

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Entwicklung von Zellkultursystemen mit integrierter Sensorik und Aktuatorik für die Überwachung von Knochenzellkulturen

vorgelegt von
Sebastian Marcus Bonk,
geb. am 01.03.1983 in Berlin-Lichtenberg

Rostock, 31. August 2016

Wissenschaftliche Betreuung:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa, Universität Rostock
Dr. rer. nat. Werner Baumann, Universität Rostock

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Jan Gimsa, Universität Rostock

Prof. Dr.-Ing. Herman Seitz, Universität Rostock

Verteidigt am:

07.04.2017

Wer weitermacht, kann gar nicht verhindern, dass er irgendwann auch Erfolg hat.

Thomas Alva Edison (1847 - 1931), US-amerikanischer Erfinder

Danksagung

Einer großen Anzahl an Personen schulde ich Dank, da sie mich auf vielfältigste Art und Weise unterstützt und somit geholfen haben diese Arbeit zu realisieren.

Prof. Dr. Jan Gimsa, der mich als Promotionsstudent akzeptierte, mir beim Schreiben der Publikationen half und natürlich für die Bereitstellung der benötigten finanziellen und technischen Ressourcen.

Dr. Werner Baumann, der mich in dieser Arbeit mit betreute, sich immer die Zeit nahm meine Probleme anzuhören und der ein sehr wichtiger Ansprechpartner in allen Belangen der Experimentplanung, der Problembehandlung und nicht zuletzt der Schreibearbeit war.

Ich danke der **DFG** für die Förderung des Graduiertenkollegs **GRK1505 „WELISA“** sowie dem Europäischen Fond für regionale Entwicklung (**V220-630-08-TFMV-F-011**) und dem Europäischen Sozialfond (**V220-630-08-TFMV-F-011**) für die Finanzierung.

Jürgen Josupeit danke ich für die Möglichkeit bei ihm die Substrate zu reinigen und zu besputtern und **Paul Oldorf** und **Rigo Peters** für ihre Kooperation bei der Laserbearbeitung.

Marko Kaeselitz, für die Vorarbeiten an der ersten Chipversion.

Reik Modrozynski, für die Vielzahl an Experimenten, die er mir abgenommen hat. Besonders für das Vorbereiten der Medien und Substrate, die ich für diese Arbeit benötigt habe. Auch für die legendären Videospieleabende in denen man mal Dampf ablassen konnte, danke ich ihm.

Marco Stubbe, **Sebastian Bühler** und **Thomas Weihe** danke ich für die hilfreichen Diskussionen und Hilfestellungen in Bezug auf die Messungen und die Zellkultur. Außerdem für die gemeinsam verbrachte Zeit auf Tauchgängen, auf der Schießbahn oder in verschiedenen Bars und Clubs, wodurch sie mir geholfen haben auch mal abzuschalten.

Thomas Kröger danke ich für seine Hilfe bei der Elektrotechnik und für die Kooperation bezüglich des Fräsbohrplotters. **Carsten Tautorat** danke ich für die hilfreichen Erläuterungen zur Elektrotechnik und seinen Rat bei der Problembewältigung mit den PalmSens Messgeräten.

Phillip Wysotzki für seine Hilfe bei der Programmierung in Scilab die angeregten technischen Diskussionen und seine Partnerschaft bei unserem privaten Projekt. **Anne-Marie Galow** und **Matthias Nissen** danke ich für die hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Weiterhin danke ich allen Personen mit denen ich zusammen gearbeitet habe und die durch aktive Hilfe oder einfach durch ihre kollegiale Art dazu beigetragen haben diese Arbeit zu schaffen: **Mandy Rickler**, **Sabine Walther**, **Ernst-Dieter Klinkenberg**, **Steffen Howitz**, **Thomas Gering**, **Stefan Gassman**, **Kiran Kumar**, **Marion Dau**, **Petra Gefken**, **Oliver Klink**, **Philipp Köster**, **Christoph Litwinski**, **Patrick Elter**, **Stefan Polnick**, **Piroska Feher**, **Anna Gyrova**.

Und natürlich meinen **Eltern** und meiner Freundin **Claudia** für ihre Liebe und ihre Unterstützung.

