die Strukturierung der Interdigitated Electrodes (IDES) erfolgt über einen photolithographischen Prozess. Zunächst wird der Image Reversal Photoresist AZ 5214E [8], auf das mit Chrom beschichtete Glassubstrat, bei 4000rpm/35s aufgesponnen. Im anschließenden Pre Bake wird der Lack, um enthaltene Lösungsmittel zu entfernen (siehe Abbildung 3.5-b), auf der Heizplatte bei 100°C/60s getrocknet. Mit diesen Parametern ergibt sich eine Lackdicke von 1,4µm, welche die nachfolgenden Parameter festlegt.

Die Strukturierung erfolgt nun über die in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zu sehende, im Laufe dieser Arbeit selbst hergestellte, Chrom-Maske. Zunächst wird das Glassubstrat, bezogen auf die äußeren Ecken der Maske, ausgerichtet. Diese Ausrichtung ist für eine spätere richtige Kontaktierung der Elektroden, durch das MEArack (siehe Abbildung 3.13), entscheidend. Nach der Ausrichtung muss der Lack für 4s belichtet und, da es sich um eine Hellfeldmaske handelt, einem anschließenden Image Reversal Bake bei 120°C/60s unterzogen werden. Die belichteten Bereiche werden durch den Image Reversal Bake vernetzt und damit unlöslich. Vor der abschließenden Entwicklung erfolgt eine Flutbelichtung des Lacks für 25s über die gesamte Fläche des MEA-Chips. Hiermit sind nun die belichteten Bereiche löslich und können mit dem Entwickler AZ 726MIF für 60s entwickelt werden (siehe Abbildung 3.5-c).

In jedem Fall muss, bevor weitere Prozessschritte erfolgen, eine optische Kontrolle der strukturierten Bereiche durchgeführt werden.



Abbildung 3.2: Schematische Draufsicht des IDES-4 Elektrodenpaardesigns: (a) Gesamtdraufsicht, (b) Detailansicht eines IDES-Elektrodenpaares [59].



Abbildung 3.3: Schematische Draufsicht des selbst entwickelten IDES-8 Elektrodenpaardesigns: (a) Gesamtdraufsicht, (b) Detailansicht eines IDES-Elektrodenpaares.

In der Tabelle 3.1 sind überblicksweise alle vorgestellten Prozessschritte und die einzelnen Beispielwerte aufgelistet, die zu einem optimalen Ergebnis bei der MEA-Chip Herstellung führen.

	Prozessschritte	Komponenten/Werte
1.	Reinigung	Aceton, Isopropanol
2.	Photolack	z.B.: AZ 5214E, SU-8 3050
3.	Photolack aufspinnen	z.B.: 4000rpm/35s
4.	Pre Bake	z.B.: 100°C/60s
5.	Exposure	z.B.: 4s
6.	Image Reversal Bake (optional)	z.B.: 120°C/60s
7.	Flutbelichtung (optional)	z.B.: 25s
8.	Development	z.B.: AZ 726MIF
9.	Hard Bake (optional)	z.B.: 150°C/30min

Tabelle 3.1: Prozessschritte für die MEA-Chip Herstellung

Experimentelle und analytische Entwicklung



3.1.4. IDES-Herstellung

Unmittelbar vor dem Auftragen der Elektrodenschicht wird die, durch den photolithographischen Entwicklungsschritt, freigewordene Chromschicht entfernt (siehe Abbildung 3.5-d). Dies geschieht nasschemisch in einem Chromätzbad für 30s mit der Chromätze Etch 18 (Firma microresist technology GmbH [60]).

Für eine biologische Probe müssen alle verwendeten Materialien biokompatibel sein. Aus diesem Grund stellte sich das Elektrodenmaterial Gold als ideal heraus. Als Edelmetall hat Gold hervorragende biokompatible Eigenschaften unter anderem: sehr gute Zelladhäsion [61] und ist biologisch inert [62].

Der Prozess für die Herstellung der Kontaktierungsfelder, Zuleitungen und der eigentlichen Elektroden (siehe Tabelle 3.2) erfolgt über die Sputteranlage von Ardenne LS 320. Dieses Hochvakuumsystem wird eingesetzt, um mit Hilfe von Edelgasionen z.B. Ar⁺, ein gewünschtes Zielmaterial aus einem Target herauszuschlagen. Das Zielmaterial lagert sich in Form einer sehr dünnen Schicht am Substrat an [5]. Dabei kommt zunächst eine dünne 30nm-Schicht Titan als Haftvermittler zwischen Glassubstrat und Gold zum Einsatz [6] (siehe Abbildung 3.5-e). Die eigentliche 100nm-Goldschicht wird nun auf das bereits aufgebrachte Titan aufgesputtert (siehe Abbildung 3.5-f).

	Titan	Gold	Chrom
Basisdruck	2×10 ⁻⁵ mbar	2×10⁻⁵mbar	2×10 ⁻⁵ mbar
Arbeitsdruck	8×10 ⁻³ mbar	8×10 ⁻³ mbar	8×10 ⁻³ mbar
RF-Leistung	75W	50W	100W
Zeit	2x30s	3x60s	30s

Tabelle 3.2: Prozessparameter für von Ardenne LS 320

Der Prozess des Sputterns erzeugt eine, auf der gesamten Substratoberfläche, anisotrope Schicht. Demzufolge ist diesem PVD-Verfahren ein Lift-off-Prozess anzuschließen, damit jene nicht relevanten, mit Lack beschichteten, Bereiche entfernt werden können. Dazu wird das beschichtete Glassubstrat für 60min in ein Acetonbad gelegt. Das Aceton löst unterhalb des Titans (siehe Abbildung 3.5-g) den vorhandenen Lack und damit auch Titan und Gold von dem Glassubstrat ab. Auf dem Borosilicat-Glassubstrat bleiben nur die zuvor wegentwickelten Bereiche wie Kontaktierungsfelder, Zuleitungen und IDES-Elektroden zurück (siehe Abbildung 3.14).

Für die Funktionalität des Endprodukts, MEA-Chip, ist es wiederum von entscheidender Bedeutung den Lift-off-Prozess, durch eine optische Kontrolle, zu überwachen. Hier können, durch nicht vollständig weggelöste Lack/Goldbereiche, Kürzschlüsse der Elektroden und damit ein Elektrodenausfall entstehen.



3.1.5. Die Definierung der IDES-Elektrodenfläche

Damit die Bereiche der Elektrodenanschlüsse und der Zuleitungen keinen Einfluss auf die Impedanzmessung nehmen können, werden die Elektrodenflächen über eine Siliziumnitrid-(Si₃N₄)-Schicht definiert. Vor der Si₃N₄-Abscheidung, muss wiederum die, durch den Lift-off-Prozess, hervorgekommene Chromschicht nasschemisch, in dem bereits erwähnten Chromätzbad, geätzt werden (siehe Abbildung 3.5-h).

Nun erfolgt der Prozess der plasma-unterstützen chemischen Gasphasenabscheidung, kurz PECVD. Hier wird über zwei Vorläufergase, in diesem Fall Silan-SiH₄ und Ammoniak-NH₃, ein Plasma gezündet. Durch dieses Plasma und eine auf 300°C geheizten Substratoberfläche entsteht eine chemische Reaktion an der Oberfläche, wobei sich die Si₃N₄-Schicht abscheidet [5]. Mit den Parametern aus Tabelle 3.3 entsteht eine homogene, auf der gesamten Substratoberfläche verteilte, Schichtdicke von 432nm (siehe Abbildung 3.5-i). Das Verfahren der PECVD verdeckt dementsprechend auch alle IDES-Elektroden und Kontaktierungsfelder. Diese Bereiche müssen in einem weiteren Fertigungsschritt, dem reaktiven Ionenätzen – RIE, wiederum freigelegt werden. Wie in Abbildung 3.5-j ersichtlich ist, sollen nur jene Bereiche der Elektroden und Kontaktierungsfelder frei von der Si₃N₄-Schicht sein. Zum einen müssen die Elektronen kontaktierbar sein und zum anderen sollen die CaCo2-Zellen auf den freien Gold-IDES wachsen können. Aus diesem Grund hat vor dem reaktiven Ionenätzen ein zweiter lithographischer Prozess zu erfolgen. Im Unterschied zu dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Prozess wird hier um keine überhängenden Kanten zu erhalten eine Dunkelfeldmaske verwendet. Damit werden die Arbeitschritte Image Reversal Bake mit anschließender Flutbelichtung nicht benötigt. Gute Ergebnisse erzielt man, wenn die Belichtungszeit auf 5,2s erhöht wird.

	Si ₃ N ₄
Arbeitsdruck	1torr
RF-Leistung	12W
Zeit	30min
Temperatur	300°C
Silan-SiH₄	700sccm
Ammoniak-	
NH₃	18sccm

Tabelle 3.3: Prozessparameter für Oxford Plasma 80 Plus

set pressure	50mtorr
strike pressure	40mtorr
RF-Leistung	50W
ICP-Leistung	100W
Zeit	10min
Temperatur	30°C
SF ₆	20sccm
Ar	10sccm

Tabelle 3.4: Prozessparameter für Oxford Plasmalab System 100



Nachdem die zweite Lackschicht strukturiert wurde, ist der MEA-Chip für das reaktive Ionenätzen vorbereitet (Abbildung 3.5-k). Bei der RIE-Prozessierung kombiniert man sowohl einen mechanischen Materialabtrag durch Argonionen Ar^{+} und eine chemische Reaktion durch das Reaktionsgas Schwefelhexafluorid SF₆ [6]. Mit Hilfe der Lackstrukturierung werden nur jene Si₃N₄-Bereiche selektiv geätzt welche frei geworden sind. Nachdem die IDES-Elektroden und Kontaktierungsfelder wieder frei liegen (Parameter siehe Tabelle 3.4) muss die zweite strukturierte Lackschicht in einem Acetonbad entfernt werden (Abbildung 3.5-l).

Der große Vorteil der Flächendefinierung der IDES-Elektroden über eine Siliziumnitridschicht ist die Festlegung der Messfläche (siehe Abbildung 3.4). CaCo2-Zellen auf dem IDES-Elektrodepaar werden in die Impedanzmessung miteinbezogen, jene Zellen auf der Siliziumnitridschicht nehmen keinen Einfluss auf das Messergebnis. Des Weiteren können die Zuleitung zu den Elektroden mit der Isolationsschicht ausgeblendet werden. Dies trägt zu einem homogenen elektrischen Feld über dem Elektrodenpaar bei.



Abbildung 3.4: Schematische Draufsicht der Elektrodenpaare mit definierter Elektrodenfläche und Zell-Reservoir.





Abbildung 3.5: Schematische Ansicht der Prozessierungsschritte für den MEA-Chip.



3.2. Zellkultursysteme

3.2.1. Offenes Zellkultursystem

Das Zellkultursystem dient zum einen um die Zellen in einem bestimmten Bereich auf dem MEA-Chip zu positionieren und zum anderen um die Zellen mit Nährmedium zu versorgen. Im vorliegenden Kapitel wird hierfür ein einfacher Lösungsansatz, die offene Zellkultur, vorgestellt. Die Herangehensweisen basieren auf dem in Abschnitt 2.4.4 vorgestellten Material Polydimethylsiloxan - PDMS.

Dieses in der Handhabung einfache System ist ähnlich einer Mikrotiterplatte. Hierfür wird, wie in Abbildung 3.6 ersichtlich ist, aus einem gegossenen PDMS-Block ein Loch mit 8mm Durchmesser ausgestanzt. Hierfür wird ein Biopsy Punch, einem aus der medizinischen Diagnostik entlehntem Instrument, verwendet. Diese ausgestanzten Bereiche dienen als Reservoirs für die Zellkulturen.

Als nächsten Schritt müssen die vier ausgestanzten Reservoirs (siehe Abbildung 3.4) über den Elektrodenpaaren ausgerichtet werden. Im Falle des IDES-4-Elektrodenpaardesigns kann dies optisch erfolgen. Dabei wird die Zellkulturkammer händisch aufgesetzt und mittels eines Mikroskops, auf korrekt sitzende Position, kontrolliert. Für das IDES-8-Elektrodenpaardesign wurde die Elektrodenfläche möglichst groß dimensioniert, um einen flächenhaften Zellverbund messen zu können. Hierbei entsteht die Herausforderung der exakten Ausrichtung der Reservoirs über den Elektrodenpaaren. Da dies händisch nur schwer zu erreichen war, besteht die Möglichkeit den Mask-Aligner Karl Suss MJB 3 als Ausrichtungstool zu nutzen. Hierzu wird der MEA-Chip als "Maske" verwendet und die Zell-Reservoirs bezogen auf die Elektrodenpaare ausgerichtet und in Kontakt gebracht.



Abbildung 3.6: offenes Zellkultursystem mit einem Biopsy Punch.

Schlussendlich ist noch dafür Sorge zu tragen, dass der MEA-Chip und die Zell-Reservoirs eine, für ein benötigtes Zellmedium, dichte Verbindung eingehen. Dies geschieht mit dem Prozess des Plasmaveraschens. Dazu werden der MEA-Chip und das Zellkultursystem, zusammen als Zellsensor bezeichnet, für 35s bei 75W im Plasmaverascher TePla 100-E belassen. Dabei entsteht mit Hilfe eines O₂-Plasmas eine irreversible Verbindung von Si-O-Si-Gruppen zwischen PDMS und dem MEA-Chip [52], [55] (siehe Abbildung 3.7-f). Anschließend wird der Zellsensor, um eine gute Verbindung zwischen MEA-Chip und Zellkultursystem zu erreichen, bei 85°C für 10min auf der Heizplatte aufgeheizt. Der Prozess des Plasmaveraschens ist für die Elektroden auf dem Glassubstrat kritisch, da bei zu hoher Leistung oder zu langer Zeit die Elektroden bzw. Zuleitungen beschädigt werden können [59].



3.2.2. Geschlossenes Zellkultursystem

Bei einem geschlossenen Zellkultursystem wurden in der vorliegenden Arbeit Herstellungstechniken der Mikrofluidik verwendet. Wie bereits in Abschnitt 2.4 ausführlich beschrieben können mit Hilfe der Mikrofluidik eine Vielzahl unterschiedlicher fluidische System mit Kanälen, Reservoirs, Pumpen, Ventile und Mixer entwickelt werden [56]. Für das vorliegende geschlossene System werden vorallem verschiedene Kanäle und Reservoirs sowie fluidische Verteiler, Zu- und Ableitungen benötigt. Hierfür wird das Verfahren der Soft Lithographie eingesetzt.

3.2.2.1. Der photolithographische PDMS-Master

Ein PDMS-Master ist eine gewünschte Gussform, bei der das Mikrofluidiksystem in positiver Form vorliegt. Wie in Abbildung 3.7-d ersichtlich, wird über diesen Master das, im Verhältnis 10:1, angerührte PDMS gegossen und bei 140°C für 10min aufgeheizt. Nachdem das ausgehärtete PDMS vom Master entfernt wurde, liegt das Mikrofluidiksystem in endgültiger Form vor.

Eine Möglichkeit einen PDMS-Master zu erstellen, liegt in der photolithographischen Prozessierung. Hierfür wird auf einem gereinigten Siliziumwafer, welcher als Substrat dient, der Photolack SU-8-3050 (Firma MicroChem Corp.) aufgesinnt (siehe Abbildung 3.7-a). Bei den Produkten der SU-8-Lacke handelt es sich um hochviskose, negative Lacke. Durch die Viskosität erreicht man hohe Schichtdicken zwischen 4-120µm [7]. Bei den verwendeten Spinparametern von 1000rpm für 30s ergibt sich eine gemessene Schichtdicke von 100µm. Nach dem aufspinnen des Lacks wird dieser bei 95°C für 45min einem Soft Bake unterzogen. Dieser Backschritt ist erforderlich um Lösungsmittel zu verdampfen und den Lack damit zu trocknen. Die Belichtung erfolgt wiederum mit dem Mask Aligner Karl Suss MJB 3 für 25s über eine Dunkelfeldmaske. Um letzte Lösungsmittelrückstände zu entfernen folgt nach der Belichtung ein Post Exposure Bake bei 95°C für 5min. Damit ist der Lack für die Entwicklung mit dem Entwickler mr-DEV 600 vorbereitet. Der Prozessschritt der Entwicklung muss für ein gutes Ergebnis kontrolliert werden (siehe Abbildung 3.7-b). Zunächst wird der Lack für 15min entwickelt und im direkten Anschluss mit Isopropanol gespült [7]. Die Spülungen dienen dazu, um Lackrückstände zu entfernen. Die zurückgebliebenen Lackrückstände müssen durch mehrmaliges Wiederholen von wechselnder Entwicklung für 30s und Isopropanol-Spülung entfernt werden. Abschließend ist eine optische Kontrolle notwendig um sicherzustellen, dass sämtliche Rückstände, welche sich als weißliche Schlieren abzeichnen, entfernt wurden.

Der Lack dient mit der entwickelten Strukturierung als fertige Gussform. In vielen Fällen ist die Lackstrukturierung nur ein Zwischenschritt für einen anschließenden Prozessschritt wie z.B. Sputtern, reaktives Ionenätzen, etc. und wird wieder entfernt. Deshalb muss hier, um den Lack zusätzlich zu härten, nach der Entwicklung ein Hard Bake bei 150°C für 30min angeschlossen werden. Vor einer weiteren Verwendung des PDMS-Masters wird eine Ruhephase von einer Stunde eingehalten.



Wie bereits erwähnt wird über dem Master angerührtes PDMS gegossen und anschließend ausgehärtet (siehe Abbildung 3.7-d). In einem nachfolgenden Schritt muss das ausgehärtete PDMS vom Master abgelöst werden. Um diesen Vorgang zu erleichtern wird die Gussform, wie in Abbildung 3.7-c zu sehen ist, silanisiert [56], [63]. Dazu wird der Master mit Aceton und Isopropanol gereinigt und anschließend mit 40µl Trichlormethysilan für 10min in eine Vakuumkammer gelegt. Durch die Kondensation von Silanolen an der Substratoberfläche entsteht eine Antihaftschicht, welche zu einem besseren Ablösen des Mikrofluidiksystems von dem PDMS-Master führt (siehe Abbildung 3.7-e).



Abbildung 3.7: Schematische Ansicht der Prozessierungsschritte für den PDMS-Master.



Liquid-Multiplexer

Für die Zellversorgung und getrennt steuerbare Zugabe von Zusätzen, wie z.B. Bromelain als Permeation Enhancer, kommt bei dem geschlossenen Zellkultursystem die Spritzenpumpe KDS Legato 110 (Firma kdsscientific - www.kdsscientific.com) zum Einsatz. Die Verwendung und Ansteuerung der softwaregesteuerten Präzisionpumpe wird in Abschnitt 3.6 näher beschrieben. Diese Spritzenpumpe kann mit einer Spritze betrieben werden. Das Design des Zellsensors sieht jedoch vier Reservoirs vor, deshalb wurde wie in Abbildung 3.8-a ersichtlich ist, ein 4in1-Liquid-Multiplexer entwickelt. Dieser Multiplexer kann Flüssigkeiten, bei einem gemessenen Volumenstrom $\dot{V} = 1 \frac{\mu l}{min} - 1 \frac{ml}{min}$, präzise auf die einzelnen Outputkanäle verteilen. Damit der Multiplexer einwandfrei funktioniert muss dieser plasmaverascht werden. Das dient zum einen dazu, um eine irreversible Verbindung zwischen einer Substratoberfläche z.B. einem Objektträger und dem hydrophoben PDMS herzustellen. Zum anderen soll das, an sich hydrophobe, PDMS durch das O_2 -Plasma hydrophil werden [56], [64]. Die nun hydrophilen Mikrofluidikkanäle, mit einer Breite von 1000µm, müssen nach dem plasmaveraschen innerhalb weniger Minuten mit Flüssigkeit z.B. PBS oder Zellmedium gefüllt werden. Die Hydrophilität würde ansonsten wieder verloren gehen und ein konstanter, gleichmäßiger Fluss wäre damit nicht mehr möglich. Wie in Abbildung 3.10 ersichtlich ist, führt eine Zuleitung von der Spritzenpumpe zum Inlet des Multiplexers. Dieser verteilt dann präzise und gleichmäßig den Flüssigkeitsstrom zu je einem der vier Outlets. Die Outlets dienen nun als Eingänge für das Zellkultursystem.



Abbildung 3.8: PDMS-Master: (a) Liquid-Multiplexer; (b) Zellkultursystem

Nach dem Gießen, Aushärten und Zurechtschneiden des Liquid-Multiplexers müssen noch die Zugänge für Zu- und Ableitungen gestanzt werden. Dies geschieht ähnlich dem bereits beschriebenen Vorgang des Stanzens mit dem Biopsy Punch. Hier wird jedoch eine präparierte Kanüle verwendet [65]. Dazu wird eine Kanüle mit Lanzettenschliff und 2mm Durchmesser plan abgesetzt und ähnlich dem Biopsy Punch schräg angeschliffen (siehe Abbildung 3.9-b). Dadurch entsteht ein Stanzdurchmesser von 1,5mm. Mit solchen modifizierten Kanülen können sehr dünne Zugänge mit weniger als 1mm Durchmesser gestanzt werden. Die Variabilität des Stanzdurchmessers ist mit der Vielzahl an erhältlichen Kanülendurchmessern sehr breit gefächert und kann damit an die jeweils verwendeten Zuleitungen angepasst werden. In diesem Fall werden Tygon Microbore Tubing, bezogen über das Microfluidic Innovation Center elveflow [66], verwendet. Diese Zuleitungen sind für jedes 23G-Zubehör geeignet und haben einen Außendurchmesser von 1,5mm. Da der Stanzdurchmesser die gleiche Größe wie der Außendurchmesser der Zuleitungen hat, können diese ohne zusätzliche Verklebung in die ausgestanzten Bereiche gesteckt werden. Dabei ergeben sich ausgetestete dichte und reversible Verbindungen bei dem oben genannten Volumenstrombereich.



Zellkultursystem

Das Zellkultursystem verfügt, wie auch die offene Zellkultur aus Abschnitt 3.2.1 über ein Reservoir, je Zellkultur, welches mit Zellmedium gefüllt wird. Für diese Anforderungen wurde ein weiterer PDMS-Master designt (Abbildung 3.8-b). Das Design verfügt über ein Reservoir mit 8mm Durchmesser und je einem 1000µm breiten Zuleitungskanal. Um nun eine Zu- und Ableitung herstellen zu können, stellte sich aus Platzgründen auf dem Zellsensor in Verbindung mit dem MEArack, ein Zellkultursystem bestehend aus zwei PDMS-Schichten, als ideal heraus. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass die PDMS-Schichten zusammen eine Gesamthöhe von 13mm, bedingt durch das MEArack, nicht überschreiten. Der Grundgedanke war es, ein möglichst einfaches System zu entwickeln. Daher kann das Zellkultursystem, mit demselben PDMS-Master, sowohl aus einem als auch aus zwei Schichten bestehen.

Ein Mikrofluidiksystem bestehend aus mehreren Schichten und kann auf verschiedene Art und Weise miteinander verbunden werden. Bei allen Möglichkeiten ist darauf zu achten, dass beim PDMS-Gießen die Oberfläche glatt wird. Wenn die Gusswanne, gefaltet aus Aluminiumfolie, zu knapp bemessen ist, entsteht auf Grund der Grenzflächenspannung zwischen PDMS und Aluminiumwand ein konkaver Meniskus [67]. Damit kann nicht mehr sichergestellt werden, dass verschiedene PDMS-SChichten dicht aneinander liegen. Hier schafft eine etwas größer bemessene Gusswanne, in Verbindung mit dem anschließenden wegschneiden des Randes, Abhilfe.



Abbildung 3.9: Schematische Ansicht: (a) Mikrofluidiksystem mit Zellmedium und Flussrichtung; (b) geschliffene Kanüle

Eine einfache Möglichkeit, zwei oder mehrere PDMS-Schichten miteinander zu verbinden, kann über den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Prozess des Plasmaveraschens erfolgen. Des Weiteren können auch zwei bereits gegossene und ausgehärtete PDMS-Schichten mit flüssigem PDMS verklebt werden. Dazu wird, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben, flüssiges PDMS angerührt und in eine Spritze blasenfrei aufgezogen. Das flüssige PDMS wird nun mittels des Spinners auf ein MEA-Chip-Glassubstrat, welches als Träger dient, aufgesponnen. Als geeignete Spin-Parameter stellten sich 2ml PDMS bei 2000rpm für 100s und im Anschluss bei 6000rpm für 300s heraus. Danach wird die wenige µm Dicke PDMS-Schicht für 15min ruhen gelassen. In der Zwischenzeit kann das PDMS-Mikrofluidiksystem plasmaverascht werden, um die Hydrophilität der Mikrofluidikkanäle herzustellen. Nun kann die dünne und noch flüssige PDMS-Schicht, ähnlich einer Stempelmethode,



durch auflegen und vorsichtiges andrücken der Klebefläche auf das Mikrofluidiksystem transferiert werden. Als letzten Schritt muss der flüssige PDMS-Kleber zwischen den ausgehärteten PDMS-Schichten bei 90°C für 15min gehärtet werden [68]. Die Verklebung ist in jedem Fall, sei es zwischen PDMS und PDMS oder zwischen PDMS und Glas, stärker als die Verbindung durch das Plasmaveraschen [69].

Bei dem 2-Schicht-Zellkultursystem wird zweimal das Mikrofluidiksystem aus Abbildung 3.8-b gegossen und um 90° gegeneinander verdreht und danach verklebt. Dabei werden in die erste Schicht Bereiche für die Reservoirs und Bereiche für die Zuleitungen gestanzt. Die zweite, obere Schicht dient zum einen um das Zellkultursystem zu verschließen und zum anderen müssen Zuund Ableitungen ausgestanzt werden. Wie in Abbildung 3.9-a und Abbildung 3.10 zu sehen ist, wird das Zellmedium in jedes einzelne Reservoir separat hineingepumpt und in der Zwischenschicht durch die Ableitungen wieder abgepumpt. Das abgepumpte Medium gelangt schlussendlich in einen Abfallbehälter.



Abbildung 3.10: Foto eines mit Tinte gefüllten Mikrofluidiksystems.



3.2.2.2. Der gedruckte PDMS-Master

Eine sehr interessante Alternative zur herkömmlichen Herstellung des PDMS-Masters mittels Photolithographie, ist die Verwendung eines 3D-Druckers. Es sind sehr viele verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Verfahren verfügbar, welche alle dem Rapid-Prototyping Grundgedanken unterliegen. Die grundlegenden Anforderungen waren es, eine einfache, sehr schnelle und preisgünstige alternative zur Photolithographie zu finden. Des Weiteren soll der PDMS-Master mittels einer Software z.B. AutoCAD am PC erstellt und ohne weiteren Zwischenschritt dem Drucker übermittelt werden können. Der Drucker selbst liefert schlussendlich den einsatzbereiten Master.

Aus diesem Grund wurden zwei gänzlich unterschiedliche Verfahren in Betracht gezogen. Ein Verfahren ist das so genannte Pulverdruckverfahren, bei dem ein Bindemittel ein aufgebrachtes Pulver verklebt. Dadurch kann das Modell Schicht für Schicht, auch in verschiedenen Farben, gefertigt werden [70]. Für diesen Versuch wurde der Drucker Spectrum Z510 der Firma ZCorporation (http://www.zcorp.com/de/home.aspx) in begutachtet. Dieses Modell wird von der Firma schnellmodell.at (http://www.schnellmodell.at/index.html) betrieben und hat laut Herstellerangaben eine Auflösung von 600x450dpi bei einer Schichtdicke von 89µm [71]. Diese Angaben scheinen zunächst die gestellten Anforderungen an das Mikrofluidiksystem von einigen 100µm Kanalbreite und 100-200µm Kanalhöhe zu erfüllen. Das Pulverdruckverfahren liefert im Bereich Architektur und Landschaftsgestaltung sehr gute topographische Resultate, jedoch ist das Ergebnis sehr spröde, feine Strukturen können leicht brechen und eine Nachbearbeitung des Modell kann erforderlich sein [70]. Damit sind eine Reproduzierbarkeit und eine Mehrfachverwendung des Masters nicht mehr gegeben.

Das zweite Verfahren, dass so genannte Fused Deposition Molding kurz FDM, verwendet im Gegensatz zu den zwei Komponenten (Bindemittel, Pulver) des Pulverdruckverfahren nur aufgeschmolzenen Kunststoff als Material [70]. Dieses Verfahren wurde von der Firma Stratasys (http://www.stratasys.com/) entwickelt und heizt einen Kunststoffdraht z.B. aus ABS – Acrylnitril-Butadien-Styrol oder Polycarbonat auf, bis dieser zähflüssig wird [70]. Eine in xy-Richtung bewegliche Düse trägt den zähflüssigen Kunststoff auf eine, in z-Richtung bewegliche, Trägerplatte auf. Der Kunststoff härtet auf der Trägerplatte aus und kann nach Fertigstellung des Modells sofort verwendet werden. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist, die Möglichkeit überhängende Konstruktion zu realisieren. Dazu wird vollkommen automatisch eine Stützkonstruktion während des Drucks mitentwickelt, welche im Nachhinein rückstandsfrei entfernt werden kann. Für diesen Versuch wurde das 3D-Druckermodell Dimension 768 der Firma Dimension (http://www.dimensionprinting.com/default.aspx) verwendet, welches im Vienna Fab Lab happylab (http://www.happylab.at/) benützt werden kann. Dieser Drucker bietet eine Schichtdicke von 254µm, welche sich als noch praktikabel herausstellte [72]. Die Herstellungsdauer eines PDMS-Masters kann sehr kurz gehalten werden und eignet sich damit hervorragend, um schnell verschiedene Prototypen drucken und testen zu können.



3.3. Das Biolabor

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Einblick in die Arbeitsweisen und vorallem eine Erklärung der benötigten Gerätschaften erfolgen, um ein Biolabor für Zellkulturen erfolgreich führen zu können. In Abschnitt 3.4 werden in späterer Folge die Arbeitsweisen und damit die Routinearbeiten für die CaCo2-Zellkultivierung näher beschrieben.

Bei jeglicher Kultivierung von Organismen z.B. Pilze, Bakterien oder Zellen, für wissenschaftliche Experimente ist die sterile, gewissenhafte und genaue Handhabung im Umgang mit dem jeweiligen Präparat unumgänglich. Jede kleine Unachtsamkeit kann das eigene Experiment unbrauchbar machen und somit die Wiederholung des Versuchs zur Folge haben. Im schlimmsten Fall kann es ein neues Ansetzen der Zellkultur notwendig machen.

3.3.1. Inkubator

Zunächst muss man für die zu kultivierenden Zellen in-vitro ideale Lebensbedingungen schaffen, welche diese auch in-vivo vorfinden würden. Bei den CaCo2-Zellen handelt es sich um Säugerzellkulturen, deshalb sind die Parameter Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Nährstoffzufuhr und pH-Wert von entscheidender Bedeutung [73]. Die Temperatur (37°C) und Luftfeuchtigkeit (95%) werden über einen Inkubator Binder CO2 Brutschrank CB 150 geregelt. Des Weiteren verfügt der Inkubator über eine CO₂-Versorgung (5%) und einen CO₂-Sensor, um den pH-Wert des verwendeten Nährmediums im neutralen Bereich zu stabilisieren [74].

3.3.2. Mikrobiologische Sicherheitswerkbank

Der wichtigste Grundsatz eines erfolgreichen und kontaminationsfreien Biolabors, ist der möglichst sterile Arbeitsablauf sämtlicher Arbeitsschritte. Hierzu zählt neben dem Autoklav (siehe Kapitel 3.3.3) als wichtigste Gerätschaft eine mikrobiologische Sicherheitswerkbank – LaminarFlow der Klasse II. Diese Sicherheitswerkbank besitzt einen zirkulierenden, mit HEPA-Filter gefilterten, Luftstrom welcher einen teilweisen Schutz des Experimentators und einen Schutz der Zellkultur gewährleistet [74]. Der Benutzer einer Sicherheitswerkbank hat vor der Arbeit seine mit Handschuhen geschützten Hände mit 70%-Ethanol zu sterilisieren. Dies geschieht über eine Sprühflasche und dem anschließenden verreiben des Ethanols. Mit diesen Vorkehrungen wird ein steriles Arbeiten innerhalb der Sicherheitswerkbank gewährleistet. Neben dem gefilterten Luftstrom und der Wischsterilisation der Handschuhe mit Ethanol wird zusätzlich vor und nach dem Arbeiten in der Sicherheitswerkbank eine UV-Lampe eingesetzt. Diese UV-Lampe zerstört die DNA von Mikroorganismen und dient damit als zusätzliches Sterilisierungsinstrument [75].

3.3.3. Autoklav

Der Autoklav, Modell Systec VX-40 der Firma Systec GmbH, ist ein weiteres unumgängliches Gerät für ein Biolabor [76]. Diese Komponente wird in zwei unterschiedlichen Arbeitsbereichen eingesetzt. Dabei werden die zu autoklavierenden Bestandteile, unter hohem Druck (200kPa) und bei großer Hitze (121°C oder 134°C) autoklaviert. Zum einen wird diese Arbeitsmethode verwendet, um unsterile Bestandteile wie Gefäße, Aufbewahrungsbehälter, Pipettenspitzen aber auch der für die Impedanzmessung gefertigte Zellsensor möglichst von allen Kontaminationen zu befreien. Zum anderen fallen bei der Zellkultivierung viele Verbrauchsmaterialien wie verbrauchtes Medium, Pipetten, Pipettenspitzen, Gefäße, etc. an. Dieser Abfall muss bevor er entsorgt wird, bei 200kPa und 134°C autoklaviert werden. Die zu autoklavierenden Komponenten werden in einen autoklavierbaren Kunststoffbeutel gegeben und mit einem hitzebeständigen Autoklavierband gut verschlossen. So verpackt können autoklavierte Verbrauchsmaterialien entsorgt werden. Die Verbrauchsmaterialien, welche vor der Verwendung zu autoklavieren sind, müssen steril gehalten werden. Dazu ist der verschlossene Beutel mit Ethanol zu sterilisieren und in die Sicherheitswerkbank zu geben. Erst innerhalb der Werkbank kann der Kunststoffbeutel sicher geöffnet und die sterilen Gegenstände z.B. Pipettenspitzen herausgenommen und in wiederverwendbare Gläser verschlossen werden.

3.3.4. weitere Komponenten des Zelllabors

Neben den bereits beschriebenen Komponenten werden zusätzlich ein Wasserbad, Zentrifuge, Inversionsmikroskop, Kühlschrank, Eisschrank und Kryobehälter benötigt.

Wasserbad

Das Wasserbad dient dazu gekühlte Reagenzien wie Zellmedium, Trypsin oder PBS auf 37°C zu erwärmen um diese für weitere Arbeitsschritte verwenden zu können. Alle Flüssigkeiten welche mit Zelllinien wie den CaCo2-Zellen in Kontakt kommen müssen auf 37°C erwärmt werden, damit möglichst in-vivo-Bedingungen simuliert werden. Des Weiteren kommt das Wasserbad zum Einsatz, wenn gefrorene Komponenten z.B. Serum, Trypsin, L-Glutamin aber auch neue Zelllinien aufgetaut werden müssen [73].

Zentrifuge

Eine Zentrifuge wird in einem Biolabor für die Zellkultivierung benötigt, um Zellen aus einer Zellsuspension zu sedimentieren. Dies ist bei einer Zellpassage notwendig. Dabei werden die im Medium verteilten Zellen in einem Zentrifugenröhrchen bei hoher Zentrifugalkraft (4000rpm/3,5min) vom Medium getrennt. Dadurch kann verbrauchtes Medium und Trypsin von den Zellen getrennt werden [74].



Inversionsmikroskop

Ein Inversionsmikroskop ist ein Durchlichtmikroskop, bei dem das Objektiv und die Lichtquelle unterhalb des Präparats platziert sind. Dadurch erreicht man hohe Arbeitsabstände um z.B. Culture Flasks zwischen Objektiv und Okular stellen zu können. Es wird eingesetzt, um Vitalität, Morphologie, Zellwachstum und Konfluenz der Zellschicht optisch beobachten zu können. Durch die direkte Beobachtung in der Kulturflasche ergibt sich der große Vorteil, dass Zellen nicht auf einen Objektträger präpariert werden müssen [73].

Kühlschrank, Eisschrank und Kryobehälter

Kühl- und Eisschrank werden benutzt um alle flüssigen und teilweise auch festen Komponenten, für die Zellversorgung und Präparation, zu lagern. Der Kryobehälter wird für die zeitlich unbegrenzte Zelllinienkonservierung benötigt. Dies geschieht in einem mit flüssigem Stickstoff, also bei -196°C gekühlten, gefüllten und verschlossenen Kryobehälter. In diesem Behälter können, bei ausreichender Überwachung des Flüssigkeitsstandes, die tiefgefrorenen Zellen unbegrenzt gelagert werden [73].

3.3.5. Zubehör und Verbrauchsmaterialien

Es gibt eine Fülle von sehr unterschiedlichen Verbrauchsmaterialien, dazu zählen unter anderem Glasgefäße, Zentrifugenröhrchen und Kryoröhrchen in verschiedenen Größen für die verschiedensten Flüssigkeitsmengen. Zur Zellkultivierung selbst werden bereits sterile Zellkulturflaschen, Modell VWR-Collection 734-2313 (75cm² Kulturfläche) der Firma VWR, eingesetzt. Als sehr einfach in der Handhabung haben sich jene Zellkulturflaschen herauskristallisiert, welche einen mit einen hydrophoben Filter (Porengröße \approx 0,22µm) belüftetet Verschluss aufweisen. Hiermit ist ein CO₂-Austausch zwischen Umgebung und Zellmedium möglich ohne, dass Pilzsporen, Bakterien und Viren eindringen können [73].

Des Weiteren erweisen sich Pipetten mit unterschiedlichem Fassungsvolumen z.B. 10µl, 100µl, 1000µl mit den entsprechenden Pipettenspitzen für sehr kleine Volumina als hervorragendes Instrument. Eine Akkupette, eine elektrisch betriebene Pipette, ist ebenfalls ein sehr hilfreiches Tool um größere Mengen Flüssigkeit z.B. Zellmedium beim Medienwechsel austauschen zu können.



3.4. Zellkultivierung auf dem MEA-Chip

Nachdem der MEA-Chip und das entsprechende Zellkultursystem gefertigt und zu einem Zellsensor zusammengesetzt wurden, sind im nächsten Schritt die CaCo2-Zellen auszusäen. Als eigenständiger Arbeitsbereich müssen parallel die Zellen kultiviert werden. Hierfür werden die CaCo2-Zellen sowohl im Pharmaziezentrum der Universität Wien als auch am Institut für Festkörperelektronik der Technischen Universität Wien kultiviert und Impedanzmessungen durchgeführt. Um auf die Arbeitsweisen und, die sich dabei ergebenden, Problemstellung näher einzugehen, werden in diesem Kapitel die Arbeitsabläufe am Institut für Festkörperelektronik, welche für eine erfolgreiche Zellkultivierung nötig sind, besprochen.

3.4.1. Zellmedien

Die Nährstoffzufuhr der Zellen erfolgt durch ein spezielles Zellkulturmedium. Am Institut für Festkörperelektronik wird das Eagle's MEM Minimalmedium (Sigma Aldrich http://www.sigmaaldrich.com) verwendet. Diesem Medium ist zunächst ein Volumenanteil von 20% fetales Kälberserum (FBS-fetal bovine serum) zuzusetzen, welches Wachstumfaktoren, Nährstoffe und Vitamine für die CaCo2-Zelllinie zur Verfügung stellt. Des Weiteren wird zum Schutz gegen eine bakterielle Zellwandsynthese und gegen eine bakterielle Proteinbiosynthese eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin, mit einem Volumenanteil von 1% dem Medium zugesetzt [73]. Bei der Herstellung dieser Komponenten zu einem Nährmedium, sind alle Bestandteile auf 37°C zu erwärmen und zusammenzufügen. Damit alle Inhaltsstoffe möglichst lange stabil bleiben und ihre Wirkung nicht verlieren, wird das angemischte Nährmedium bei 4°C gekühlt. Als letzte aber sehr wichtige Komponenten sind die Aminosäuren zu erwähnen. Die Aminosäuren können in essenzielle und nicht-essenzielle Aminosäuren gruppiert werden. Die nicht-essenziellen Aminosäuren müssen den Zellen zu Verfügung gestellt werden, da diese von Wirbeltieren und darum auch von Zelllinien nicht selbst synthetisiert werden können. Deshalb wird die Aminosäure L-Glutamin, als 1% ige Fertiglösung (200mM), dem Nährmedium zugesetzt. Da L-Glutamin bei 37°C nicht lange stabil bleibt, hat es sich als sinnvoll erwiesen, das L-Glutamin einer geringeren Menge Nährmedium separat zuzusetzen, welches nach längstens 4 Wochen bei 4°C Lagerung aufgebraucht wird [73].

Im Pharmaziezentrum der Universität Wien wird als Medium RPMI 1640 verwendet. Dieses Medium ist, wie auch das Eagle's MEM, ein Medium mit einer Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten und beinhaltet unter anderem Aminosäuren und Vitamine. Auch bei diesem Medium sind Komponenten wie Serum, Wachstumsfaktoren und Aminosäuren (z.B. L-Glutamin) zu supplementieren [73].