Abstract

Especially in the field of regenerative medicine, is limited by the complex structure of the bone itself. The microenvironment of the cells is widely unknown in the natural bone and at the interface of bone and implant materials. With the focus on bone like cells it is important to control oxygen and acidification as main metabolic parameters and to determine the cell reaction on parameter changes, to reach a better understanding of differentiation and the calcification process in bone and *in vitro*. A control of metabolic parameters and of the adhesion in 2D would highlight pathways for 3D cell culture and *in vitro* bone formation.

For this, the establishment of cell culture monitoring systems is essential because they allow for continuous and marker free measurement of metabolic parameters.

This thesis presents the development of a cell culture monitoring system and its use in cell culture with MC3T3-cells. The developed system enables the use of electrical and optical sensors for the measurement of oxygen, pH and adhesion and the use in anaerobic experimental approaches. The development of the system included multiple iterations in fluidics, body and chip design to optimize the handling. The fluidics was simulated to decrease problems in the fluidics handling and bubble formation. The system body (carrier of the microfluidics) was optimized to enhance its experimental flexibility and handling properties. Furthermore a new production method, - the ultra-short pulse laser ablation - was implemented to decrease the time and costs of the sensor chip production. It could be shown that this technique is able to produce structures in platinum and ITO with a quality comparable to photo-masks based photolithography. Further, it allows to overcome the size limitation of 4''-wafer technology so that microscopic slides could be used as chip substrates. The platinum or ITO layers of such a chip could be processed between 3 minutes (platinum) and 30 s (ITO). Also the opening of windows in the passivation of the structures in Si₃N₄ with thicknesses of 100 nm to 1 μm was successful.

On the sensor chips, the Si₃N₄-layer, previously used on ISFETs, was used as sensitive material in potentiometric pH-sensors the first time. Different layer thicknesses were compared with respect to their sensitivity and reproducibility. Sensitivities up to -53.8 ±1.8 mV/pH for the finally used, self-produced 60 nm layers, with maximum drift rates of 0.151 mV/h were found at room temperature.

Because the amperometric oxygen sensors had no oxygen selective membrane, the sensors had to be characterized with respect to influences of the components in the cell culture medium. Cyclic voltammetry measurements proved that the cell culture medium contained no electro-active substances which influenced the measurements. Because of the material and the configuration, it was necessary to reduce the working potential to -650 mV vs. Ag/AgCl-reference. A sensor sensitivity of 2.27 ±0.04 nA at 37 °C could be reached.

All sensors had been tested in cell culture to prove their stability, biocompatibility and ability for the control of proliferating MC3T3 cells.

Zusammenfassung

Die Forschung am Knochen, besonders im Bereich der regenerativen Medizin ist limitiert durch dessen Komplexität und mechanischen Eigenschaften. Die Mikroumgebung der Zellen im Knochen ist weitgehend unbekannt, wie auch die Grenzflächeneigenschaften zwischen Knochen und Implantaten. Im Hinblick auf die Knochenzellen ist es wichtig den Sauerstoffgehalt sowie die Ansäuerung durch Zellen überwachen zu können. Die Untersuchung der Reaktion der Zellen auf Änderungen dieser Parameter ermöglicht ein tieferes Verständnis für die Differenzierung und besonders die Kalzifikation im Knochen und *in vitro*. Eine Kontrolle der metabolischen Parameter sowie der Adhäsion in 2D eröffnet somit auch neue Wege für die 3D-Zellkultur und *in vitro*-Knochenbildung. Um dies zu erreichen ist die Etablierung von Zellkultur-Überwachungssystemen essentiell, da diese eine kontinuierliche und markierungsfreie Messung der metabolischen Aktivität ermöglichen.

In dieser Arbeit werden die Entwicklung eines Zell-Monitoring-Systems (ZMS) und seine Nutzung mit MC3T3-E1 Zellen präsentiert. Das finale System ermöglicht die Nutzung von elektrischen und optischen Sensoren für die Messung von Sauerstoff, pH und Adhäsion sowie die einfache Herstellung anaerober Bedingungen. Die Entwicklung umfasste multiple Varianten der Fluidik, der Systemtorsos (Träger der Fluidik) und der Chips. Die Fluidik wurde simuliert, um die Blasenbildung zu minimieren und das Handling zu vereinfachen, während die Modifikation des Torsos das Spektrum möglicher Anwendungen maximieren sollte. Darüber hinaus wurde mit der – Ultrakurzpulslaserablation – eine neue Fertigungstechnik implementiert, welche die Produktionszeiten und die Kosten senkt. Es wurde die Fertigung von Strukturen in Platin und ITO realisiert. Die Auflösungen sind vergleichbar mit den auf Photomasken basierenden, photolithographischen Techniken. Durch Umgehung von 4-Zoll Wafer als Substrat konnten Mikroskopobjektträger als Substrate verwendet werden. Die Prozessierung der Platin und ITO Schichten benötigte zwischen 30 s (ITO) und 3 min (Platin). Auch die Fertigung von Öffnungen in der Si₃N₄ Passivierung war möglich, wobei Schichtdicken von 100 nm bis 1 µm bearbeitet wurden.