3.4.2. Die Zellkulturaussaat

Die Kultivierung einer Zelllinie beginnt mit der Aussaat der Zellen in einem geeigneten Zellkulturgefäße z.B. einer Zellkulturflasche. Die auszusäenden Zellen können von einer bereits bestehenden Zelllinie gewonnen werden oder von kryokonservierten Zellen stammen. Hier unterscheiden sich die Arbeitsabläufe nur geringfügig. Die bereits gezählten Zellen (siehe Abschnitt 3.4.5) werden anteilsmäßig in die Zellkulturflasche eingebracht und mit einem bereitstehenden und vorgewärmten Nährmedium bis auf 20ml aufgefüllt. Die Zellkulturflasche wird nun verschlossen und möglichst rasch in den Inkubator gestellt. Hier können sich die CaCo2-Zellen auf dem hydrophilen und adhäsiv vorbehandelten Boden absetzten, anhaften und proliferieren. Die Zellzahl wurde mit 600.000 so bestimmt, dass die Zellen nach einer Woche eine konfluente Zellmonoschicht gebildet haben und damit für eine neuerliche Passage bereit waren.

3.4.3. Der Mediumwechsel

Das Zellmedium dient wie bereits beschrieben mit seinen Inhaltsstoffen als Nährstofflieferant und schafft damit die lebensnotwendigen Umgebungsbedingungen einer gesunden Zelllinie. Aufgrund eines Nährstoffverbrauchs und des Metabolismus der lebenden Zelle hat ein zeitlich, etwa im Drei-Tagesrythmus, abgestimmter Mediumwechsel zu erfolgen. Bei guter Planung und dem Einhalten der wöchentlichen Subkultivierung ist nur ein Mediumwechsel von einer Passage zur nächsten Passage notwendig. Beim Mediumwechsel wird die Zellkulturflasche gekippt und das verbrauchte Medium vollständig abgesaugt. Im Anschluss daran, ist vorgewärmtes Medium neuerlich im Ausmaß von 20ml den bereits angewachsenen Zellen zuzugeben.

3.4.4. Die Zellpassage

Das Passagieren der Zellen dient der Subkultivierung der Zelllinie. Die CaCo2-Zellen haben, als adhärente Epithelzellen, die Eigenschaft, dass sie eine Zellmonoschicht bilden. Da in der Zellkulturflasche nur eine begrenzte Fläche für das Zellwachstum zur Verfügung steht, muss zur Aufrechterhaltung der Vitalität, Morphologie und Zelleigenschaften bei annähender Konfluenz ein Teil der Zellen entnommen und neu kultiviert werden. Diesen Vorgang der Neukultivierung oder bilden einer Subkultur nennt man Passagieren [73].

Hierfür sind das Ablösen der Zellen von der Oberfläche, die Zellzahlbestimmung und die Neuaussaat notwendig. Zunächst wird das Medium mit einer Akkupette vollständig abgesaugt. Durch das Absaugen von verbrauchtem Medium entsteht biologischer Abfall. Der Abfall, welcher bei mehreren Arbeitsschritt anfällt, ist in ein dafür vorher festgelegtes und bereits geöffnetes Gefäße zu entsorgen. Vor dem Ablösen wird der Zellrasen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung – PBS gewaschen. Dieser Waschschritt wird durchgeführt, um das, für die Zellablösung notwendige Trypsin, durch das verwendete Serum nicht zu neutralisieren [73]. Dazu wird 8ml



vorgewärmtes PBS mehrmals über den Zellrasen gespült und anschließend wieder vollständig abgesaugt. Nun kann 3ml vorgewärmtes Trypsin über den Zellrasen gleichmäßig verteilt und für 3min in den Inkubator gestellt werden. Trypsin wird aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen gewonnen und ist dafür verantwortlich, dass das Adhäsionsprotein Laminin der Extrazellulärmatrix der CaCo2-Zellen enzymatisch dissoziiert wird [73]. Im Anschluss daran, ist eine optische Kontrolle erforderlich, ob sich die Zellen von der Gefäßwand ablösen. Dies lässt sich einfach durch ein wegdriften einzelner Zellen oder Zellbereiche erkennen. Durch ein leichtes und vorsichtiges klopfen des Gefäßes gegen den Handballen kann das Ablösen zusätzlich unterstützt werden. Nun werden rasch 3ml frisches Medium der Zellsuspension zugeführt um die Trypsinreaktion, durch das beinhaltende Serum, zu neutralisieren. Zusätzlich können durch das Abspülen der Oberfläche letzte anhaftende Zellen abgelöst werden. In der Zellsuspension befinden sich nun einzelne Zellen aber auch von der Oberfläche gelöste und zusammenhaftende Zellen. Durch das mehrmalige Resuspendieren der Suspension können diese Zellen getrennt werden. Damit die Zellen für die neuerliche Aussaat vorbereitet und verdünnt werden können, sind diese von dem Trypsin/Zellmediumgemisch mittels der Zentrifuge bei 4000rpm für 3,5min zu trennen. Davor muss noch 10µl, für die Zellzahlbestimmung, aus der Zellsuspension entnommen werden. Die Zellen werden sich nach der Zentrifugation im Zentrifugationsröhrchen abgesetzt haben und der Überstand, sämtliche Flüssigkeit oberhalb des Zellpellets, wird abgesaugt [73].

Als letzten Schritt für die Subkultivierung wird wieder eine 6ml-Suspension hergestellt und entsprechend der Zellzählung (siehe Abschnitt 3.4.5) der volumenmäßig richtige Anteil entnommen. Der entnommene Anteil wird in eine neue Zellkulturflasche eingebracht und mit 20ml frischem und vorgewärmtem Medium aufgefüllt.

3.4.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl ist nicht nur ein wichtiger Schritt bei der Überprüfung der Vitalität und der Zellanzahl der eigenen Zelllinie sondern auch entscheidend bei den durchgeführten Impedanzmessungen. Bei der Messung selbst, sollen nach Möglichkeit alle vermeidbaren Diversitäten, welche das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflussen unterbunden werden.

Bei der händischen Zellzählung kommt ein so genanntes Hämocytometer zum Einsatz. Dazu werden der bereits 10µl entnommenen Zellsuspension nochmals 10µl Trypanblau hinzugegeben. Trypanblau ist ein Azofarbstoff und dringt durch die Membran bereits toter Zellen ein. Dadurch kann mit Hilfe eines Lichtmikroskops eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen getroffen werden. Das verwendete Hämocytometer "C-Chip" vom Neubauertyp lässt eine einfache Zellzahlbestimmung zu. Dazu wird das Zellsuspension/Trypanblaugemisch über eine Pippettenspitze in den C-Chip eingefüllt. Der C-Chip ist einsatzbereit, wenn mit Hilfe der Kapillarkräfte die gesamte Fläche blau ausgefüllt ist. Nun werden gemäß dem Neubauertyp (siehe Abbildung 3.11) die lebenden, nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen, in den vier rot gekennzeichneten 4x4-Quadraten gezählt.



Die richtige Zellzahl (siehe Formel (3.1)) pro ml Suspension ergibt sich nun durch:

$$Zellzahl = \frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \cdot V \cdot K$$
(3.1)
$$Q_1, Q_2, Q_3, Q_4 \dots Zellzahl der Quadrate V \dots Volumen (6ml) der Zellsuspension K \dots Kammerfaktor (104)$$

Mit dem Hämocytometer, als einfaches Hilfsmittel, kann man die Zellzahl bestimmten und durch Entnahme einer entsprechenden Menge Zellsuspension, etwa 600.000 Zellen, die nächste Subkultur aussäen.



Abbildung 3.11: Hämocytometer vom Neubauertyp



3.5. Das Impedanzmesssystem

In diesem Abschnitt wird das Impedanzmesssystem in seiner Gesamtheit vorgestellt. Das Messsystem lässt sich in einzelne Komponenten zerlegen, welches zusammengesetzt ein sehr flexibles und mit breitem Anwendungsgebiet ausgestattetes Gesamtsystem ergeben. Diese Komponenten, welche aus dem Impedanzspektrometer, der Ansteuerungssoftware, der Mikrofluidikversorgung (siehe Abschnitt3.6) und der Auswertungssoftware bestehen, werden vorgestellt. Hier fügen sich alle Teilgebiete der vorliegenden Arbeit, unter anderem die MEA-Chip-Prozessierung, das Zellkultursystem und die Zellkultivierung, zu einem in sich abgeschlossen aber dennoch erweiterbaren Projekt zusammen.

3.5.1. Das Impedanzspektrometer - SCIOSPEC ISX-3

Bei dem verwendeten Impedanzspektrometer (siehe Abbildung 3.12) handelt es sich um das (Firma Sciospec Scientific Instruments GmbH) [77]. SCIOSPEC ISX-3 Mit diesem Impedanzspektrometer ist eine Zweipunktmessung möglich, wobei eine individuelle und situationsangepasste Konfiguration der Parameter realisiert werden kann. Sciospec Scientific Instruments stellt eine Software zur Konfiguration und Impedanzanalyse bereit. Jedoch wurde aufgrund des erforderlichen kontinuierlichen Messvorgangs eine eigenständige Mess- und Steuerungssoftware mittels LabView entwickelt (siehe Abschnitt 3.5.3) [59]. Eine Impedanzanalyse kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Zum einen kann ein Elektrodepaar über zwei BNC-Buchsen angesteuert werden. Dies ist eine sehr einfache aber für einen kontinuierlichen Messvorgang mit 4 bzw. 8 Elektrodenpaare eine wenig praktikable Variante. Zum anderen kann mit dem Sciospec Extension Port ein erhältliches MEArack (siehe Abbildung 3.13) zum Einsatz kommen. Mit diesem MEArack können sequentiell 60 Kontakte angesteuert werden, welche ein individuell angepasstes Elektrodendesign ermöglichen.



Abbildung 3.12: Foto des Sciospec ISX-3



Das Impedanzspektrometer kann einen Frequenzbereich von 100mHz bis zu 10MHz bei einem Impedanzwertebereich von 50m Ω bis 1G Ω abdecken. Die Messwerte erreichen dabei Genauigkeiten von bis zu 0,05%. Des Weiteren kann die aktiv angelegte Wechselspannung Amplitudenwerte \hat{U} von 0,1mV bis 250mV bei einer Auflösung von 0,1mV abdecken.

3.5.2. Sciospec MEArack

Das Sciospec MEArack (siehe Abbildung 3.13) dient zur sequentiellen Ansteuerung von 60 Kontakten, ausgeführt als Federkontaktstifte [78]. Das Design des MEArack's liegt dem MEA60 Biochipstandard von Multichannel Systems zugrunde. Damit sind wie in Abbildung 3.14 ersichtlich, die 60 Kontaktierungsfelder der entwickelten MEA-Chips in ihrer Größe und Position auf der 49mmx49mm Grundfläche, fest vorgegeben. Die Kontaktierungsfelder sind bei dem MEArack in zwei Gruppen (grün, gelb) unterteilt [78]. Diese Einschränkung ist für das Elektrodendesign von essenzieller Bedeutung, da nur eine Messung zwischen einem grünen und einem gelben Feld möglich ist. Mit diesem Wissen ergeben sich die in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 dargestellten und symmetrisch angeordneten Zuleitungen zu den jeweiligen Elektroden. Der gefertigte Zellsensor wird zur Befestigung in die dafür vorgesehene Ausnehmung platziert und das MEArack arretiert. Damit ist sichergestellt, dass die Kontaktierungsfelder exakt zu den Federkontaktstiften ausgerichtet sind. Zusätzlich zur elektrischen Messung kann der Messverlauf, mit einem Mikroskop, über ein oben- und untenliegendes Sichtfenster optisch verfolgt werden.



Abbildung 3.13: Foto des MEAracks



3.5.3. Mess- und Steuerungssoftware

Die Ansteuerungssoftware dient als Kommunikation zwischen dem Impedanzspektrometer und einem PC. Als Schnittstelle für den Datentransfer verfügt das Sciospec ISX-3 über eine USB-Verbindung. Für die Initialisierung des Impedanzspektrometers wird die mitgelieferte Software in den Servermodus versetzt. Damit stellt die Software eine Verbindung zu Verfügung und bestätigt dies durch die Angabe der Seriennummer und den verwendeten COM-Port. Damit kann die in der Programmiersprache Labview geschriebene Software gestartet werden [59].

Bevor eine Impedanzmessung gestartet werden kann, sind alle nötigen Parameter in die Bedienfelder "Einstellungen" und "erweiterte Einstellungen" (siehe Tabelle 3.5) einzufügen. Nach dem Messungsstart, müssen der Software jene Elektrodenpaarungen bekannt gegeben werden, welche dem verwendeten MEA-Chipdesign entsprechen. Danach ist eine, für die vorliegende Messungen, bereits erstellte Kalibrationsdatei zu laden. Dabei ist zu beachten, dass die Reihenfolge der Elektrodennummernauswahl mit der Elektrodenpaarungen der Kalibrationsdatei korreliert. Diese Kalibrationsdatei ist im Vorhinein, mithilfe der mitgelieferten Software, zu erstellen.



Abbildung 3.13: Grafische Oberfläche der Mess- und Steuerungssoftware







Abbildung 3.14: Grafische Oberfläche der Messelektrodenauswahl

3.6. Mikrofluidikversorgung

Für die kontinuierliche Versorgung des geschlossenen Mikrofluidiksystems (siehe Abschnitt3.2.2) wird eine externe Steuerung vorgesehen. Hierzu bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, welche im Weiteren zur Sprache kommen werden.

Die einfachste Möglichkeit besteht in der manuellen Zugabe von Zellmedium über Silikonschläuche und Spritzen. Diese Variante eignet sich jedoch nur bedingt, da zum einen kein anhaltender Mediumfluss zustande kommen kann und zum anderen manuell kein kontinuierlicher Durchfluss möglich ist. Bei zu hohen Flussraten, welche manuell zustande kommen, kann die Zellschicht beschädigt werden. Das Messergebnis kann aufgrund abgelöster Zellen verfälscht werden.

Eine gut geeignete Möglichkeit der Zellversorgung besteht in der Verwendung einer extern betriebenen Pumpe. Solche Pumpen gibt es in unterschiedlichen Bauformen wie z.B. Peristaltikpumpen oder Spritzenpumpen. Die Peristaltikpumpe leitet Flüssigkeiten in einem flexiblen Schlauch durch wiederholendes Quetschen fort. Dies geschieht bei einer radialen Bauweise über einen Rotor und Rollen, welche den Schlauch quetschen. Mit dieser Bauweise kann man ein weites Spektrum an Flussraten abdecken. Jedoch kommt aufgrund der Funktionsweise kein präziser Fluss zustände. Dies ist für sehr kleine Volumina im µl-Bereich und hochpräzisen Flussraten bis in den nl/min-Bereich ein Nachteil.

Dieser Nachteil kann mit einer hochpräzisen Spritzenpumpe, wie der zum Einsatz kommenden KDS Legato 110 (siehe Abbildung 3.15) ausgeglichen werden [79]. Die Spritzenpumpe überspannt einen Flussratenbereich von 1.26pl/min bis zu 88,32ml/min bei verwendbaren Spritzengrößen von 0,5µl bis 60ml. Diese Leistungsspezifikationen eignen sich in Verbindung mit den geforderten präzisen Flussraten, für das bereits vorgestellte geschlossene Mikrofluidiksystem, hervorragend. Die Einstellungen sind über einen Touchscreen bedienbar aber auch extern über eine USB-Verbindung steuerbar. Vor der Inbetriebnahme müssen einige Parameter der Pumpe bekannt gegeben werden. Dies sind unter anderem die Pumprichtung, die verwendete Spritzengröße, ein Zielvolumina und vorallem die gewünschte Flussrate.





Abbildung 3.15: Spritzenpumpe KDS Legato 110

Eine Anforderung an das Gesamtsystem war eine PC-gesteuerte Bedienung und Überwachung. Demzufolge wurde eine Software entwickelt, welche die Spritzenpumpe steuern kann. Diese Steuerungssoftware wurde in Matlab verfasst. Damit eine einfache Bedienung gewährleistet werden kann, wurde ein grafische Oberfläche (siehe Abbildung 3.16) erstellt. Mit dieser Oberfläche wird eine einfache Kommunikation zwischen Anwender und der Spritzenpumpe bereitgestellt. Zunächst muss dem Programm der entsprechende USB-Port bekannt gegeben werden, damit eine Verbindung zur Spritzenpumpe hergestellt werden kann. Diese Konfiguration muss bei der Erstinbetriebnahme eingestellt und kann fortan beibehalten werden. Bei jedem Start der Software wird zunächst der Pumpenstatus abgefragt und die Parameter im Bereich "Settings" dargestellt. Diese Abfrage ist notwendig, damit der User über alle Parameter in Kenntnis gesetzt wird. Beim erstmaligen Aufruf befindet sich die Pumpe in einem Wartezustand und quittiert dies durch die Darstellung "stop and wait". Des Weiteren werden die Parameter Infuserate, Withdrawrate, Spritzengröße und das Volumen in der Spritze dargestellt. Generell wird bei der Änderung eines Parameters das "Setting"-Feld aktualisiert. Damit ist der Zustand der Spritzenpumpe zu jedem Zeitpunkt bekannt.





Abbildung 3.16: Grafische Oberfläche der Steuerungssoftware für die Spritzenpumpe

Eine Unterscheidung der Spritzengröße und den Volumen ist notwendig, da unterschiedliche Spritzen differierende Spritzendurchmesser haben. Damit die Pumpe die korrekte Flussrate bereitstellen kann, muss dies der Spritzenpumpe bekannt gegeben werden. Die Wahl der Spritzengröße ist über ein Popupmenü auf vier Standardgrößen 2ml, 5ml, 10ml und 20ml beschränkt. Diese eingeschränkte Wahl vereinfacht dem Anwender die Bedienung, da nur die Größenauswahl zur Verfügung steht, der Spritzendruchmesser aber nicht bestimmt werden muss. Über die Volumeneingabe wird zum einen der Pumpe bekannt gegeben, welche Volumenmenge zur Verfügung steht und zum anderen berechnet die Software einen Endzeitpunkt an dem das Volumen verbraucht ist. Dieser Endzeitpunkt wird von der Software bestimmt und im Feld "Ending" dargestellt.

Da die Pumpe einen Flussratenbereich von pl/min bis ml/min abdeckt, erfolgt die Eingabe der Infuserate und der Withdrawrate über zwei getrennte Felder. Zunächst wird eine Wahlmöglichkeit der gebräuchlichsten Einheiten (nl/min, μ l/min, ml/min) bereitgestellt. Des Weiteren hat eine Eingabe eines Zahlenwertes zu erfolgen.

Wenn alle Eingaben getätigt wurden, kann die die Spritzenpumpe mit den Knöpfen "Infuse" und "Withdraw" gestartet werden. Als Programmanforderung stellt der "Stop"-Button eine wichtige Funktion dar, da die Software damit zu jedem Zeitpunkt gestoppt werden kann. Bei einer Unterbrechung z.B. durch einen Mediumswechsel in Form eines Spritzentauschs kann die Software über das erneute drücken des "Infuse"- oder "Withdraw"-Buttons wieder gestartet werden.



3.7. Standardprozedur einer Impedanzmessung

In den vorangegangen Abschnitten des 3.Kapitels - Experimentelle und analytische Entwicklung wurden sämtliche Fertigungsschritte, technische und biologische Komponenten sowie die verschiedenen Ansteuerungssoftwares vorgestellt. Diese Arbeitsgebiete lassen eine getrennte Betrachtungsweise für jeden Teilabschnitt zu und ergeben zusammengesetzt ein komplexes Zusammenspiel der unterschiedlichen wissenschaftlichen Forschungsbereiche. Dieser Abschnitt stellt einen roten Leitfaden durch die vorliegende interdisziplinäre Arbeit dar. Zu Beginn stellt die Abbildung 3.17 einen Überblick über das gesamte Messsystem dar. Es beinhaltet den biologischen Bereich des Zellsensors im Inkubator. Das Impedanzspektrometer führt die Messung durch, wird von der Steuerungssoftware aus bedient und stellt die gemessenen Daten der Messsoftware zu Verfügung. Des Weiteren versorgt die Spritzenpumpe die CaCo2-Zellen mit Medium und wird ihrerseits von der eigens entwickelten Mikrofluidiksoftware gesteuert. Damit stellt der PC eine ideale Schnittstelle für eine kontinuierliche Langzeitmessung und einem online-monitoring dar.



Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des Messsystems und der Mikrofluidikversorgung.

Für den Erfolg einer Langzeitmessung sind einige Vorbereitungsschritte notwendig. Zunächst muss der MEA-Chip gefertigt und das entsprechende Zellkultursystem aufgesetzt werden. Diese Fertigungsschritte erfolgen unter nicht sterilen Bedingungen und ergeben den Zellsensor. Deshalb muss der Zellsensor binnen weniger Stunden nach dem Plasmaveraschen autoklaviert und im Anschluss daran das Zellkultursystem mit eine NaCl-Lösung befüllt werden. Die Befüllung des Zellkultursystems bis zur Aussaat der CaCo2-Zellen ist notwendig, da die Hydrophilität (siehe Abschnitt 2.4.4)des Gesamtsystems aufrecht erhalten werden muss.