Das Si₃N₄ welches zuvor nur auf ISFETs genutzt wurde, wurde erstmals als sensitives Material für potentiometrische pH-Sensoren verwendet. Verschiedene Schichtdicken wurden auf ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit untersucht. Für die finalen, selbst hergestellten 60 nm Schichten wurden bei Raumtemperatur Sensitivitäten von $-53,8 \pm 1.8$ mV/pH mit maximalen Driftraten von 0,151 mV/h gemessen.

Die amperometrischen Sauerstoffsensoren verfügten nicht über eine Sauerstoffselektive Membran, weswegen sie besonders im Hinblick auf den Einfluss des Mediums charakterisiert wurden. Messungen mit Zyklovoltammetrie zeigten, dass der Einfluss der Mediumkomponenten vernachlässigbar ist. Aufgrund des Materials und der Konfiguration war die Reduktion des Arbeitspotentials auf -650 mV vs. Ag/AgCl Referenz notwendig. Trotzdem konnten bei 37° C Sensitivitäten von $2,27 \pm 0,04$ nA gemessen werden. Alle Sensoren wurden in Zellkultur getestet um ihre Stabilität, Biokompatibilität und Nutzbarkeit zur Überwachung der Zellkultur zu überprüfen

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>VII</u>
<u>1 EINLEITUNG UND MOTIVATION</u>	<u>- 1 -</u>
1.1 BIOLOGISCH-MEDIZINISCHER HINTERGRUND	- 1 -
1.1.1 ZELLYKLUS	- 1 -
1.1.2 ZELLTOD	- 1 -
1.1.3 ZELLEN DER ZELLKULTUR	- 1 -
1.1.4 ZELLULÄRER METABOLISMUS	- 2 -
1.1.5 DAS CARBONATPUFFERSYSTEM	- 3 -
1.1.6 DAS CARBONATPUFFERSYSTEM IN DER ZELLKULTUR	- 3 -
1.1.7 DER KNOCHEN	- 3 -
1.1.8 IMPLANTAT-KNOCHEN-WECHSELWIRKUNGEN	- 5 -
1.1.9 MECHANISCHE STIMULATION ZUR FÖRDERUNG DES KNOCHENWACHSTUMS	- 6 -
1.2 ZELLKULTURÜBERWACHUNG	- 7 -
1.2.1 ZELLKULTUR	- 7 -
1.2.2 EINZELPUNKTMESSUNGEN	- 7 -
1.2.3 KONTINUIERLICHE, MARKIERUNGSFREIE ÜBERWACHUNG	- 8 -
1.2.4 ZELL-MONITORING-SYSTEME (ZMS)	- 8 -
1.3 ZIELE DER ARBEIT	- 11 -
<u>2 STAND DER FORSCHUNG</u>	<u>- 12 -</u>
2.1 KNOCHENZELLFORSCHUNG	- 12 -
2.1.1 MARKER UND INDIKATOREN FÜR DIE CHARAKTERISIERUNG VON KNOCHENZELLEN	- 12 -
2.1.2 EINFLUSS DER MATERIALOBERFLÄCHE AUF OSTEOLASTENWACHSTUM	- 13 -
2.1.3 ENTWICKLUNG ABBAUBARER TRÄGERMATERIALIEN	- 13 -
2.1.4 ÜBERGANG VON 2D-ZU 3D-ZELLKULTUR	- 14 -
2.1.5 STIMULATION ZUR FÖRDERUNG DES WACHSTUMS	- 15 -
2.1.6 KULTUR IN BIOREAKTOREN	- 17 -
2.1.7 EINFLUSS VON PH-WERT UND SAUERSTOFFKONZENTRATION	- 17 -
2.2 OPTISCHE SENSORIK	- 19 -

2.3 ELEKTROCHEMISCHE SENSOREN	- 20 -
2.3.1 SAUERSTOFFSENSOREN	- 20 -
2.3.2 PH-SENSOREN	- 22 -
2.3.3 INTERDIGITIERENDE ELEKTRODENSTRUKTUREN (IDES)	- 26 -
2.4 MIKROFLUIDIK	- 27 -
2.4.1 MIKROFLUIDIKSYSTEME	- 27 -
2.4.2 ZELL-MONITORING-SYSTEME	- 27 -
2.4.3 ANSCHLUSS UND VERBINDUNGSTECHNIK	- 28 -
2.5 MIKROFLUIDIK BASIEREND AUF PDMS	- 28 -
2.6 MIKROFLUIDIK IN GLAS	- 29 -
2.7 KONVENTIONELLE CHIPFERTIGUNG	- 29 -
3 MATERIAL UND METHODEN	- 32 -
3.1 SOFTWARE	- 32 -
3.2 GERÄTE UND FLUIDIKKOMPONENTEN	- 33 -
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	- 34 -
3.4 SENSORCHIPS	- 35 -
3.4.1 EXTERNE PHOTOLITHOGRAPHISCHE FERTIGUNG	- 35 -
3.4.2 BOHRUNG DER SENSORCHIPS	- 36 -
3.4.3 LASERGESTÜTZTE FERTIGUNG	- 36 -
3.5 MIKROFLUIDIK	- 38 -
3.5.1 HERSTELLUNG DER GUSSFORMEN FÜR DAS MICCELL®-SYSTEM	- 38 -
3.5.2 HERSTELLUNG DER GUSSFORMEN FÜR DIE SLV-SYSTEME	- 38 -
3.5.3 GIEßEN DER FLUIDIK MIT PDMS	- 38 -
3.6 FERTIGUNG DER ZELLKULTURSYSTEME MIT FRÄSBOHRPLOTTER CCD/2	- 38 -
3.7 ANSCHLUSS UND VERBINDUNGSTECHNIK	- 39 -
3.7.1 ELEKTRISCHE ANBINDUNG	- 39 -
3.7.2 OPTISCHE ANBINDUNG	- 39 -
3.7.3 FLUIDISCHE ANBINDUNG	- 40 -
3.8 SENSORCHARAKTERISIERUNG	- 41 -
3.8.1 SAUERSTOFFSENSOREN	- 41 -
3.8.2 PH-SENSOREN	- 42 -
3.8.3 IDES	- 43 -
3.9 ZELLKULTUR	- 43 -
3.9.1 ZELLINIEN	- 43 -
3.9.2 KULTURMEDIEN	- 44 -

3.9.3	ETABLIERUNG DER ZELLKULTUR IM BRUTSCHRANK	- 45 -
3.9.4	ZELLKULTURASSAYS	- 46 -
3.9.5	BESCHICHTUNG VON OBERFLÄCHEN	- 46 -
3.9.6	VARIATION DER KULTUROBERFLÄCHE	- 47 -
3.9.7	ZELLKULTUR IN DEN SYSTEMEN	- 47 -
3.9.8	ANSÄUERUNGSMESSUNGEN	- 48 -
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	- 49 -
4.1	CHIP-DESIGN	- 49 -
4.1.1	DESIGN 2D-VERSION (V1)	- 49 -
4.1.2	DESIGN 2D-VERSION (V2)	- 50 -
4.1.3	2D-LASERVARIANTE (SLV)	- 51 -
4.1.4	ÄNDERUNGEN DER SENSORABMESSUNGEN	- 51 -
4.2	CHIPHERSTELLUNG	- 52 -
4.2.1	KONVENTIONELLE FERTIGUNG	- 52 -
4.2.2	LASERGESTÜTZTE FERTIGUNG	- 53 -
4.2.3	DISKUSSION ZUR FERTIGUNG	- 58 -
4.3	SYSTEMENTWICKLUNG	- 60 -
4.3.1	FLUIDIKVARIANTEN	- 60 -
4.3.2	FERTIGUNG VON KULTURSYSTEMEN	- 67 -
4.4	ELEKTRISCHE ANBINDUNG	- 75 -
4.4.1	KONTAKTIERUNG DER CHIPS	- 75 -
4.4.2	ANORDNUNG DER CHIP-VERBINDUNGEN	- 76 -
4.4.3	MUX-ANSCHLUSSPLATINEN	- 77 -
4.4.4	SOFTWAREGESTÜTZTE AUSWERTUNG	- 78 -
4.5	FLUIDISCHE ANBINDUNG	- 79 -
4.5.1	ANSCHLUß DER PUMPEN	- 79 -
4.5.2	STIMULATION	- 80 -
4.5.3	FLUIDISCHE ANBINDUNG DER GeSiM-VARIANTEN	- 82 -
4.5.4	SLV-SYSTEME	- 83 -
4.5.5	DISKUSSION DER ANSCHLUSSKONZEPTE	- 84 -
4.6	SENSORCHARAKTERISIERUNG	- 85 -
4.6.1	SAUERSTOFFSENSOREN	- 85 -
4.6.2	pH-SENSOREN DER GeSiM CHIPS	- 92 -
4.6.3	SENSOREN DER SLV-CHIPS MIT GESPUTTERTEM Si ₃ N ₄	- 97 -
4.6.4	ZUSAMMENFASSUNG pH-SENSOREN	- 99 -