Wenn bei der geplanten Messung die Spritzenpumpe zum Einsatz kommen soll, sind alle benötigten Komponenten wie Silikonschläuche, Kanülen und Abfallbehälter zusätzlich zu autoklavieren.



Der entwickelten Mess- und Steuerungssoftware des Impedanzspektrometers sind vor dem Messungsstart alle festgelegten Parameter über die Bedienfelder "Einstellungen" und "erweiterte Einstellungen" bekannt zu geben (siehe Abbildung 3.13). Die messungsrelevanten Parameter sind in Tabelle 3.5 festgehalten und stellen, bis auf explizite Erwähnung, die bei den Impedanzmessungen verwendeten Werte dar. Mithilfe dieser Werte muss das Sciospec ISX-3 kalibriert werden. Es hat sich als sinnvoll erwiesen die Kalibration vor der eigentlichen Messung durchzuführen und als eigene Kalibrationsdatei abzuspeichern. Auf diese Kalibrationsdatei kann in weiterer Folge zugegriffen werden.

Startfrequenz	100Hz
Endfrequenz	1Mhz
Anzahl der Messpunkte	100
Messamplitude	100mV
Wartezeit [min]	45
Impedanzbereich	megaohm
Frequenzauflösung	< 10MHz
Präzision	1
Anzahl der Wiederholungen	1
logScale	log

Tabelle 3.5: Parameter der Langzeitmessung

Für die Einsatzbereitschaft der Spritzenpumpe ist lediglich eine Kommunikation zwischen Pumpe und Mikrofluidiksoftware herzustellen in dem das Matlabprogramm gestartet wird. Die Eingabe der Parameter (siehe Tabelle 3.6) kann unabhängig von der Messung erfolgen und ist damit sehr flexibel einsetzbar. Die angegeben Werte sind Standardparameter, welche bei der Mikrofluidikmessung zum Einsatz kommen. Bei einer Flussrate von 4µl/min und dem verwendeten Volumen von 10ml ist die Spritzenpumpe bei kontinuierlichem Einsatz für 41h ohne Spritzenwechsel einsatzbereit [80], [81], [82]. Diese Zeitspanne eignet sich hervorragend um einen wiederkehrenden Zyklus des Spritzenwechsels von 1,5 Tagen mit einer optischen Kontrolle der Zellkultur zu verbinden.

Infuse-Flussrate	4µl/min	
Spritzengröße	10ml	
Spritzenvolumen	10ml	
Tabollo 2 6: Paramotor dor Spritzonnumpo		

Tabelle 3.6: Parameter der Spritzenpumpe

Nachdem alle Vorbereitungen getroffen wurden, kann mit der Aussaat der Zellen begonnen werden. Dazu werden in Zellkulturkammer 1,2 und 3 je 20000 Zellen pro 160ml Medium ausgesät und in Zellkulturkammer 4 160ml Medium als Referenzwert zugegeben und mit einem Glasdeckblatt verschlossen (siehe Abbildung 3.14). Der Zellsensor wird mit dem geschlossenen MEArack an das Sciospec ISX-3 angeschlossen und in den Inkubator gestellt. Danach kann die Messung gestartet werden, indem die Elektrodenauswahl entsprechend dem MEA-Design und der



zugehörigen Kontaktierungsfeldnummer erfolgt (siehe Abbildung 3.14). An dieser Stelle ist die zuvor erstellte Kalibrationsdatei für die vorliegende Messung zu laden.

Das Impedanzspektrometer misst gemäß der Wartezeit im Abstand von 45min jedes einzelne IDES-Elektrodepaar auf dem Zellsensor im gewählten Frequenzbereich. Die analysierten Messwerte werden in der Mess- und Steuerungssoftware in einem tdms-File abgespeichert. Mit dem, von National Instruments (<u>http://www.ni.com/white-paper/3727/de</u>) entwickelten, tdms-Dateiformat können elegant große Datenmengen verarbeitet werden. Diese Daten lassen sich im Nachhinein in Programme wie Microsoft Office Excel oder Matlab auswerten. Eine Anforderung an das Messsystem ist eine möglichst kurze Einzelmessung ohne, dass der Messwertbereich bzw. die Frequenzauflösung an Aussagekraft verlieren. Demzufolge wurde ein Frequenzbereich von 100Hz-1MHz bei einer Auflösung von 100 Messwerten gewählt. Mit diesen Vorgaben wird eine Einzelmessung in 85s bei dem IDES-4-Elektrodenpaardesign und in 170s bei dem IDES-8-Elektrodenpaardesign abgearbeitet [59]. Diese Messzeit ist für ein kurzes Messzeitintervall, welches bei einer Bromelainmessung benötigt wird, ausreichend um genügen Daten zu erhalten.

Nach einem Zeitraum von zwei bis drei Tagen muss, für ein gesundes Zellwachstum, ein Mediumwechsel durchgeführt werden, da die Inhaltsstoffe von den Zellen verstoffwechselt wurden. Bei einem Mediumwechsel wird die Messung nach einer Messwertaufnahme unterbrochen und unter dem LaminarFlow kann die Zellkultur geöffnet werden. Im Zuge dieses Vorgangs wird neben der elektrischen Messung und Datenauswertung eine optische Kontrolle mit einem Inversionsmikroskop durchgeführt. Diese optische Kontrolle dient als zusätzliche Überprüfung und Dokumentation.


4. Resultate und Diskussion

Entsprechend der Zielsetzung (siehe Abschnitt 1.2) werden im Resultateteil die Fragestellungen über die Regenerationsfähigkeit und die Permeabilitätsänderungen unter Einfluss des Permeation Enhancers Bromelain einer Zellmonoschicht untersucht. Zusätzlich wird ein Vergleich der beiden Elektrodenpaardesigns (siehe Abschnitt 3.1.3) dargestellt. Das gesamte Kapitel ist, nach der Vorgabe für eine Impedanzmessung (siehe Abschnitt 3.7), in Einzelmessungen gegliedert. Zu Beginn soll das Resultat des gedruckten PDMS-Masters präsentiert werden. Den Schlussabschnitt bildet eine Charakterisierung der implementierten Mikrofluidikversorgung.

4.1. Verwendbarkeit des gedruckten PDMS-Masters

In der vorliegenden Arbeit wurde das 3D-Druckverfahren Fused Deposition Molding (siehe Abschnitt 3.2.2.2) als Alternative zur Soft Lithographie näher untersucht. Dabei stellte der nicht homogene Schichtaufbau und die damit resultierende raue Masteroberfläche ein nicht überwindbares Problem für ein dichtes Mikrofluidiksystem dar (siehe Abbildung 4.1). Des Weiteren hat das verwendete ABS den Nachteil, dass es für Temperaturen von bis zu 150°C/10min für das PDMS-Härten nicht ausgelegt ist. Aus diesem Grund musste die Temperatur auf 70°C für 1 Stunde reduziert werden.

Schlussfolgernd liegt der große Vorteil des Rapid-Prototypings klar auf der Hand, jedoch kann über die zu geringe Widerstandsfähigkeit bzw. zu geringe Auflösung des Verfahrens nicht hinweggesehen werden. Damit scheinen diese beiden Verfahren in Verbindung mit den getesteten Modellen für ein Mikrofluidiksystem nicht zielführend zu sein und wurden daher in der vorliegenden Arbeit nicht weiter in Betracht gezogen.



Abbildung 4.1: gedruckter PMS-Master



Elektrische Charakterisierung der Zellschicht 4.2. während einer mechanischen Beeinflussung

Die folgende Impedanzmessung beschreibt das elektrische und optische Verhalten einer CaCo2-Zellschicht im Zuge einer Läsion. Nachdem sich durch Proliferation eine konfluenter Zellschicht gebildet hat wurde dieser Schicht mit einem scharfkantigen Kratzer ein mechanischer Schaden zugeführt. Das Ziel dieser Langzeitmessung ist die Beobachtung des Zellwachstums nach einer Zellläsion und die Neubildung einer konfluenten Zellschicht. Dieses Experiment kann Hinweise auf das Ausheilen einer Verletzung liefern.

Zelllinienherkunft	Institut für Festkörperelektronik
Elektrodenpaare	4
Zellmedium	MEM
Zellentyp	CaCo2
Passage	23
Zelldichte bei Aussaat	20000 Zellen/160μl
Taballa 4.1: Parameterübersicht 1. der messungsspezifischen Daten	

Tabelle 4.1: Parameterübersicht 1 der messungsspezifischen Daten

Die Messung beginnt mit der Aussaat der Zellen. Hierzu werden je 20000 Zellen in drei der vier Reservoirs ausgesät. Das vierte Reservoir liefert einen Referenzwert ohne Zellen. Die Aussaat findet unter sterilen Bedingungen in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank statt. Für ein gutes Zellwachstum in-vivo wurden die Zellen in einen Inkubator (Temperatur 37°C, Luftfeuchtigkeit 95%, CO₂-Gehalt 5%) gebracht. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Langzeitmessung gestartet. Der erste gemessene Wert wird als Referenzwert herangezogen und auf 100% gesetzt, damit wird das Zellwachstum in den unterschiedlichen Reservoirs vergleichbar.

Abbildung 4.2 zeigt einen Gesamtüberblick über den Messungsverlauf für alle vier Zellkulturkammern. Hier wurde die Darstellungsweise eines Konturdiagrammes (x-Achse: Zeit, y-Achse: Frequenz, z-Achse: farbige Impedanzdarstellung) gewählt, welche einen sehr guten qualitativen Eindruck über die Impedanzänderung während der gesamten Messung wiedergibt. In den ersten zwei Stunden setzten sich die im Medium verteilten Zellen auf den Boden des Reservoirs ab. Daher sind die Messwerte der Zellkulturen 1 - 3 in der ersten Messperiode in der Größenordnung der Messwerte des Vergleichmediums, da auch in den Zellkulturen die Impedanzwerte durch das Medium begründet sind. Sobald sich die Zellen auf den IDES-Elektroden abgesetzt haben, beginnen sich diese an der Elektroden-Oberfläche anzuheften und auszubreiten. Ein gutes Zusammenspiel aus Zellzahl und Zellvitalität bedingt in allen drei Zellkulturen einen Anstieg der Impedanz innerhalb eines Tages. Der Impedanzanstieg ist vorallem in Frequenzbereichen f1= 10kHz bis über f2=100kHz messbar, wobei ein absolutes Maximum in Zellkultur1 von 184,33% nach 20,1h bei 90kHz auftritt. Die Messwerte in diesem Frequenzbereich repräsentieren Vorgänge aufgrund der α - und β -Dispersion [21] (siehe Abschnitt 2.2.2). Bei einem Frequenzbereich von 100Hz bis 4kHz kann man hingegen kein Zellwachstum aufgrund eines Impedanzanstieges bestimmen. Auch bei hohen Frequenzbereichen ab 700kHz liegt der Impedanzanstieg bei maximal 120%. Aufgrund der höheren Signifikanz wird im Folgenden vor allem auf Frequenzen im Bereich von 10kHz bis 300kHz näher eingegangen.



Wie bereits erwähnt kann ein Impedanzmaximum im Frequenzbereich von 10kHz bis 300kHz nach etwa einem Tag in allen Zellkulturen beobachtet werden. Nach dem ersten Tag konnte mit fortschreitender Zeit wieder eine Impedanzabnahme auf 150-160% in allen drei Zellkulturen festgestellt werden. Die Abnahme könnte durch die schnelle Verstoffwechselung des Mediums in der frühen Proliferationsphase der Zellen bedingt sein. Daher wurde bereits am zweiten Tag ein Mediumwechsel (M1) durchgeführt. Der Mediumwechsel wird an allen Elektrodenpaaren, durch einen starken Impedanzanstieg und einen darauf folgendem Impedanzabfall, begleitet. Am Tag 4 der Langzeitmessung weisen die Messwerte der Zellkulturen konstante Werte auf. Die Stabilität der Messwerte wird auf eine konfluente Zellschicht oberhalb der Elektrodenpaare zurückgeführt. Die Konfluenz der Zellschicht konnte auch optisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3-b).



Abbildung 4.2: Spektraldarstellung 1 der normierten Impedanzänderung von Zellschichten mit eingebrachter Läsion am Tag 4 (Bild a-c) und dem Zellmedium (Bild d). Die Zeitpunkte M1 – M5 zeigen die Medienwechsel an.

Da die Konfluenz elektrisch als auch optisch nachgewiesen werden konnte, wurde dem Anfangs besprochenen Ziel dieser Messung, eine mechanische Beschädigung der Zellschicht quer zu den IDES-Elektroden eingebracht (siehe Abbildung 4.3-c). Die Läsion erstreckt sich orthogonal über die gesamte Elektrodenbreite. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen untereinander eine stärkere Adhäsion aufweisen als zur Elektrodenoberfläche. Dadurch entstand eine großflächige Beschädigung der Zellschicht von etwa 60%. Diese mechanische Beschädigung ist sehr gut in allen drei Zellkulturen durch einen starken Impedanzabfall erkennbar. Im folgenden Verlauf (Tag 4 bis Tag 15) beginnt sich die Läsion langsam zu schließen, wobei weitere punktuelle Medienwechsel (M2-M5) folgen. Ab dem 18.Tag erreichen die Messwerte wieder konstante Werte. Dies konnte optisch durch eine erneute konfluente Zellschicht bestätigt werden.



Abbildung 4.3: Detailansicht 1 der Spektraldarstellung der Zellkultur2: (a-d) optischer Verlauf des Wachstums der Zellkultur; (e) Spektraldarstellung der normierten Impedanzänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (f) Phasendarstellung der normierten Phasenänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (g) Zeitlicher Verlauf der Impedanzkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=10kHz, f2=50kHz, f3=100kHz, f4=300kHz); (h) Zeitlicher Verlauf der Phasenkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=10kHz, f2=50kHz, f3=100kHz, f4=300kHz); (i) Frequenzgang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=0d; t2=3d 20,5h; t3=3d 21,2h; t4=19d 23,4h); (j) Phasengang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=0d; t2=3d 20,5h; t3=3d 21,2h; t4=19d 23,4h).



Für eine genauere Analyse einer Zellkultur wird exemplarisch die Zellkultur 2 herausgegriffen und im Folgenden näher beschrieben. Die Zellen werden zum Zeitpunkt t1=0d ausgesät (Abbildung 4.3-a). Die in Abbildung 4.2 berechneten Impedanzänderungen beziehen sich auf diesen Startwert, um im Falle der Impedanz ein Quotientenspektrum (Abbildung 4.3-e) und im Falle der Phase ein Differenzenspektrum (Abbildung 4.3-f) zu erhalten. Bis zum ersten Mediumwechsel, nach etwa 2 Tagen, erkennt man in der Impedanzdarstellung (Abbildung 4.3-g) in einem großen Frequenzbereich f1=10kHz bis f4=300kHz einen starken Anstieg der Impedanz. Dieser Anstieg korreliert mit dem Wachstum und Teilung der Zellen.

In der Phasendarstellung (Abbildung 4.3-f) ist ebenfalls eine Abweichung zum Anfangswert bei unterschiedlichen Frequenzen festzustellen. Jedoch ist die Vorzeichenrichtung der Phasenänderung nicht einheitlich. Bei den Frequenzen f1=10kHz und f2=50kHz wird mit zunehmender Zeit die Phase positiver im Vergleich zum Ausgangswert. Im Falle der Frequenz f3=100kHz wird die Phase zunächst negativer um nach etwa einem Tag positive Werte anzunehmen. Bei hohen Frequenzen f4=300kHz wird die Phase hingegen stark negativ. Die Frequenzbereiche ab f2=50kHz fallen in den Bereich der β-Dispersion und spiegeln damit den Einfluss der Zellwände wieder. Diese Werte sind in der Phasendarstellung (Abbildung 4.3-f) durch einen dunkelblauen Bereich deutlich abgegrenzt. Wobei sich kein konstantes Maximum abzeichnet, sondern die Werte zu höheren Frequenzen, bis 1MHz, weiter abnehmen.

Ab dem Zeitpunkt t2=3d 20,5h (Abbildung 4.3-b) bilden die Zellen eine konfluente Zellschicht. Dies konnte auch optisch bestätigt werden. Die Konfluenz zeigt in Abbildung 4.3-e (dunkelgelber Bereich) und Abbildung 4.3-i gegenüber anderen Zeitpunkten einen ausgedehnten maximalen Impedanzwertebereich bei Frequenzen von 100kHz bis 600kHz. In der Phasendarstellung und Phasengang (Abbildung 4.3-f und Abbildung 4.3-j) erstreckt sich hingegen ein Plateau konstanter Werte im Frequenzbereich von 1kHz bis 100kHz. Das heißt sowohl ein konstanter Wertebereich der Impedanz als auch der Phase bei unterschiedlichen Frequenzen über einen Zeitraum von einigen Stunden weisen auf eine konfluenten Zellschicht hin.

Zum Zeitpunkt t3=3d 21,2h wurde gemäß der Versuchsreihe der konfluenten Zellschicht ein mechanischer Schaden in Form einer Läsion zugeführt (Abbildung 4.3-c). In der Impedanzkurve und im Frequenzgang kann die Läsion durch einen starken Impedanzabfall über den gesamten Frequenzbereich charakterisiert werden. In der Phasendarstellung und im Phasengang zeigen sich hingegen eine starke Abnahme bei Frequenzen unterhalb von 10kHz und eine Zunahme der Phase in einem Frequenzbereich von 10kHz bis 100kHz. Mit den Informationen des Impedanzabfalls und der Änderung der Phase in unterschiedlichen Frequenzbereichen, kann allgemein eine morphologische und physiologische Veränderung der Zellschicht erkannt werden. Bei dieser Langzeitmessung kann die Läsion damit durch ein elektrisches Messverfahren detektiert werden.

Wie auch schon in Abbildung 4.2 gezeigt wurde folgen, im Abstand von etwa drei Tagen, mehrere Medienwechsel. Diese Medienwechsel können sowohl in der Impedanzdarstellung also auch in Phasendarstellung anhand starker Wertänderungen detektiert werden. Der Wertebereich der Impedanzdarstellung, um ein Zellwachstum anhand eines Impedanzanstieges charakterisieren zu können, verschiebt sich nach der Zellläsion in Richtung höherer Frequenzbereiche. Das Plateau, dass sich in der Phasendarstellung vor der Zellläsion gebildet hat (t= 2 - 4d), zeigt sich abermals im selben Frequenzbereich, wobei hier höhere Phasendifferenzen erreicht werden. Das Abschlussbild Abbildung 4.3-d, zum Zeitpunkt t4= 19d 23,4h, zeigt nach der Läsion wieder eine konfluente



Zellschicht. Damit konnte sowohl elektrisch als auch optisch das erneute Zusammenwachsen der Zellschicht nach der Läsion nachgewiesen werden.



Abbildung 4.4: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 2 vor und nach der Zellläsion. Dargestellt sind (a) der Absolutwert der Impedanz, (b) der Phase, (c) der Resistanz und (d) der Reaktanz. (e-h) zeigt die zeitliche Entwicklung der Ortskurve.



Die getrennte Darstellungsweise der Impedanzdarstellung und der Phasendarstellung wurde bereits in Abbildung 4.3 abgebildet und der Informationsgehalt genau erläutert. Mit den Messwerten der Impedanz und Phase ist jedoch auch eine Analyse des Verhaltens der Langzeitmessung mit Hilfe des Real- und Imaginärteils sowie in der komplexen Ebene möglich. Die Auftrennung des Systems in Real- und Imaginärteil, die Darstellung in der komplexen Ebene und den sich damit ergebenden neuen Informationsgehalt soll im Folgenden besprochen werden.

In Abbildung 4.4-a ist der Verlauf der absoluten Messwerte des Impedanzspektrums für Zellkultur 2 im Vergleich zum Medium bei 300kHz abgebildet. Hierbei erkennt man sowohl in der Zellkultur als auch bei dem Medium die einzelnen Medienwechsel in Form rascher Impedanzanstiege. Betrachten wir nun das Verhalten des Mediums ohne Zellen. Über die gesamte Langzeitmessung (t1 bis t5) nehmen die Messwerte des Mediums stetig um insgesamt 13,9% ab. Dies deutet auf sich veränderte Bedingung auf der Elektrodenoberfläche hin. Mit dieser Annahme kann auch begründet werden, dass der Wert der konfluenten Zellschicht vor der Läsion (t2) um 13,6% höher liegt, als die erneute konfluente Zellschicht zum Messungsende (t5). Zum Unterschied erreicht die Phase im realen Phasenspektrum (Abbildung 4.4-b) unabhängig von den Medienwechseln oder der Zellläsion nach etwa 5 Tagen einen konstanten Wert von etwa $\phi(t,f) = -7^{\circ}$. Betrachten wir nun vergleichsweise das elektrische Verhalten von Zellkultur 2. Es lässt sich auch im realen Phasenspektrum der Zellkultur eine Veränderung der Bedingungen erkennen. Das heißt, es ist sowohl ein Wachstum in Form einer Phasenabnahme als auch die Zellläsion in Form einer Phasenzunahme erkennbar. Hingegen bei Konfluenz der Zellschicht erreicht die Phase sowohl vor der Läsion (t2) als auch am Messungsende (t5) einen konstanten Wert, welcher im Bereich des Ausgangswerts liegt.