4.6.5	INTERDIGITIERENDE ELEKTRODENSTRUKTUREN (IDES)	- 101 -
4.6.6	REFERENZELEKTRODEN	- 108 -
4.7	OPTIMIERUNG DER ZELLKULTURPARAMETER	- 108 -
4.7.1	GRÜNDE FÜR DIE ERHÖHUNG DES PH-WERTES	- 108 -
4.7.2	BESTIMMUNG DER PH-WERT-ABHÄNGIGKEIT DES ZELLWACHSTUMS	- 109 -
4.7.3	EINFLUSS DER OBERFLÄCHE	- 112 -
4.8	ZELLKULTUR IN DEN SYSTEMEN	- 114 -
4.8.1	ZELLKULTUR IN DEN GESIM-SYSTEMEN	- 114 -
4.8.2	SENSORMESSUNGEN IN ZELLKULTUR	- 115 -
4.8.3	ZELLKULTUR IN DEN SLV-SYSTEMEN	- 118 -
4.8.4	SENSORMESSUNGEN IN ZELLKULTUR	- 120 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 126 -
6	AUSBLICK	- 130 -
	LITERATURVERZEICHNIS	- 131 -
	ANHANG	- 147 -
	PUBLIKATIONSLISTE	- 161 -
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	- 163 -
	LEBENS LAUF	- 164 -

Abkürzungsverzeichnis

μM	μmol
$\mu\epsilon$	μstrain , Einheit der Dehnung
2-EK, 3-EK	2-Elektrodenkonfiguration, 3-Elektrodenkonfiguration
AFM	Atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
ALP	Alkalische Phosphatase
AMEM	α -Modified Eagles Medium
AMEM-CF	α -Modified Eagles Medium (ungepuffert)
Aqua dest.	Destilliertes, filtriertes Wasser
ATP-Lite	ATP-lite Assay
CAD	AutoCAD Mechanical 2010 [®]
DIV	Days <i>in vitro</i> (Tage in Kultur)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMEM-CF	Dulbecco's Modified Eagles Medium Carbonatfrei (ungepuffert)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH
ET μ P	Elektrothermische Mikropumpe
EZM	Extrazelluläre Matrix
2A	Fluidik mit 2 Anschlüssen
2A-U	Fluidik mit 2 Anschlüssen und Umlaufkanal
3A-S	Fluidik mit 3 Anschlüssen und Speicher
4A-S	Fluidik mit 4 Anschlüssen und Speicher (Sg=Speicher groß)
4A-OB	Fluidik mit 4 Anschlüssen ohne Blockstrukturen im Kulturbereich
FBS	Fetal bovine serum
HA	Hydroxylapatit
IDES	Interdigitierende Elektrodenstruktur
ISFET	Ionensensitiver Feldeffekttransistor
ITO	Indium-Zinn-Oxid
MC3T3-E1	Maus-Calvaria-Zelllinie (MC3T3-E1)
MEA	Multi-Elektroden-Array
MG63	Menschliche Osteosarcoma Zelllinie, MG63
MSC	Multisensorchip
MUX	Multiplexer

MW	Mittelwerte
OCP	Open Circuit Potential (Leerlaufspannung)
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECVD	Plasma-enhanced chemical vapour deposition,
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Penicillin-Streptomycin-Lösung
RIE	Reactive ion etching (Reaktives-Ionen-Ätzen)
SCE	Silber-Chlorid Referenzelektrode (Ag/AgCl-Referenzelektrode)
SLV	Schweißtechnische Lehr und Versuchsanstalt Mecklenburg Vorpommern
SLV-Chips	Durch Laserbearbeitung am SLV gefertigte Sensorchips
UKP-Laser	Ultrakurzpulslaser, Laser mit Pulsdauern im Picosekundenbereich
V1-Chip	Chip der 1. Generation
V2-Chip	Chip der 2. Generation
V2R-Chip	Chips der 2. Generation, radiale Ausrichtung für 3D Aufbau
ZMS	Zell-Monitoring-System
ZV	Zyklovoltammogramme