Im Realteil (Abbildung 4.4-c), welcher den rein ohmschen Charakter des Systems widerspiegelt, erkennt man abermals das Zellwachstum, die Läsion und die einzelnen Medienwechsel. Hier ist die Messwertänderung im Vergleich zu der Messwertänderung der komplexen Impedanz (Abbildung 4.4-a) nicht so stark ausgeprägt. Dies erzeugt jedoch, bezogen auf die Zellkonfluenz, für die Interpretation der Ergebnisse aussagekräftige Resultate. Im Imaginärteil (Abbildung 4.4-d) zeigt sich hingegen die Tendenz einer Bedingungsänderung in der Zellkultur in Form des Wachstums oder der Läsion noch ausgeprägter. Die Darstellung in Abbildung 4.4-d zeigt, dass Änderungen im Imaginärteil sensitiver erkannt werden können als bei reiner Betrachtung der Phase.

Die Darstellung der komplexen Ebene lässt eine weiter interessante Betrachtungsweise zu. Das Medium verändert zu Beginn der Messung (Abbildung 4.4-e) den Imaginärteil sehr stark, hingegen verändert sich der Realteil über die gesamte Langzeitmessung (Abbildung 4.4-h) nur geringfügig. Damit lässt sich allgemein das Medium als eine Kurve mit starker Imaginärteiländerung bei konstantem Realteil charakterisieren. Bei der Zellkultur ändern sich zu Beginn der Messung sowohl die Realteilwerte als auch die Imaginärteilwerte stark. Wobei die Änderung des Realteils auf ein Wachstum zurück zu führen ist. Bei zunehmender Konfluenz erreicht der Realteil konstante Werte, welche sich als paralleler Verlauf zur Imaginärachse widerspiegeln. Die Zellläsion verläuft gegengleich zum Zellwachstum, indem eine starke Änderung des Real- und Imaginärteils auftritt. Das erneute Zellwachstum und die Medienwechsel erkennt man durch wiederholenden Anstieg und Abfall der Zellkulturkurve (Abbildung 4.4-f bis Abbildung 4.4-g). Als entscheidenden Indikator einer konfluenten Zellschicht kann in Abbildung 4.4-h die Angleichung des Imaginärteils auf den Ausgangswert und ein damit verbundenes Gleichgewicht des biologischen Systems charakterisiert werden.



4.3. Elektrische Charakterisierung der Zellschicht während einer chemischen Beeinflussung

Mit der kontinuierlichen Langzeitmessung soll der Einfluss chemischer Substanzen, die auf die Permeabilität der CaCo2-Zellschicht einwirken, untersucht werden. Von Bromelain ist bekannt, dass es auf die Tight Junctions einwirkt (siehe Abschnitt 2.3.5). Die Untersuchung wird mit einer parallelen Analyse der Impedanzspektroskopie und einer optischen Kontrolle durchgeführt. Die Langzeitmessung beginnt wiederum mit der Aussaat der Zellen in drei der vier Zellkulturreservoirs. Das Verhalten der Zellen wird zunächst über mehrere Tage elektrisch und optisch bis zu einer konfluenten Zellschicht beobachtet. Im Anschluss an eine konfluente Zellschicht erfolgt die Zugabe des chemischen Stressors. Mit dieser Messung soll zum einen die Sensitivität der Impedanzspektroskopie gezeigt und zum anderen der Einfluss von Bromelain auf die Zellschicht quantitativ erfasst werden.

Zelllinienherkunft	Pharmaziezentrum der Universität Wien
Elektrodenpaare	4
Zellmedium	RPMI 1640
Zellentyp	CaCo2
Passage	43
Zelldichte bei Aussaat	20000 Zellen/160μl
Bromelainkonzentration	30µg/160µl

Tabelle 4.2: Parameterübersicht 2 der messungsspezifischen Daten

Die Messung beginnt mit der Aussaat von je 20000 Zellen in jedes der Zellkulturreservoirs eins bis drei. Das vierte Reservoir bleibt frei von Zellen und dient als Referenzmessung, indem reines Medium über den gesamten Zeitverlauf gemessen wird. Damit die CaCo2-Zellen unter idealen Bedingungen kultiviert werden können, erfolgt die Messung in einer Inkubatorumgebung.

In Abbildung 4.5 ist ein Konturdiagramm dargestellt, welches einen Gesamtüberblick über die gesamte Langzeitmessung gibt. Dabei wird auf der x-Achse die Zeit, auf der y-Achse die Frequenz aufgetragen. Die z-Achse stellt die Impedanz dar und ist in Form einer Farbskala dargestellt.

Zunächst erkennt man innerhalb des ersten Tages nach der Aussaat keine wesentlichen Impedanzänderungen in allen Zellkulturen. Damit liegen alle Impedanzwerte der Zellkulturen im selben Bereich des reinen Mediums. Dies kann damit begründet werden, dass die Zellen innerhalb der ersten Stunden nach der Aussaat sich auf der Elektrodenoberfläche absetzen und anheften. Die Zellen befinden sich nun gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt, wodurch kein signifikanter Impedanzanstieg messbar ist, da das Medium den dominanten Einfluss auf die Messwerte hat.

Nach der Anhaftung kann eine Zellproliferation in allen drei Zellkulturen gemessen werden. Der Impedanzanstieg ist jedoch in der Zellkultur 2 (Abbildung 4.5-b) im Vergleich zur Zellkultur 3 (Abbildung 4.5-c) um etwa einen Tag zeitversetzt. Dies kann vermutlich auf die statistischen Schwankungen der Zellzahl oder auf nicht exakt gleiche Bedingungen zurückgeführt werden. Nach etwa 2,5 Tagen wurde in allen Reservoirs ein Mediumwechsel (M1) durchgeführt. Der Mediumwechsel ist erforderlich, damit die Zellkulturen immer optimale Bedingungen vorfinden



und entsprechend gut versorgt werden. Der Mediumwechsel ist normalerweise durch einen kurzzeitigen Impedanzanstieg erkennbar. Jedoch wurde dieser zu einem Zeitpunkt von hohem Zellwachstum und damit hoher Impedanzänderung durchgeführt, sodass in diesem Fall der Mediumwechsel keine signifikante Impedanzänderung verursacht. Nach etwa 6 Tagen der Zellkultivierung konnte in allen Zellreservoirs eine konfluente Zellschicht sowohl anhand einer konstanten Impedanz erkannt als auch optisch nachgewiesen werden. Der Impedanz-Nachweis ist vorallem in einem weiten Frequenzbereich von f1 = 10kHz bis f2 = 100kHz messbar, wobei ein absolutes Maximum in Zellkultur 1 (Abbildung 4.5-a) nach 3d 18,45h bei 35kHz mit einem Impedanzanstieg auf 234% beobachtet werden konnte. In diesem Frequenzbereich erreichte die konfluente Zellschicht in allen drei Zellreservoirs konstante Werte im Bereich von 160-170% (gelber Bereich) der Ausgangsimpedanz.



Abbildung 4.5: Spektraldarstellung 2 der normierten Impedanzänderung von Zellschichten mit eingebrachtem Bromelain am Tag 7 (Bild a-c) und dem Zellmedium (Bild d). Die Zeitpunkte M1 – M2 zeigen die Medienwechsel an.

Nachdem die Konfluenz sowohl elektrisch messbar als auch optisch erkennbar war, konnte mit der Bromelainzugabe begonnen werden. In früheren Messungen (siehe [59]) wurde bei diesen Untersuchungen das Bromelain in Verbindung mit einem Mediumwechsel den Zellen zugeführt. Dies hatte einen starken Impedanzanstieg zur Folge, welche die Beobachtbarkeit des Bromelaineinflusses schmälerte. Dieser nachteilige Effekt sollte durch die Zugabe des Bromelains ohne gleichzeitigen Mediumwechsel vermieden werden. Durch die reine Zugabe von einer kleinen Menge Bromelain zu dem Zellmedium konnte eine verzögerte Reaktionszeit des Bromelaineinflusses festgestellt werden [59]. Demzufolge wurde in Vorversuchen eine höhere Bromelainkonzentration von 30µg/160µl als geeignet ermittelt. Damit der Bromelaineinfluss möglichst gut beobachtet werden kann, wurde das Messintervall auf 0 gesetzt und so eine Wiederholrate von 85s pro Messung erreicht. Nach 30min und nach 60min konnte sowohl kein signifikanter Impedanzabfall festgestellt als auch keine optische Veränderung der Zellschicht wahrgenommen werden. Eine Bromelainwirkung konnte erst nach 100 min durch einen raschen Abfall der Impedanzwerte in einen weiten Frequenzbereich festgestellt werden.

d Bromelain - 100min b confluent layer c Bromelain - 30min a cells after seeding t1=0d 50µm t2=6d 14,5h ⊢ 50µm t3=6d 15,1h Η 50µm t4=6d 16,2h н - $\substack{b \ c + d \\ \clubsuit \\ \phi(t,f) - \phi(t=0,f) }$ b c + d $\downarrow \downarrow \downarrow$ |Z(t,f)|/|Z(t=0,f)|*100%f 🖡 e 1 f4 200 10 f3 180 f2 frequency [Hz] \[
\u00e9(t,f)-\u00e9(t=0,f) []
\u00e9] f1→ 10 10 100 10 10 10 80 15 10² 8 time [days] 8 time [days] g h $\phi(t,f)-\phi(t=0,f)$ |Z(t,f)|/|Z(t=0,f)|*100% 25 -f1 = 10kHz -f2 = 50kHz -f3 = 100kHz -f4 = 300kHz -f1 = 10kHz -f2 = 50kHz -f3 = 100kHz 20 15 200 f4 = 300kHz 10 5 0 -5 10 -5 10 10 |Z(t,f)|/|Z(t=0,f)|*100% 150 f3 f4 f2 f1 50 -15 -20 -25 10 14 8 time [day] 8 time [day] j i |Z(t,f)|/|Z(t=0,f)|*100% $\phi(t,f)-\phi(t=0,f)$ 25 -t1 = 0d-t2 = 6d 14,5h-t3 = 6d 15,1h-t1 = 0d-t2 = 6d 14,5h-t3 = 6d 15,1h-t4 = 6d 16,2h20 15 200 10 5 t4 = 6d 16,2h ¢(t,f)-¢(t=0,f) [°] |Z(t,f)/Z(t=0,f)|*100% 150 0 t1 t2t3 t4 t1 -5 -10 t4 t2 t3 -15 -20 -25 0 10 10 10⁴ frequency [Hz] 10⁴ frequency [Hz] 10 10 10

Resultate und Diskussion

Abbildung 4.6: Detailansicht 2 der Spektraldarstellung der Zellkultur1: (a-d) optischer Verlauf des Wachstums der Zellkultur; (e) Spektraldarstellung der normierten Impedanzänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (f) Phasendarstellung der normierten Phasenänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (g) Zeitlicher Verlauf der Impedanzkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=10kHz, f2=50kHz, f3=100kHz, f4=300kHz); (h) Zeitlicher Verlauf der Phasenkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=10kHz, f2=50kHz, f3=100kHz, f4=300kHz); (i) Frequenzgang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=0d; t2=6d 14,5h; t3=6d 15,1h; t4=6d 16,2h); (j) Phasengang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=0d; t2=6d 14,5h; t3=6d 15,1h; t4=6d 16,2h).

Andreas EXLER



Um den Einfluss des Permeation Enhancers Bromelain auf die konfluente Zellschicht detaillierter zu untersuchen, wird im Folgenden exemplarisch die Zellkultur 1 in Abbildung 4.6 genauer analysiert und umfassend beschrieben. Die Zellkulturen 2 und 3 zeigten ein vergleichbares Verhalten, sodass die Ergebnisse als statistisch relevant eingestuft werden können.

Die Abbildung 4.6 (a-d) zeigen mikroskopische Untersuchungen der Zellkultur 1 zu den Zeitpunkten t1 bis t4. Dabei sind unterschiedliche Zellzustände, wie die Zellen nach der Aussaat, eine konfluente Zellschicht und zwei Zeitpunkte nach der Bromelainzugabe zu erkennen. Des Weiteren zeigt die Abbildung 4.6-e die Impedanzdarstellung bezogen auf den ersten Messwert zum Zeitpunkt t1=0d, ausgeführt als Quotientenspektrum. Bei der Abbildung 4.6-f handelt es sich um eine Phasendarstellung welche wiederum auf den ersten Messwert zum Zeitpunkt t1=0d bezogen wurde und als Differenzenspektrum ausgeführt ist. Zum Zeitpunkt t1=0d werden die Zellen ausgesät und unter optimalen Bedingung in einem Inkubator kultiviert. Nach etwa einem Tag Kultivierungszeit lässt sich ein Zellwachstum im Mikroskop beobachten. Dies lässt sich im Frequenzbereich von f1 = 10kHz bis f3 = 100kHz erkennen. Der Frequenzbereich in dem ein Zellwachstum erkennbar ist, wird im weiteren Verlauf breiter (1kHz bis 1MHz), wobei für die weitere Analyse ein Vorzugsbereich f1 = 10kHz bis f4 = 300kHz herausgegriffen wird. Ab dem zweiten Kultivierungstag deutet die Impedanzdarstellung (Abbildung 4.6-g) auf ein starkes Zellwachstum hin. Dies kann aus der großen Änderungsrate der Impedanz geschlossen werden. Nach einem Maximalwert im Bereich des vierten Tages sinkt die Impedanz, um anschließend einen konstanten Wert zu erreichen.

Im Vergleich zu der Impedanzdarstellung, liefert auch die Phasendarstellung Hinweise auf ein Zellwachstum anhand einer Phasenänderung. Hier zeigt sich eine Phasenänderung in Richtung positiver Werte in einem Frequenzbereich von 1kHz bis 10kHz (roter Bereich) und eine Abnahme in Richtung negativer Werte bei hohen Frequenzen (100kHz bis 1MHz). Eine konfluente Zellschicht ist auch in der Phasendarstellung durch eine konstante Phase charakterisiert.

Die elektrischen Messdaten werden zusätzlich von Abbildung 4.6-b unterstützt und zeigen eine konfluente Zellschicht. Damit wird dem biologischen System der chemische Stressor, Bromelain, zugeführt. Der Einfluss des Bromelains auf die Permeabilität ist sowohl in der Impedanz als auch in der Phase durch eine starke Wertänderung erkennbar. Jedoch ist die Sensitivität nicht über den gesamten Frequenzbereich gleichverteilt. Bei der Impedanz liegt eine maximale Wertänderung von 12,79% während der Bromelainmessung bei 10kHz vor. Diese Sensitivität nimmt sowohl zu hohen als auch zu tiefen Frequenzen wieder ab. Nach der Bromelaineinwirkung von 100min wurden das Bromelain und das Medium entfernt. Da jedoch das Bromelain sowohl auf die Tight Junctions zwischen den Zellen als auch auf die Zellanhaftung wirkt, lösten sich die Zellen zum Teil von der Elektrodenoberfläche wieder ab (Abbildung 4.6-d).

Die Einwirkung von Bromelain auf die konfluente Zellschicht ist auch gut im Frequenzgang (Abbildung 4.6-i) und Phasengang (Abbildung 4.6-j) durch eine Verschiebung der Kurven (Cyan) zu höheren Frequenzen erkennbar. Nach der Bromelaineinwirkung ist ein Impedanzanstieg (Abbildung 4.6-g) sichtbar, welcher aber nicht auf den Ursprungswert zurückkehrt. Hierbei wird vermutet, dass das Bromelain auch im Nachhinein, trotz Entfernung, einen nachhaltigen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen zur reversiblen Ausbildung von Tight Junctions ausübt.

Im Folgenden wurden die Zellen weiter kultiviert und am zehnten Tag wurde ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt. Jedoch konnte weder elektrisch noch optisch ein neuerliches Wachstum der Zellen festgestellt werden. Dieses Phänomen kann mit einer nachhaltigen



Zellschädigung in Verbindung gebracht werden. Mit dieser Messung konnte der Einfluss des Permeation Enhancer Bromelain nachgewiesen werden, obwohl ein erneutes Wachstum nicht beobachtet werden konnte. Der Messungsablauf kann damit in zweierlei Hinsicht verändert werden. Zum einen kann durch eine Reduktion der Bromelainkonzentration die Zellschädigung reduziert werden. Jedoch hat eine zu geringe Konzentration, welche im Vorfeld ermittelt wurde, keinen messbaren Einfluss auf die Zellschicht. Zum anderen kann die Sensitivität des MEA-Chips durch eine Veränderung der Elektrodengeometrie verbessert werden.



Abbildung 4.7: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 100kHz von Zellkultur 1 vor und nach der Bromelainzugabe. Dargestellt sind (a) der Absolutwert der Impedanz, (b) der Phase, (c) der Resistanz und (d) der Reaktanz. (e-h) zeigt die zeitliche Entwicklung der Ortskurve.



Um die Information über den Bromelaineinfluss mit einer weiteren Analyse zu ergänzen, erfolgt in Abbildung 4.7 eine Darstellung der gemessenen Impedanz- und Phasenwerte in Form des Realund Imaginärteils. Ausgehend von den real gemessenen Werten kann ein Vergleich zu dem Realund Imaginärteil, aber auch zu einer zeitlichen Abfolge der Ergebnisse in der komplexen Ebene gezogen werden. Diese Zusammenhänge sollen im Folgenden genauer erörtert werden.

In Abbildung 4.7-a und Abbildung 4.7-b sind die realen Werte der Impedanz und Phase für Zellkultur 1 im Vergleich zu der Referenzmessung des reinen Mediums bei einer Frequenz von 100kHz dargestellt. Der Zellwachstumsverlauf mit einer anschließenden konfluenten Zellschicht ist im Vergleich zum zellfreien Medium sehr gut unterscheidbar. Der erste Mediumswechsel, welcher nach etwa 2,5 Tagen durchgeführt wurde, ist nur geringfügig durch einen kleinen Knick im Impedanzverlauf erkennbar. Hingegen zeichnet sich in den Phasenwerten eine deutlichere Messwertänderung in beiden Kurven ab. Diese Impedanzänderung durch das Zellwachstum ist des Weiteren auch im Realteil (Abbildung 4.7-c) als auch im Imaginärteil (Abbildung 4.7-d) messbar. Der Imaginärteil stellt sich jedoch als deutlich sensitiverer Parameter bei einer Messwertänderung heraus.

Zum Zeitpunkt t3 wird der Zellkultur, ohne gleichzeitigen Mediumwechsel, Bromelain zugegeben, sodass die Bromelainkonzentration im Nährmedium 30µg/160µl erreicht. Die Einwirkzeit des Bromelains beträgt dabei 100min. Nach dieser Zeit ist in allen Parametern (Impedanz, Phase, Realund Imaginärteil) eine starke Messwertänderung detektierbar. Bei t4 wurde das Bromelain wieder entfernt und neues Medium der Zellkultur zugeführt. Da die Zellen, wie bereits beschrieben, sich unter der Bromelaineinwirkung teilweise von der Oberfläche abgelöst haben und nachhaltig geschädigt wurden, ist in Folge eine anhaltende Messwertänderung erkennbar.

Bei der Darstellung in der komplexen Ebene wird in Abbildung 4.7-e bis Abbildung 4.7-h eine zeitliche Abfolge der Messwerte für 100kHz dargestellt. Die Unterscheidung zwischen Zellkultur und Medium ist aus der komplexen Darstellung signifikanter. Während der gesamten Messzeit ändern sich die Werte des Mediums nur geringfügig und eine Ausdehnung der Kurve zu stark positiver Resistanz oder stark negativer Reaktanz ist nur minimal vorhanden. Damit kann die Impedanz des Mediums in der komplexen Ebene in erster Näherung punktförmig ohne nennenswerte Änderung des Real- oder Imaginärteils angegeben werden.

Im Gegensatz dazu erfahren die Messwerte der Zellkultur 1 in Abbildung 4.7-e eine Tendenz in Richtung positiver Realteile und negativer Imaginärteile. Die Ausdehnung von den Zeitpunkten t1 und t2 ist hier maximal und nähert sich bis zum Zeitpunkt t3 konstanten Werten an. Zwischen den Zeitpunkten t3 und t4 erfolgt die Bromelainmessung. In Abbildung 4.7-g ist wiederum der sensitivere Charakter des Imaginärteils anhand einer Änderung parallel zur Imaginärteilachse erkennbar. Nach der Bromelainmessung ist abermals ein deutlicher Rückgang sowohl des Realteils als auch des Imaginärteils aufgrund der abgelösten und nicht mehr anwachsenden Zellen verfolgbar (siehe Abbildung 4.7-h).

Mit diesen Ergebnissen zeigen sich deutliche Vorteile in der separaten Betrachtung des Real- und Imaginärteils sowie die Darstellung in der komplexen Ebene. Dabei kann die Impedanzdarstellung als Übersicht dienen und der Imaginärteil für eine genaue Analyse der Vorgänge verwendet werden. Die Betrachtung der komplexen Ebene stellt eine Sonderform der Interpretierung dar, wobei die Änderung des Imaginärteils als auch die Gesamtlänge der Kurve Aussagen über das Gesamtsystem möglich machen.



4.4. Elektrische Charakterisierung der geschädigten Zellschicht mit zusätzlicher chemischer Beeinflussung

In einem Zellkulturlabor kann es vorkommen, dass durch nicht optimale in-vitro-Bedingungen, Veränderungen der verwendeten Zusätze (Medium, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, etc.) oder ein differierender Laborbetrieb ein verändertes Zellwachstum auftritt. Bei dieser kontinuierlichen Langzeitmessung wird eine CaCo2-Zellkultur verwendet, bei der sich die Zellen nach der Aussaat, Anhaftung und Proliferation wieder von der Oberfläche ablösen. Dabei soll untersucht werden, ob dieses Phänomen in unterschiedlichen Zellkulturen verschieden stark auftritt und ob dies anhand der Messungsdaten ableitbar ist.

Zelllinienherkunft	Pharmaziezentrum der Universität Wien
Elektrodenpaare	8
Zellmedium	RPMI 1640
Zellentyp	CaCo2
Passage	7
Zelldichte bei Aussaat	20000 Zellen/160μl
Bromelainkonzentration	30µg/160µl

Tabelle 4.3: Parameterübersicht 3 der messungsspezifischen Daten

Für diese Messung kommt das IDES-8-Elektrodenpaardesign zum Einsatz, bei dem in den Zellkulturkammer zwei IDES-Sensoren die Impedanz messen. Aufgrund der kleineren Elektrodengröße werden Veränderungen in nur einer Hälfte der Zellkultur ortsaufgelöst beobachtet (siehe Abschnitt 2.2.3). Des Weiteren sind die zwei Elektrodenpaare in je einem Reservoir integriert um auch lokale Wachstumsunterschiede messen zu können. Zunächst werden in drei Reservoirs je 20000 Zellen ausgesät. Das vierte Reservoir dient als Referenzwert und erfüllt die Aufgabe der Mediumüberwachung über die gesamte Messung.

In Abbildung 4.8 ist eine Übersicht der Messergebnisse in Form der Konturdiagramme abgebildet. Hierbei ist in der xy-Ebene die Zeit und Frequenz aufgetragen und die Farbe repräsentiert die Impedanzwerte in der dritten Dimension. Die Abbildung 4.8 zeigt auch die zwei Elektrodenpaare je Zellreservoir, welche übereinander, analog zum MEA-Design, angeordnet sind. Damit lässt sich auch eine lokale Veränderung innerhalb der Zellkultur in einen äußeren und einen inneren Bereich unterteilen. Anhand dieser Übersicht ist auf den ersten Blick eine starke Divergenz zwischen der Zellkultur 1 und 2 im Vergleich zu der Zellkultur 3 erkennbar. Diese großen Unterschiede können auf die abweichende Zellanhaftung, welche in Folge genauer analysiert wird, zurückgeführt werden.

Nach der Aussaat ist in den ersten Tagen optisch keine Unterscheidung der Zellkulturen 1 bis 3 erkennbar. Hingegen zeigt sich elektrisch ein stark abweichendes Bild. In den Zellkulturen 1 und 2 ist über den gesamten Frequenzbereich eine stark abfallende Impedanz erkennbar. In Zellkultur 3 hingegen zeigt sich wie erwartet ein Zellwachstums in Form eines Impedanzanstieges. Am zweiten Messungstag wird ein Mediumwechsel (M1) durchgeführt. Ab diesem Zeitpunkt ist in Zellkultur 3 ein gutes Wachstum beobachtbar und nach einem zweiten Mediumswechsel (M2) erreicht die Zellkultur einen Impedanz-Maximalwert von 159,3% bezogen auf den Startwert zum Zeitpunkt



6d 4,65h bei einer Frequenz von 360kHz (siehe Abbildung 4.8-c). Bei den Zellkulturen 1 und 2 (siehe Abbildung 4.8-a und Abbildung 4.8-b) ist sowohl nach dem ersten als auch nach dem zweiten Mediumswechsel kein signifikantes Wachstum messbar. Nach etwa 8 Tagen der Zellkultivierung erreichen die Messwerte der beiden Elektrodenpaare in der Zellkultur 3 konstante Werte. Der Frequenzbereich der charakteristisch für ein Zellwachstum ist, erstreckt sich von f1 = 100kHz bis f2 = 1MHz. Des Weiteren ist in allen Zellkulturen und dem reinen Medium nur eine geringe Differenz zwischen den beiden Elektrodenpaaren innerhalb einer Zellkultur messbar. Dies deutet zum einen auf ein gleiches Verhalten der designten Elektroden und zum anderen auf ein gleichverteiltes Wachstum der Zellkultur 3 über die gesamte Chipoberfläche hin.



Abbildung 4.8: Spektraldarstellung 3 der normierten Impedanzänderung von Zellschichten mit eingebrachtem Bromelain am Tag 9 (Bild a-c) und dem Zellmedium (Bild d). Die Zeitpunkte M1 – M2 zeigen die Medienwechsel an.

Nachdem eine konfluente Zellschicht in Zellkultur 3 messtechnisch erkennbar war, wurde dies optisch kontrolliert. Dabei stellte sich wie Eingangs beschrieben, eine konfluente Zellschicht in Zellkultur 3 und teilweise abgelöste Zellen in den Zellkulturen 1 und 2 heraus. Die optische Befundung bestätigte die durch die elektrischen Messungen bereits frühzeitig abgezeichneten geschädigten Zellkulturen. Das Resultat demonstriert, dass die Impedanzmessung ein exzellenter Indikator für die Zellkonfluenz darstellt.

Um weitere Erkenntnis von einer konfluenten Zellschicht im Vergleich zu den abgelösten Zellen zu erhalten, wurde eine Bromelainmessung am neunten Tag durchgeführt. Da die Einwirkzeit in Messung 4.3 von 100min Bromelain bei einer Konzentration von 30µg/160µl eine weiter Schädigung der Zellen zufolge hatte, erfolgt diese Bromelainmessung mit dem IDES-8-Elektrodenpaardesign. Die veränderte Elektrodengeometrie des IDES-8-Elektrodenpaardesigns erzeugt eine höhere Auflösung der Vorgänge zwischen den Zellen. Damit kann bei gleicher Bromelainkonzentration eine frühere Abnahme der Impedanz aufgrund der besseren Auflösung erwartet werden. Diese Annahme soll mit dieser Messung überprüft werden.



Abbildung 4.9: Detailansicht 3 der Spektraldarstellung der Zellkultur3: (a-d) optischer Verlauf des Wachstums der Zellkultur; (e) Spektraldarstellung der normierten Impedanzänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (f) Phasendarstellung der normierten Phasenänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (g) Zeitlicher Verlauf der Impedanzkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=50kHz, f2=100kHz, f3=300kHz, f4=600kHz); (h) Zeitlicher Verlauf der Phasenkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=50kHz, f2=100kHz, f3=300kHz, f4=600kHz); (i) Frequenzgang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=8d 22,7h; t2=8d 23,5h; t3=8d 23,9h; t4=12d 3,4h); (j) Phasengang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=8d 22,7h; t2=8d 23,9h; t4=12d 3,4h).



Um zunächst die Hypothese der verbesserten Auflösung, bedingt durch die veränderte Elektrodengeometrie, zu testen, wird anhand von Abbildung 4.9 die Einwirkung des Permeation Enhancers Bromelain auf die konfluente Zellschicht in Zellkultur 3 untersucht.

In Abbildung 4.9-e ist die Impedanzdarstellung bezogen auf den Messwert zum Zeitpunkt t = 0 als Konturdiagramm dargestellt. Hiermit ist ein schneller Überblick über die gesamte Messung und deren Verhalten gegeben. Durch diesen Überblick erkennt man einen stark ausgeprägten, abfallenden Impedanzbereich unterhalb von f1 = 50kHz, welcher oberhalb dieser Frequenz, ab dem vierten Tag, durch einen breiten und signifikanten Impedanzanstieg verdrängt wird (orangeroter Bereich). Mit dieser Erkenntnis wird in Folge der Frequenzbereich f1 = 50kHz bis f4 = 600kHz näher betrachtet.

In Abbildung 4.9-f wird die Phasendarstellung als Differenzenspektrum in Form eines Konturdiagrammes abgebildet. Hier sind ebenfalls abhängig von der Frequenz und dem Zellwachstum unterschiedlich ausgeprägte Phasenänderungen erkennbar. Insbesondere ist ab dem Zeitpunkt des Zellwachstums eine Phasenänderung hin zu positiven Werten bei einem Frequenzbereich von 10kHz bis 100kHz und eine Verschiebung zu negativen Werten bei hohen Frequenzen oberhalb von f4 = 600kHz messbar.

Ein interessantes Phänomen zeigt sich auch im Vergleich der Messwertänderung der Impedanzdarstellung und der Phasendarstellung nach dem zweiten Mediumswechsel (M2). Im Falle der Impedanzdarstellung (Abbildung 4.9-g) steigt bei allen Frequenzen die Impedanz nach dem Mediumwechsel an, um in weiterer Folge konstante Werte zu erreichen. In der Phasendarstellung (Abbildung 4.9-d) zeigt sich nach dem Mediumwechsel der gegenteilige Effekt durch eine Abnahme der Phase infolge eines ausgeprägteren Minimums im hohen Frequenzbereich. Nach dieser starken Änderung näheren sich auch die Phasenwerte einem konstanten Bereich an. Demzufolge können konstante Impedanzwerte und konstante Phasenwerte zur Charakterisierung einer konfluenten Zellschicht herangezogen werden (Abbildung 4.9-a).

Im Anschluss an die konfluente Zellschicht beginnt eine Bromelainmessung durch die Zugabe von 30µg Bromelain auf 160µl Medium. Das Bromelain wird dem Medium und damit den Zellen ohne einen Mediumwechsel durchzuführen zugegeben, um Messwertänderung bedingt durch frisches Medium zu vermeiden. Nach 45min der Bromelaineinwirkung konnte noch kein signifikanter Impedanzabfall gemessen werden (siehe Abbildung 4.9-i). Jedoch zeigt sich im Frequenzbereich von 10kHz bis 600kHz eine tendenzielle Verringerung der Impedanz. Aus diesem Grund wurde eine optische Kontrolle durchgeführt, um den morphologischen Zustand der Zellschicht zu begutachten. Da kein optischer Unterschied zu der konfluenten Zellschicht (Abbildung 4.9-a) festgestellt werden konnte und die Zellen keine ablösende Tendenz zeigten, wurde die Bromelaineinwirkdauer fortgesetzt.

Nach 68min Einwirkdauer des Bromelains war ein sehr starker Abfall der Impedanz im Frequenzbereich von f1 = 50kHz bis f3 = 300kHz feststellbar. In diesem Frequenzbereich hatte die Messwertänderung Ausmaße bis zu 33%. Die Änderungen sind sowohl in Abbildung 4.9-g durch einen parallelen Verlauf der Kurven zur y-Achse, als auch sehr gut in Abbildung 4.9-i durch eine Verschiebung der Impedanz in Richtung höherer Frequenzen messbar. Bei den Messwerten der Phase ist eine abrupte Verschiebung der maximalen Abweichung in Richtung höherer Frequenzen sowohl in Abbildung 4.9-f als auch Abbildung 4.9-j ablesbar. Die Zellen selbst bildeten auch noch nach der Bromelainmessung (siehe Abbildung 4.9-c) eine konfluente Zellschicht, jedoch konnte ein



erneutes Anwachsen der Zellen nicht gemessen werden. Das Bromelain wirkt auch nach dessen Entfernung durch einen Mediumwechsel, welcher im Anschluss an die Bromelainmessung durchgeführt wurde, nach. Dies führt zu einem nachhaltigen Ablösen der Zellen wie es in Abbildung 4.9-d erkennbar ist.



Abbildung 4.10: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 3 vor und nach der Bromelainzugabe. Dargestellt sind (a) der Absolutwert der Impedanz, (b) der Phase, (c) der Resistanz und (d) der Reaktanz. (e-h) zeigt die zeitliche Entwicklung der Ortskurve.



Um einen Vergleich zwischen den gemessenen Werten der Zellkultur 3 und einem Vergleichswert, dem reinen Medium, ziehen zu können, werden in Abbildung 4.10 diese beiden Messwerte bei einer Frequenz von 300kHz in unterschiedlichen Betrachtungsweisen gegenübergestellt.

In Abbildung 4.10-a und Abbildung 4.10-b sind die realen Werte der Impedanz und der Phase als Impedanzspektrum und Phasenspektrum dargestellt. Dabei ist im Impedanzspektrum ein deutlicher Unterschied der Startwerte zwischen der Zellkultur und dem Medium erkennbar. Des Weiteren ergibt sich in Folge eine kontinuierliche Abnahme der Impedanz des Mediums über die gesamte Messdauer. Dies könnte auf chemische Vorgänge die sich auf der Elektrode und im Medium abspielen zurückgeführt werden. Die Impedanzänderungen über die Zeit der Zellkultur zeigen den deutlichen Verlauf eines Zellwachstums mit anschließenden konstanten Werten einer konfluenten Zellschicht und dem starken Impedanzabfall bedingt durch die Bromelaineinwirkung. Die Phasenänderungen in Abbildung 4.10-b erweisen sich ebenfalls als sensitive Parameter um veränderliche Vorgänge in einer Zellkultur feststellen zu können, wenngleich sich keine Vorzugsrichtung ableiten lässt.

In Abbildung 4.10-c und Abbildung 4.10-d sind zusätzlich der Realteil und der Imaginärteil, abgeleitet aus den Werten der Impedanz und Phase, dargestellt. Die parallele Analyse der Impedanz und der Phase und deren Abhängigkeit zueinander zeigen sich eindeutig in der Darstellung des Realteils. Die maximale Messwertänderung begründet durch das Zellwachstum beträgt bezogen auf den Zeitpunkten t1 zum Zeitpunkt t2 im Impedanzspektrum 53,8% und im Realteilspektrum 56,3%. Im Vergleich dazu liegt im selben Zeitbereich die betragsmäßige Messwertänderung des Medium im Impedanzspektrum bei 26,6% und im Realteilspektrum bei nur 18,1%. Diese geringere Änderung der Werte spiegelt auch die erwartenden Werte des Mediums wieder. Damit ist sowohl in der Impedanz als auch in der Phase Information über chemische und physikalische Vorgänge des biologischen Systems enthalten.

Mit den Abbildungen 4.9-e bis 4.9-h ist des Weiteren eine zeitliche Abfolge der Messwerte in der komplexen Ebene dargestellt. Durch die Kurvenform lässt sich auch eindeutig eine Unterscheidung des Mediums zu einer Zellkultur und Einwirkungen aufgrund des Bromelains ablesen. Die Abbildung 4.10-e stellt den maximal gemessenen Wert der Zellkultur zu Zeitpunkt t2 dar. Hier ist ein paralleler Verlauf der Zellkultur zur x-Achse, aufgrund einer großen Realteil- und geringer Imaginärteiländerung identifizierbar. Das Medium hingegen weist eine starke Imaginärteiländerung bei geringer Realteiländerung auf. Der weitere Verlauf (Abbildung 4.10-f) zeigt die Annäherung der Zellkultur zu einer konfluenten Zellschicht, charakterisiert durch konstante Realteil- und Imaginärteilwerte. Nach der Bromelainzugabe nimmt der Realteil stärker ab als der Imaginärteil (Abbildung 4.10-g), um schlussendlich ähnliche Realteilausgangswerte (Abbildung 4.10-h), aufgrund abgelöster Zellen anzunehmen.

Damit konnte die Relevanz der gleichzeitigen Begutachtung der Impedanz als auch der Phase bestätigt werden. Es ist von entscheidender Bedeutung sowohl die getrennte Analyse durch die Impedanz- und Phasenspektren als auch die Abhängigkeit beider Parameter in Form des Real- und Imaginärteils zu analysieren.



Abbildung 4.11: Detailansicht 4 der Spektraldarstellung der Zellkultur1: (a-d) optischer Verlauf des Wachstums der Zellkultur; (e) Spektraldarstellung der normierten Impedanzänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (f) Phasendarstellung der normierten Phasenänderung der gesamten Messung als Konturdiagramm; (g) Zeitlicher Verlauf der Impedanzkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=50kHz, f2=100kHz, f3=300kHz, f4=600kHz); (h) Zeitlicher Verlauf der Phasenkurve bei ausgewählten Frequenzen (f1=50kHz, f2=100kHz, f3=300kHz, f4=600kHz); (i) Frequenzgang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=1d 21,4h; t2=8d 22,7h; t3=8d 23,9h; t4=12d 3,4h); (j) Phasengang bei ausgewählten Zeitpunkten (t1=1d 21,4h; t2=8d 22,7h; t3=8d 23,9h; t4=12d 3,4h).



Im Vergleich der bisher beschriebenen normal wachsenden Zellkultur soll nun im Detail auf das elektrische Verhalten einer Zellkultur eingegangen werden, welche ein verändertes Zellwachstum aufweist. Diese Zelllinie zeigt wie Eingangs erläutert zunächst ein optisch betrachtetes normales Verhalten. Jedoch nach den ersten Zellteilungen beginnen sich die Zellen ohne jegliche Einwirkung von der Oberfläche abzulösen. Ob diese abweichende Eigenschaft elektrisch beobachtet werden kann, soll anhand der Detailansicht Abbildung 4.11 erläutert werden.

Nach der Aussaat der Zellen scheint optisch, wie in der Abbildung 4.11-a erkennbar ist, eine langsam wachsende Zellkultur vorzuliegen. Im Vergleich dazu zeigt die in Abbildung 4.11-e, als Konturdiagramm, gezeigte Impedanzdarstellung ein gänzlich anderes Verhalten. Von Messungsbeginn an fällt die Impedanz innerhalb der ersten zwei Tage über den Großteil des Frequenzbereichs stark ab. Bei Frequenzen unterhalb von f1 = 50kHz sind nur noch 20% des Ausgangwertes messbar. Diese Messwerte erweisen sich im Laufe der Messung als Minimalwerte. Ab dem dritten Tag stellte sich in der Zellkultur 3 (Abbildung 4.9) ein Zellwachstum in Form eines Impedanzanstiegs ein. In der Zellkultur 1 ist ebenfalls ein Anstieg der Impedanz, bezogen auf den Minimalwert, erkennbar. Jedoch wird dieser nicht stark ausgeprägte Anstieg innerhalb kurzer Zeit von einem konstanten Plateau unterbrochen. Es wird vermutet, dass dieser Wachstumsstop der Beginn des Ablösens der Zellen von der Elektrodenoberfläche sein könnte.

In Abbildung 4.11-f ist im Gegensatz zur Impedanzdarstellung die Phasendarstellung, als Konturdiagramm ausgeführt, abgebildet. Hier zeigt sich ein gänzlich abweichendes Bild der Zellkultur. In einem weiten Frequenzbereich oberhalb von f1 = 50kHz steigt die Phase von Beginn an stark an um anschließend konstante Werte anzunehmen. Sehr Interessant ist auch die Tatsache, dass sich Impedanz und Phase im selben Zeitraum exakt gegengleich verhalten. Diese Eigenschaft, über den gesamten Frequenzbereich, konnte bei der Zellkultur 3 (Abbildung 4.9) aber auch bei anderen Langzeitmessungen nicht beobachtet werden. Damit kann eine starke Abnahme der Impedanz bei gleichzeitiger starker Zunahme der Phase, bevor ein Zellwachstum eingesetzt hat, ein Indiz für eine veränderte Zellkultur sein.

Um die Frequenzabhängigkeit der Messung eines biologischen Systems noch mal zu verdeutlichen, ist in Abbildung 4.11-i die Impedanz zu unterschiedlichen Zeitpunkten über den gesamten Frequenzbereich dargestellt. Hier ist eine starke Abhängigkeit zu hohen Frequenz ab f2 = 100kHz ersichtlich. Dieser Bereich starker Impedanzänderung liegt genau im Bereich der β -Dispersion biologischer Systeme (siehe Abschnitt 2.2.2). Interessant ist auch die Feststellung, dass bis zu der maximal gemessenen Frequenz von 1MHz keine Anzeichen für einen, sonst beobachteten, Impedanzabfall gegeben sind. Dies kann ebenfalls aufgrund abweichender Vorgänge zufolge der β -Dispersion zurückzuführen sein. Ähnliche, wenngleich nicht so drastische Erkenntnisse, liefert die Darstellung Abbildung 4.11-j. Hier erkennt man die, mehrfach beobachtete, Phasenänderung zu unterschiedlichen Zeitpunkten über den gesamten Frequenzbereich. Jedoch ist auch hier das Maximum eher scharf in einem kleinen Frequenzbereich abgegrenzt und im Vergleich zu Abbildung 4.9-j zu höheren Frequenzen verschoben.

Zusammenfassend ist eine starke Abweichung des üblichen Impedanzanstieges durch ein Zellwachstum begleitet mit einer Phasenänderung in einem begrenzten Bereich gegeben. Diese Unterscheidung steht in direktem Zusammenhang mit dem veränderten Eigenschaften der Zellkultur.





Abbildung 4.12: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 1, der geschädigten Zellkultur. Dargestellt sind (a) der Absolutwert der Impedanz, (b) der Phase, (c) der Resistanz und (d) der Reaktanz. (e-h) zeigt die zeitliche Entwicklung der Ortskurve.



Wie man aus der Abbildung 4.11 entnehmen kann stellt die parallele Analyse der Impedanz und Phase einen wichtigen Teil der Impedanzspektroskopie dar. In beiden Parametern sind Informationen über den Zustand eines biologischen Systems enthalten, welche in Kombination zu weiteren Erkenntnissen führen. Diese Verbindung ist in Abbildung 4.11 dargestellt und soll im Folgenden betrachtet werden.

In Abbildung 4.12-a und Abbildung 4.12-b sind die realen Werte der Impedanz und Phase bei einer Frequenz von 300kHz dargestellt. Wie bereits beschrieben kann in den ersten beiden Tagen der Zellkultivierung die größte Änderung sowohl der Impedanz als auch der Phase der Zellkultur 1 festgestellt werden. Hingegen kann der stetige Abfall der Impedanz des Mediums auf chemische Vorgänge auf der Elektrode oder durch Veränderung des Mediums selbst zurückgeführt werden. Die Wertänderung der Phase des Mediums ist über die gesamte Langzeitmessung nur gering und bedarf daher keiner weiteren Analyse.

Um nun das biologische System in seiner Gesamtheit zu betrachten, ist in Abbildung 4.12-c und Abbildung 4.12-d der Realteil und der Imaginärteil der komplexen Impedanz dargestellt. Die augenblicklichen Unterschiede der beiden Kurven sind eindeutig gegeben. Der stark abfallende Kurventeil ist im Realteil gänzlich verschwunden. Vielmehr ist ein kleines Wachstum ab dem dritten Tag erkennbar, welches zeitlich auch mit den Ergebnissen der Zellkultur 3 (Abbildung 4.9) übereinstimmt. Das abrupte Ende dieses Wachstums, gegenzeichnet durch ein konstantes Plateau, lässt vermuten, dass es mit dem Ablösen der Zellen von der Elektrodenoberfläche korreliert. Ein gänzlich anderes Bild liefert der Imaginärteil. Die Impedanzdaten lassen von Beginn an die starke Änderungsrate erkennbar werden, welche sich nach etwa zwei Tagen an konstante Werte annähert. Der Realteil des Mediums ändert sich nur geringfügig, jedoch sind die Medienwechsel am zweiten und sechsten Tag und der Bromelainmessung am neunten Tag durch kurzfristige Wertänderungen messbar. Der Imaginärteil des Mediums zeigt wiederum ein stärkeres Änderungsverhalten als der Realteil. Damit ist abermals bestätigt, dass zum einen die Aufspaltung eines biologischen Systems in Real- und Imaginärteil zusätzliche Informationen liefert und zum anderen der Imaginärteil bei Messwertänderungen aufgrund eines Zellwachstums, Zellablösens, etc. der sensitivere Parameter ist.

In Abbildung 4.12-e bis Abbildung 4.12-h ist das Zusammenspiel des Realteil und des Imaginärteils in der komplexen Ebene zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 erkennt man sehr deutlich die starke Änderung der Phase, bei nur sehr geringer Wertänderung der Impedanz. Bei einer gut wachsenden Zellkultur würde im Gegensatz die Kurve orthogonal zu der Abgebildeten verlaufen, da das Zellwachstum durch eine Änderung des Realteils bei geringer Änderung des Imaginärteils charakterisiert ist. In weiterer Folge erkennt man die kurzzeitigen Messwertänderungen sowohl im Real- als auch im Imaginärteil aufgrund der Medienwechsel. Da sich die Zellen zwischen den Zeitpunkten t2 und t3 von der Elektrodenoberfläche ablösen und in Folge nicht mehr anwachsen, ist eine weitere Abnahme des Realteils und des Imaginärteils die Folge.

Mit dieser Messung konnte gezeigt werden, dass eine inkorrekt wachsende Zellkultur anhand einer starken Änderung der Impedanz bei gleichzeitig starker Änderung der Phase vor einer optischen Auffälligkeit charakterisiert werden kann.



4.5. Charakterisierung des Mikrofluidiksystems

Ziel der Implementierung des Mikrofluidiksystems war es die kontinuierliche Medienversorgung der Zellkulturen. Damit das gesamte Mikrofluidiksystem eingesetzt werden kann, muss dieses im Vorhinein auf dessen Funktionsfähigkeit und deren physikalische Eigenschaften getestet werden. In diesem Abschnitt soll neben den Eigenschaften des Systems und den funktionellen Ablauf auch ein Testlauf einer Langzeitmessung mit reinen Medium und unterschiedlichen realistisch anwendbaren Flussraten analysiert werden.

Der designte Aufbau besteht aus zwei Einzelsystemen, welche räumlich voneinander getrennt unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die räumliche Trennung erweitert die Flexibilität des Systems enorm. Das geschlossene Zellkultursystem befindet sich wie in Abbildung 3.13 dargestellt ist im MEArack des Impedanzspektrometers. Da jede Zellkulturkammer getrennt voneinander ansteuerbar sein soll, ergibt sich ein sehr geringes Platzangebot auf dem Zellsensor. Der Liquid-Multiplexer ist hierfür das geeignete Bindeglied zwischen der Spritzenpumpe und dem Zellkultursystem. Dieser kann einen Volumenstrom gleichmäßig auf die vier Ausgänge des Liquid-Multiplexers verteilen.



Abbildung 4.13: Schematische Übersicht des Mikrofluidiksystems und dessen Flussrichtung.

Um nun, wie in Abbildung 4.13 angedeutet ist, das Medium auf alle vier Zellkulturen verteilen zu können wird eine Verbindung aus Silikonschläuchen zu den einzelnen Zellkulturkammern hergestellt. Damit ergibt sich, durch die Möglichkeit der separaten Nutzung der Einzelsysteme, ein weiterer Vorteil des Gesamtsystems. Das Zellkultursystem kann unabhängig für Manipulationen einer einzelnen Zellkultur verwendet werden. Diese Manipulationen können unter anderem der Entzug von frischem Medium oder die Zugabe von chemischen Zusätzen (z.B. Bromelain) sein.

Des Weiteren ergeben sich bei der Inbetriebnahme einzelner Komponenten Vorteile für das Gesamtsystem. Das Messsystem ist dabei unabhängig von der mikrofluidischen Versorgung und kann dadurch als "Plug & Play"-System angesehen werden. Da eine getrennte Softwareeinbindung des Messsystems und des Versorgungssystems vorgesehen wurde, können diese somit ortsunabhängig und getrennt voneinander gesteuert werden.



Im Folgenden wird nun eine impedanzspektroskopische Messung in Verbindung mit dem Mikrofluidiksystem beschrieben. Diese Messung soll eine eventuell auftretende Flussabhängigkeit oder den Einfluss bei einem Erneuern des Mediums bedingt durch einen Spritzenwechsel aufzeigen.

Die Messung erstreckt sich über einen Zeitraum von drei Tagen, wobei etwa einmal täglich ein Spritzenwechsel in Verbindung mit einer Flussratenänderung durchgeführt wurde. Vor dem Messungsstart werden die etwa 3,2mm (ca. 160µl Fassungsvermögen) hohen Zellreservoirs der ersten PDMS-Schicht über die Zugänge der zweiten PDMS-Schicht mit Medium gefüllt und alle Luftblasen entfernt. Dieser Arbeitsschritt muss durchgeführt werden, da im weiteren Verlauf Luftblasen die Zu- oder Ableitungen verschließen könnten. Wenn sowohl der Liquid-Multiplexer, als auch das Zellkultursystem vollständig mit Medium gefüllt und gemäß Abbildung 4.13 verbunden sind kann die Messung gestartet werden. Dazu wird der Inlet des Liquid-Multiplexers an die in der Spritzenpumpe eingespannte Spritze angeschlossen. Hier ist ebenfalls auf eine möglichst luftblasenfreie Arbeitsweise zu achten.





Die Messung wird bis zum Zeitpunkt t1 mit einem Volumenstrom von 4,6 $\frac{\mu l}{min}$ durchgeführt, dabei wurden insgesamt 5,3ml durch das System gepumpt. Dieser Volumenstrom am Inlet bedeutet einen Volumenstrom von $1,15\frac{\mu l}{min}$ je Outlet. Wie man in Abbildung 4.14 erkennen kann, zeigt sowohl die Impedanzdarstellung als auch die Phasendarstellung, in allen 4 Kammern nahezu konstante Kurven. Zum Zeitpunkt t1 erfolgt der erste Spritzenwechsel. Dabei sind nach der Messungsunterbrechung infolge des Spritzenwechsels ein abrupter Impedanzanstieg und eine geringe Phasenänderung in Zellkammer 2 und Zellkammer 4 messbar. In Zellkammer 1 und Zellkammer 3 ist diese Änderung nur geringfügig vorhanden. Diese starken Impedanz- und Phasenänderungen wurden auch schon bei manuellen Medienwechseln während einer Langzeitmessung beobachtet. Bei dieser Messung kann jedoch aufgrund eines kontinuierlichen Flusses ein frisches Medium als Ursache ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist die Zeitdifferenz bis zu ursprünglichen Werten mit 4,29h, im Vergleich zu anderen Langzeitmessungen, mit etwa einem Tag wesentlich geringer. Zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 wurde der Volumenstrom auf $5\frac{\mu l}{min}$ (entspricht $1,25\frac{\mu l}{min}$ je Outlet) erhöht um mögliche Messwertänderungen aufgrund Flussratenänderungen zu beobachten. Bis zum Zeitpunkt t2 wurden 5,8ml Medium durch das System gepumpt. Nachdem sich die Impedanz- und Phasenwerte wieder auf ein konstantes Niveau



eingependelt haben ist keine nennenswerte Messwertänderung feststellbar. Zum Zeitpunkt t2 wurde ein erneuter Spritzenwechsel mit einer Messwertunterbrechung durchgeführt. Nun wurde der Volumenstrom auf $3,6\frac{\mu l}{min}$ (entspricht $0,9\frac{\mu l}{min}$ je Outlet) reduziert. Abermals war eine starke Impedanz- und Phasenänderung bei Zellkammer 2 und Zellkammer 4 in einem Gesamtzeitraum von 2,57h messbar. Die anschließenden Messwerte zeigen bis zum Zeitpunkt t3 wiederum konstante Werte. Im Zeitraum t2 bis t3 wurden erneut 5,0ml durch das Mikrofluidiksystem geleitet.

Der letzte Messabschnitt ab dem Zeitpunkt t3 zeigt einen erneuten Spritzenwechsel. Jedoch wurde hier der Volumenstrom mit $3,6\frac{\mu l}{min}$ auf demselben Niveau gehalten, um die Volumenstromänderung als Ursache für die starken Messwertänderungen ausschließen zu können. Schlussendlich zeigt sich bei gleich gehaltenem Volumenstrom derselbe Impedanz- und Phasenanstieg in einem Zeitraum von 2,09h.

Zusammenfassend konnte mit dieser Messung gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Versorgung der Zellkammern über mehrere Tage gewährleistet werden kann. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Mediumsverteilung von: ZK1 = 34,78%, ZK2 = 21,12%, ZK3 = 18,63%, ZK4 = 25,47%. Des Weiteren ist die Volumenstromänderung in einem Wertebereich von $1,4 \frac{\mu l}{min}$ vermutlich kein Parameter der die Messung beeinflusst. Jedoch konnte die Ursache der kurzzeitigen Impedanz- und Phasenänderungen nicht restlos geklärt werden.

Die beschriebene Messung zeigt die erfolgreiche Implementierung der mikrofluidische Medienversorgung. Damit kann dieses Design für zukünftige Langzeitmessungen eingesetzt werden. Defizite scheinen noch durch die kurzen aber starken Messwertänderungen bei einem Spritzenwechsel und einer verbundenen Messwertunterbrechung zu liegen. Des Weitern könnten zur blasenfreien Inbetriebnahme des Systems verbesserte Arbeitsschritte, wie z.B. das Entgasen aller Flüssigkeiten zum Einsatz kommen. Für eine noch bessere Mediumsverteilung auf die einzelnen Zellkulturkammern kann das Design dahingehen geändert werden, dass möglichst alle Ecken und Kanten in dem System vermieden bzw. durch Abrundung entschärft werden. Mit den genannten Weiterentwicklungen ist das Mikrofluidiksystem zukünftig gut einsetzbar.



5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem Zustand einer Zellschicht und deren elektrischer Eigenschaften zu klären. Dazu wurde ein Impedanzanalysesystem bestehend aus dem Impedanzspektrometer "Sciospec ISX-3", einer Chiphalterung "MEArack" und einem selbst entwickelten und selbst gefertigten MEA-Chip mit eigens entwickelten Zellkulturaufsatz und einer Mess- und Steuerungssoftware für die Zellanalyse erweitert und optimiert.

Die Langzeitmessungen, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren impedanzspektroskopische Messungen der extern induzierten Permeabiitätsänderungen wie etwa durch die Zugabe des Permeation Enhancers Bromelain auf die CaCo2-Zellmonoschicht. Die Resultate konnten eindeutig eine Zuordnung von Impedanzänderungen zu Änderungen der Zellschicht beweisen. Des Weiteren konnte die Regenerationsfähigkeit der epithelialen Zelllinie nach einer mechanisch durchgeführten Zellläsion auch anhand elektrischer Messungen zeitgenau beobachtet und bestätigt werden. Da es sich bei diesen Analysen um Langzeitmessungen von vielen Tagen handelt, muss ein guter Kompromiss zwischen der zeitlichen Auflösung der Messzyklen bei gleichzeitiger hoher Genauigkeit einer Einzelmessung, ohne essenziellen Informationsverlust, erzielt werden. Diese Problemstellung ergab sich z.B. bei einem Bromelainmesszyklus. Zunächst wird das Zellwachstum bis zu einer konfluenten Zellschicht zeitunkritsch über mehrere Tage überwacht, um im Anschluss die eigentliche Bromelainmessung durchzuführen. Da die Einwirkzeit des Bromelains, abhängig von der gewählten Konzentration, nur wenige Stunden oder gar Minuten in Anspruch nimmt, muss zum einen der Messzyklus reduziert werden und zum anderen die Messdauer einer Einzelmessung optimiert werden. Der Messzyklus wurde reduziert, indem die Wartezeit der Steuerungssoftware auf Null gesetzt wurde. Die Messdauer konnte durch geeignete Wahl des Frequenzbereichs (100Hz-1MHz) von ursprünglich 10min pro Messung auf 85s für das IDES-4-Elektrodenpaardesign und 170s für das neu implementierte IDES-8-Elektrodenpaardesign bei gleichzeitiger Steigerung der Frequenzauflösung erreicht werden. Damit wurde eine entscheidende Weiterentwicklung für eine kurze aber hoch auflösende Einzelmessung erzielt.

Eine weitere höhere Anforderung wurde an die verwendeten Elektrodenpaare selbst gestellt. Das Impedanzspektrometer und damit auch die Geometrie der Anschlüsse waren kompatibel zu dem Biochipstandard MEA60 von Multichannel System. Aufgrund dieser Schnittstelle muss auch beim selbst entwickelten Elektrodendesign eine gewisse geometrische Grundkonfiguration eingehalten werden. Die planaren Goldelektroden selbst sind als Interdigitated Electrodes (IDES) konfiguriert und werden in einem Mikrostrukturierungsprozess hergestellt. Als erste Erweiterung wird die Fläche der Elektroden auf denen die CaCo2-Zellen wachsen sollen durch eine Si₃N₄-Isolationsschicht begrenzt und damit definiert. Hierdurch konnte eine bessere Vergleichbarkeit der Messergebnisse erreicht werden. Als nächstes wurde zu dem vorhandenen IDES-4-Elektrodenpaardesign mit einer Elektrodenbreite und einem Elektrodenabstand von je



50µm ein IDES-8-Elektrodenpaardesign implementiert. Die 4 Elektrodenpaare sind dabei auf die 4 Zellkulturreservoirs des MEA-Chips aufgeteilt und füllen diese ganzflächig aus. Durch die Verdopplung der Elektrodenpaaranzahl sind für die 4 Zellkulturreservoirs je zwei Elektrodenpaare verfügbar die jeweils eine Hälfte der Zellkulturkammer messtechnisch erfassen. Dies bringt den Vorteil mit sich, dass nun auch lokale unterschiedliche Entwicklungen innerhalb einer Zellkultur beobachtbar sind. Des Weiteren wurde die Elektrodenbreite und der Elektrodenabstand auf je 20µm reduziert. Dadurch wird die zweidimensionale Auflösung der Messfläche erhöht, welche sich in einer genaueren Beobachtung z.B. des Zellwachstums niederschlägt. Die adaptierte Elektrodengeometrie mit verkleinerten Abständen zwischen den Elektroden erzeugt auch noch eine verbesserte Abstimmung auf die Zellmonoschicht. Der Großteil des elektrischen Feldes über den Elektrodenpaaren breitet sich nun nur bis zu einer Höhe aus, welche ungefähr, dem kugelförmig angenommen, Durchmesser der CaCo2-Zellen entspricht. Damit beeinflussen chemische Vorgänge über der Zellschicht die Elektrodenpaare bei der Messung nur mehr vernachlässigbar. Dies steigert die Sensitivität und Spezifität der Elektrodenpaare für die CaCo2-Zellmonoschicht.

Der letzte Teil dieser Arbeit widmet sich der Erweiterung des Impedanzanalysesystems um eine eigenständige mikrofluidische Medienversorgung. Die Versorgung besteht aus der hochpräzisen Spritzenpumpe KDS Legato 110, einem selbstgebauten Liquid-Multiplexer für die gleichmäßige Mediumsverteilung und einem selbst für die MEA-Geometrie entwickelten geschlossenen Mikrofluidik-Zellkulturaufsatz. Die Ansteuerung der Spritzenpumpe wurde in Form einer Matlab-Softwarelösung implementiert. Somit kann das Gesamtsystem, bestehend aus dem Impedanzspektrometer und der Mikrofluidikversorgung, weiterhin PC-gesteuert betrieben werden. Das Mikrofluidiksystem wurde so ausgelegt, dass durch den Liquid-Multiplexer eine kontinuierliche und gleichmäßige Versorgung aller 4 Zellkulturkammern gewährleistet und bei manueller Verwendung jede einzelne Kammer getrennt angesteuert werden kann. Die Funktionsfähigkeit des Systems konnte in einem mehrtägigen Versuchsaufbau bestätigt werden.

Zusammenfassend konnten erfolgreiche Bromelainmessungen und Regenerationsfähigkeitsmessung durchgeführt werden. Das System wurde hinsichtlich einer Einzelmessung optimiert und um ein Mikrofluidiksystem erweitert. Letztlich konnte durch das IDES-8-Elektrodenpaardesign sowohl die räumliche Auflösung einer Zellschicht als auch die Sensitivität von chemischen Vorgängen in Bezug auf Morphologie und Zell-Zell Kontakte gesteigert werden.

Um dieses Impedanzanalysesystem für neue und genauere Analysen im Bereich des Zellwachstums und der internen zellkulturbedingten Unterschiede einzusetzen, könnte ein weiteres Design mit 16 Elektrodenpaaren zum Einsatz kommen. Hierdurch wären dann 4 Elektrodenpaare je Zellkultur für die räumliche Zellanalyse verwendbar. Dies würde bessere Vergleichsmöglichkeiten hinsichtlich der differierenden Zellkulturentwicklung und eine noch sensitivere Auflösung für weitere Bromelainmessungen ergeben. Als Entwicklungsvorschlag könnten noch feiner aufgelöste Elektrodenbreiten und Elektrodenabstände im Bereich von 12-15µm einen weiteren Fortschritt in der Untersuchung der Tight Junctions ermöglichen. Die Implementierung des Mikrofluidiksystems konnte als einsetzbare Alternative zur manuell durchgeführten Versorgung der Zellkultur bestätigt werden. Hier könnte durch eine weiterentwickelte Kanalführung eine gleichmäßigere Flüssigkeitsverteilung der Zellkulturreservoirs erreicht werden.



6. Literaturverzeichnis

- [1] N. Menche, A. Schäffler und S. Schmidt, Biologie Anatomie Physiologie, München: Urban & Fischer Verlag, 2005.
- [2] F. Lottspeich und J. W. Engels, Bioanalytik, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- [3] J. H. Luong, M. Habibi-Rezaei, J. Meghrous, C. Xiao, K. B. Male und A. Kamen, "Monitoring Motility, Spreading, and Mortality of Adherent Insect Cells Using an Impedance Sensor," *Analytical Chemistry*, Nr. 73, pp. 1844-1848, 2001.
- [4] P. Artursson, K. Palm und K. Luthman, "Caco-2 monolayer in experimental and theoretical predictions of drug transport," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Nr. 1-3, pp. 280-289, 2012.
- [5] F. Völklein und T. Zetterer, Praxiswissen Mikrosystemtechnik, Wiesbaden: Vieweg, 2006.
- U. Hilleringmann, Mikrosystemtechnik: Prozessschritte, Technologien, Anwendungen, Wiesbaden: B.G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH, 2006.
- [7] MicroChem Corp., [Online]. Available: http://microchem.com/pdf/SU-8%203000%20Data%20Sheet.pdf. [Zugriff am 9 Jänner 2013].
- [8] Clariant GmbH, [Online]. Available: http://groups.mrl.uiuc.edu/dvh/pdf/AZ5214E.pdf. [Zugriff am 11 Februar 2013].
- [9] N. Schwesinger, C. Dehne und F. Adler, Lehrbuch Mikrosystemtechnik, München: Oldenbourg, 2008.
- [10] A. Crockett, M. Almoustafa und W. Vanderlinde, Trion Technology, [Online]. Available: http://www.triontech.com/pdfs/Plasma%20Delayering%20of%20Integrated%20Circuits%20V 4%20080%E2%80%A6.pdf. [Zugriff am 14 Februar 2013].
- [11] D. D. Macdonald, "Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy," *Electrochimica Acta*, Nr. 51, pp. 1376-1388, 2006.
- [12] E. P. Randviir und C. E. Banks, "Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications," *Analytical Methods*, Nr. 5, pp. 1098-1115, 2013.
- [13] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao und Q.-J. Zhang, "Impedimetric Biosensors," Journal of Bioscience and Bioengineering, Nr. 4, pp. 219-226, 2004.



- [14] F. A. Alexander, D. Tucker Price und S. Bhansali, "From Cellular Cultures to Cellular Spheroids: Is Impedance Spectroscopy a Viable Tool for Monitoring Multicellular Spheroid (MCS) Drug Models?," *IEEE reviews in Biomedical Engineering*, Nr. 6, pp. 63-76, 2013.
- [15] I. Giaever und C. R. Keese, "Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field," *Proceedings of the Mational Academy of Sciences*, Nr. 81, pp. 3761-3764, 1984.
- [16] C. R. Keese und I. Giaever, "A Biosensor that Monitors Cell Morphology with Electrical Fields," *IEEE Engineering in Medicine and Biology,* Nr. 13, pp. 402-408, 1994.
- [17] L. Wang, H. Wang, L. Wang und K. Mitchelson, "Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell-substrate impedance sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, Nr. 24, pp. 14-21, 2008.
- [18] C. Hildebrandt, H. Büth, S. Cho, Impidjati und H. Thielecke, "Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy," *Journal of Biotechnology*, Nr. 148, pp. 83-90, 2010.
- [19] H. Schwan, "Electrical Properties of Tissues and Cell Suspensions: Mechanisms and Models," in International Conference of the IEEE, Philadelphia, 1994.
- [20] H. G. Coster, T. C. Chilcott und A. C. Coster, "Impedance spectroscopy of interfaces, membranes and ultrastructures," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Nr. 40, pp. 79-98, 1996.
- [21] H. Pfützner, Angewandte Biophysik, Wien: Springer-Verlag, 2003.
- [22] D. Dean, T. Ramanathan, D. Machado und R. Sundararajan, "Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues," *Journal of Electrostatics*, Nr. 66, pp. 165-177, 2008.
- [23] J. Wegener, C. R. Keese und I. Giaever, "Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces," *Experimental Cell Research*, Nr. 259, pp. 158-166, 2000.
- [24] J. Hong, K. Kandasamy, M. Marimuthu, C. Soo Choi und S. Kim, "Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study," *Analyst*, Nr. 136, pp. 237-245, 2011.
- [25] P. Van Gerwen, W. Laureyn, W. Laureys, G. Hyberechts, M. Op De Beeck, B. Kris, J. Suls, S. Willy, P. Jacobs, L. Hermans und M. Robert, "Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors," *Sensors and actuators B*, Nr. 49, pp. 73-80, 1998.
- [26] A. Faller, M. Schünke und G. Schünke, Der Körper des Menschen, Einführung in Bau und Funktion, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.



- [27] S. Cho und T. Hagen, "Micro hole-based cell chip with impedance spectroscopy," *Biosensors & Bioelectronics*, pp. 1764-1768, 2007.
- [28] G. H. Markx und C. L. Davey, "The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: Applications in biotechnology," *enzyme and microbial technology*, Nr. 25, pp. 161-171, 1999.
- [29] N. Prevarskaya, R. Skryma und Y. Shuba, "Ion channels and the hallmarks of cancer," *Trens in Molecular Medicine*, Nr. 3, pp. 107-121, 2010.
- [30] Y. Qing-Hua und Y. Qian, "Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier," *Cell Biology International*, Nr. 33, pp. 78-82, 2009.
- [31] P. V. Balimane und S. Chong, "Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique," *Drug Discovery Today*, Nr. 10, pp. 335-343, 2005.
- [32] S. Moyes, J. Morris und K. Carr, "Culture conditions and treatments affect Caco-2 characteristics and particle uptake," *International Journal of Pharmaceutic*, Nr. 1-2, pp. 7-18, 2010.
- [33] P. D. Ward, T. K. Tippin und D. R. Thakker, "Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, Nr. 10, pp. 346-358, 2000.
- [34] B. N. Giepmans und S. C. van Ijzendoorn, "Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains," *Biochimica et Biophysica Acta*, Nr. 4, pp. 820-831, 2009.
- [35] A. L. Daugherty und R. J. Mrsny, "Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, Nr. 7, pp. 281-287, 1999.
- [36] M. Feigin und S. K. Muthuswamy, "Polarity proteins regulate mammalian cell-cell junctions and cancer pathogenesis," *Current Opinion in Cell Biology*, Nr. 21, pp. 694-700, 2009.
- [37] D. Guggi und A. Bernkop-Schnürch, "Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers," *International Journal of Pharmaceutics*, Nr. 1, pp. 141-150, 2005.
- [38] U. Bock, C. Kolac, G. Borchard, K. Koch, R. Fuchs, P. Streichhan und C.-M. Lehr, "Transport of Proteolytic Enzymes Across Caco-2-Cell Monolayers," *Pharmaceutical Research*, Nr. 15, pp. 1393-1400, 1998.
- [39] V. Grabovac und A. Bernkop-Schnürch, "Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain," *International Journal of Pharmaceutics*, Nr. 1-2, pp. 153-159, 2006.



- [40] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, Nr. 442, pp. 368-373, 2006.
- [41] S. Trietsch, T. Hankemeier und H. van der Linden, "Lab-on-a-chip technologies fo massive parallel datageneration in the life sciences: A review," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Nr. 108, pp. 64-75, 2011.
- [42] C. Yi, C.-W. Li, S. Ji und M. Yang, "Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells," *Analytica chimica acta*, Nr. 560, pp. 1-23, 2006.
- [43] J. El-Ali, P. K. Sorger und K. F. Jensen, "Cells on chips," *Nature*, Nr. 442, pp. 403-411, 2006.
- [44] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten und R. Zengerle, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications," *Chemical Society Reviews*, Nr. 39, pp. 1153-1182, 2010.
- [45] K. F. Lei, "Microfluidic Systems for Diagnostic Applications: A Review," *Journal of Maboratory Automation*, Nr. 17, pp. 1-18, 2012.
- [46] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton und H. Lu, "Microfluidics for medical diagnostics and biosensors," *Chemical Engineering Science*, Nr. 66, pp. 1490-1507, 2011.
- [47] G. Velve-Casquillas, M. Le Berre, M. Piel und P. T. Tran, "Microfluidic tools for cell biological research," *Nano Today*, Nr. 5, pp. 28-47, 2010.
- [48] D. J. Beebe, G. A. Mensing und G. M. Walker, "Physics and Applications of Microfluidics in Biology".
- [49] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux und A. Manz, "Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology," *Analytische Chemistry*, Nr. 74, pp. 2623-2636, 2002.
- [50] F. Kurth, K. Eyer, A. Franco-Obregón und P. S. Dittrich, "A new mechanobiological era: microfluidic pathways to apply and sense forces at the cellular level," *Current Opinion in Chemical Biology*, Nr. 16, pp. 400-408, 2012.
- [51] S. Seethapathy und T. Gorecki, "Application of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review," *Analytica Chimica Acta*, Nr. 750, pp. 48-62, 2012.
- [52] J. C. Mc Donald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller und G. M. Whitesides, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Electrophoresis*, Nr. 21, pp. 27-40, 2000.
- [53] A. Mata, A. J. Fleischman und S. Roy, "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems," *Biomedical Microdevices*, pp. 281-293, 2005.



- [54] Dow Corning, [Online]. Available: http://www2.dowcorning.com/DataFiles/090007c88032e6bb.pdf. [Zugriff am 10 Februar 2013].
- [55] Z. Jinwen, K. Dmitriy A., E. Amanda V. und V. Nicolas H., "Surface modification for PDMSbased microfluidic devices," *Electrophoresis*, Nr. 33, pp. 89-104, 2012.
- [56] W. George M. und S. Samuel K., "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies," *Electrophoresis*, Nr. 24, pp. 3563-3576, 2003.
- [57] H. Wu, T. W. Odom, D. T. Chiu und G. M. Whitesides, "Fabrication of Complex Three-Dimensional Microchannel Systems in PDMS," *Journal of the American Chemical Society*, Nr. 125, pp. 554-559, 2033.
- [58] MicroChemicals, [Online]. Available: http://www.microchemicals.eu/technical_information/TroubleShooter_EN.pdf. [Zugriff am 7 Februar 2013].
- [59] A. Brezina, "Entwicklung und Evaluierung eines Multi-Elektroden-Array basierten Impedanzanalysesystems zur in vitro Untersuchung von Zellwachstum und Permeabilität von Zellschichten," Institut für Festkörperelektronik der Technischen Universität Wien, Wien, 2012.
- [60] microresist technology GmbH, [Online]. Available: http://www.microresist.de/produkte/room_haas/pdf/Chrome_Etch_18_de.pdf. [Zugriff am 25 Jänner 2013].
- [61] G. Voskerician, M. S. Shive, R. S. Shawgo, H. von Recum, J. M. Anderson, M. J. Cima und R. Langer, "Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices," *Biomaterials*, Nr. 24, pp. 1959-1967, 2003.
- [62] X. Hu und X. Gao, "Multilayer coating of gold nanorods for combined stability and biocompatibility," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Nr. 13, pp. 10028-10035, 2011.
- [63] N. Jessamine M. K., G. Irina, S. Abraham D. und W. George M., "Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems," *Electrophoresis*, Nr. 23, pp. 3461-3473, 2002.
- [64] H. Makamba, J. H. Kim, K. Lim, N. Park und J. H. Hahn, "Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels," *Electrophoresis*, Nr. 24, pp. 3607-3619, 2003.
- [65] A. M. Christensen, D. A. Chang-Yen und B. K. Gale, "Characterization of interconnects used in PDMS microfluidic systems," *J. Micromech. Microeng.*, Nr. 15, pp. 928-934, 2005.



- [66] ELVESYS MICROFLUIDIC INNOVATION CENTER, [Online]. Available: http://www.elveflow.com/microfluidic-accessories/23-g-tygon-tubing-id-0-5mm-od-1-5mm-150m. [Zugriff am 15 Jänner 2013].
- [67] G. Adam, P. Läuger und G. Stark, Physikalische Chemie und Biophysik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [68] S. Satyanarayana, R. N. Karnik und A. Majumdar, "Stamp-and-Stick Room-Temperature Bonding Technique for Microdevices," *JMEMS*, Nr. 14, pp. 392-399, 2005.
- [69] M. A. Eddings, M. A. Johnson und B. K. Gale, "Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices," *J. Micromech. Microeng.*, Nr. 18, p. 067001, 2008.
- [70] P. Fastermann, 3D Druck/Rapid Prototyping, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [71] ZCorporation, [Online]. Available: http://www.zcorp.com/en/Products/3D-Printers/Spectrum-Z510/Technical-Specifications308/spage.aspx. [Zugriff am 18 Jänner 2013].
- [72] Dimension, [Online]. Available: http://www.dimensionprinting.com/3d-printers/printingproductspecs768series.aspx. [Zugriff am 18 Jänner 2013].
- [73] S. Schmitz, Der Experimentator: Zellkultur, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009.
- [74] K. Barker, Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger, München: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- [75] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian und L. Yahia, "Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisns," *International Journal of Pharmaceutics*, Nr. 226, pp. 1-21, 2001.
- [76] Systec GmbH, [Online]. Available: http://www.systeclab.de/download/systecvserie0408d.pdf. [Zugriff am 4 Februar 2013].
- [77] Sciospec Scientific Instruments GmbH, [Online]. Available: http://sciospec.de/files/uploaded/downloads/Datasheets/Sciospec_ISX-3_Datenblatt.pdf.
 [Zugriff am 30 Jänner 2013].
- [78] Sciospec Scientific Instruments GmbH, [Online]. Available: http://sciospec.de/files/uploaded/downloads/Datasheets/Sciospec_MEArack_Datenblatt.pdf . [Zugriff am 30 Jänner 2013].



[79] kd Scientific, [Online]. Available:

http://www.kdscientific.com/downloads/KDS%20Literature/Brochures_Datasheets/KDS_Leg ato_110_Datasheet.pdf. [Zugriff am 2 Februar 2013].

- [80] K. Ziolkowska, E. Jedrych, R. Kwapiszewski, J. Lopacinska, M. Skolimowski und M. Chudy, "PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage," Sensors and Actuators B: Chemical, Nr. 145, pp. 533-542, 2010.
- [81] P. J. Hung, P. J. Lee, S. Poorya, R. Lin und L. Luke P., "Continuous Perfusion Microfluidic Cell Culture Array for High-Throughput Cell-Based Assays," *Biotechnology and Bioengineering*, Nr. 89, pp. 1-8, 2005.
- [82] P. J. Hung, P. J. Lee, P. Sabounchi, N. Aghdam, R. Lin und L. P. Lee, "A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughout mammalian cell culture array," *Lab on a Chip*, Nr. 5, pp. 44-48, 2005.



7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der Zielsetzungen	2
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung für die unterschiedlichen Ergebnisse der	
Photolacktypen [6]	5
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Belichtungsverfahren in der Photolithographie:	
(a) Kontaktbelichtung, (b) Proximitybelichtung, (c) Projektionsbelichtung [6]	6
Abbildung 2.3: Schematische Ansicht der physikalische Gasphasenabscheidungen	7
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer thermischen Aufdampfanlage [5]	8
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer DC-Sputteranlage [5]	9
Abbildung 2.6: Schematische Ansicht chemische Gasphasenabscheidungen.	9
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung einer PECVD-Anlage [6].	. 10
Abbildung 2.8: Schematische Ansicht der Ätzverfahren	. 11
Abbildung 2.9: Schematische Darstellung einer RIE-Anlage [5]	. 12
Abbildung 2.10: Ersatzschaltbild des biologischen Systems [14]	. 14
Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der α -, β -, γ -Dispersion der relative Permittivität	
eines biologischen Systems [20]	. 15
Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Geometrieabhängigkeit der elektrischen	
Feldverteilung [13].	. 17
Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des Zellaufbaus einer Epithelzelle und deren	
Bestandteile [1]	. 18
Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Lipiddoppelschicht mit spezifischen	
Membranproteinen [1]	. 19
Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der vorhandenen Epithelformen und deren	
Vorkommen [1]	. 21
Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Vergrößerung der Resorptionsfläche des	
Dünndarms [11]	. 22
Abbildung 2.17: (a) Zotten des Duodenum; (b) Mikrovilli des Duodenum [12]	. 22
Abbildung 2.18: Schematische Darstellung der Tight Junction und der Adherens Junction eines	
Epithelgewebes [19]	. 23
Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der Arbeits- und Systemabläufe	. 30
Abbildung 3.2: Schematische Draufsicht des IDES-4 Elektrodenpaardesigns:	
(a) Gesamtdraufsicht, (b) Detailansicht eines IDES-Elektrodenpaares [59]	. 32
Abbildung 3.3: Schematische Draufsicht des selbst entwickelten IDES-8 Elektrodenpaardesigns:	
(a) Gesamtdraufsicht, (b) Detailansicht eines IDES-Elektrodenpaares	. 33
Abbildung 3.4: Schematische Draufsicht der Elektrodenpaare mit definierter Elektrodenfläche	
und Zell-Reservoir	. 36
Abbildung 3.5: Schematische Ansicht der Prozessierungsschritte für den MEA-Chip	. 37
Abbildung 3.6: PDMS-Master mit einem Biopsy Punch	. 38
Abbildung 3.7: Schematische Ansicht der Prozessierungsschritte für den PDMS-Master	. 40
Abbildung 3.8: PDMS-Master: (a) Liquid-Multiplexer; (b) Zellkultursystem	. 41


Abbildung 3.9: Schematische Ansicht: (a) Mikrofluidiksystem mit Zellmedium und Flussrichtung;	
(b) geschliffene Kanüle	. 42
Abbildung 3.10: Foto des mit Tinte gefüllten Mikrofluidiksystems	. 43
Abbildung 3.11: Hämocytometer vom Neubauertyp	. 51
Abbildung 3.12: Foto des Sciospec ISX-3	. 52
Abbildung 3.13: Foto des MEAracks	. 53
Abbildung 3.14: Zellsensor gefüllt mit Medium	. 53
Abbildung 3.15: Grafische Oberfläche der Mess- und Steuerungssoftware	. 54
Abbildung 3.16: Grafische Oberfläche der Messelektrodenauswahl	. 55
Abbildung 3.17: Spritzenpumpe KDS Legato 110	. 56
Abbildung 3.18: Grafische Oberfläche der Steuerungssoftware für die Spritzenpumpe	. 57
Abbildung 3.19: Schematische Darstellung des Messsystems und der Mikrofluidikversorgung	. 58
Abbildung 4.1: gedruckter PMS-Master	. 61
Abbildung 4.2: Spektraldarstellung 1 der normierten Impedanzänderung	. 63
Abbildung 4.3: Detailansicht 1 der Spektraldarstellung der Zellkultur2	. 64
Abbildung 4.4: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 2 vor und nach	
der Zellläsion	. 66
Abbildung 4.5: Spektraldarstellung 2 der normierten Impedanzänderung	. 69
Abbildung 4.6: Detailansicht 2 der Spektraldarstellung der Zellkultur1.	. 70
Abbildung 4.7: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 100kHz von Zellkultur 1 vor und nach	
der Bromelainzugabe	. 72
Abbildung 4.8: Spektraldarstellung 3 der normierten Impedanzänderung.	. 75
Abbildung 4.9: Detailansicht 3 der Spektraldarstellung der Zellkultur3	. 76
Abbildung 4.10: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 3 vor und nach	
der Bromelainzugabe	. 78
Abbildung 4.11: Detailansicht 4 der Spektraldarstellung der Zellkultur1	. 80
Abbildung 4.12: Zeitliche Entwicklung der Impedanz bei 300kHz von Zellkultur 1, der	
geschädigten Zellkultur.	. 82
Abbildung 4.13: Schematische Übersicht des Mikrofluidiksystems und dessen Flussrichtung	. 84
Abbildung 4.14: Übersicht der Impedanzdarstellung und Phasendarstellung bei 300kHz	. 85



8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Ionen-Konzentrationen der zellulären Membran [21]	. 20
Tabelle 3.1: Prozessschritte für die MEA-Chip Herstellung	. 33
Tabelle 3.2: Prozessparameter für von Ardenne LS 320	. 34
Tabelle 3.3: Prozessparameter für Oxford Plasma 80 Plus	. 35
Tabelle 3.4: Prozessparameter für Oxford Plasmalab System 100	. 35
Tabelle 3.5: Parameter der Langzeitmessung	. 59
Tabelle 3.6: Parameter der Spritzenpumpe	. 59
Tabelle 4.1: Parameterübersicht 1 der messungsspezifischen Daten	. 62
Tabelle 4.2: Parameterübersicht 2 der messungsspezifischen Daten	. 68
Tabelle 4.3: Parameterübersicht 3 der messungsspezifischen Daten	. 74