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Vereinfachte metabolische Prozesse von Zellen.	- 2 -
Abbildung 1-2: Darstellung des menschlichen Röhrenknochens.	- 4 -
Abbildung 1-3: Darstellung des Remodeling Prozesses nach Frost [17].	- 5 -
Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung der Nutzungsgebiete der Zellkulturüberwachung.	- 9 -
Abbildung 2-1: Sauerstoffelektroden von Clark und dazugehörige Messung des Reduktionsstromes.	- 21 -
Abbildung 2-2: Exemplarische Darstellung eines FETs und dem Strom-Spannungs-Diagramm.	- 23 -
Abbildung 2-3: Verhalten von Spannung (V) und Strom (I) als Funktion der Zeit von Wechselstrom.	- 26 -
Abbildung 2-4: Ersatzschaltbild für eine elektrochemische Zelle.	- 27 -
Abbildung 3-1: Aus Leiterplattenmaterial gefräste Halterungen für die Besputterung der pH-Sensoren	- 36 -
Abbildung 3-2: Anschlusskonzepte für das SLV-System.	- 40 -
Abbildung 4-1: Fluidikstruktur mit überlagertem MSC-Aufbau 2D-Version (V1).	- 49 -
Abbildung 4-2: Fluidikstruktur mit überlagertem MSC-Aufbau 2D-Version (V2).	- 50 -
Abbildung 4-3: Darstellung des Wafers für die V2-Chips.	- 53 -
Abbildung 4-4: Vergleich der Platinstrukturen (A,C) mit den ITO Strukturen (B,D).	- 55 -
Abbildung 4-5: AFM Abbildungen eines IDES Fingers.	- 55 -
Abbildung 4-6: AFM, REM und optische Kontrolle der gelaserten Substrate	- 56 -
Abbildung 4-7: AFM-Messung der Oberflächenrauigkeit des gelaserten Bereiches bei 11 % Laserleistung.	- 57 -
Abbildung 4-8: Mikroskopische Aufnahmen der Parameterstudie zum Abtrag von Si_3N_4 .	- 57 -
Abbildung 4-9: Gelaserte SLV-Chips.	- 58 -
Abbildung 4-10: Übersicht über die gefertigten Fluidiksysteme mit Kurzbezeichnung.	- 60 -
Abbildung 4-11: Darstellung des Entwicklungsverlaufes der Fluidiksysteme.	- 61 -
Abbildung 4-12: COMSOL® Simulation (2D) der finalen Version von Marko Kaeselitz.	- 62 -
Abbildung 4-13: 3D-COMSOL Simulation der Strömungsverteilung in mm/s.	- 64 -
Abbildung 4-14: 3D-Fluidiksimulationen für die Stimulationssysteme mit 250 μm Höhe.	- 66 -
Abbildung 4-15: Das GeSiM-Standardsystem für die Verwendung mit 22x27 mm^2 großen Chips.	- 67 -
Abbildung 4-16: Verschiedene Versionen der Gehäuse für die GeSiM-Chips.	- 68 -
Abbildung 4-17: Darstellung der Gußform.	- 69 -
Abbildung 4-18: Darstellung der Zellkultursysteme für die Stimulation (SLV-System).	- 71 -
Abbildung 4-19: Formwerkzeuge für den Guss der Mikrofluidik.	- 72 -
Abbildung 4-20: Schematische Darstellung der Gussteile aus Abbildung 4-19.	- 73 -
Abbildung 4-21: Kontaktbereich der Flexplatine zum Sensorchip.	- 75 -
Abbildung 4-22: Anschlusszuordnung der verschiedenen Chipvarianten.	- 76 -
Abbildung 4-23 Adapterplatinen für ScioSpec-Messsystem	- 77 -
Abbildung 4-24: Gemessene reale Strömungs-geschwindigkeit.	- 80 -
Abbildung 4-25: Dehnung im Deckel des Systems und durch Stimulation hervorgerufene Strömungspeaks.	- 80 -
Abbildung 4-26: Komponenten der GeSiM-Zellkultursysteme.	- 82 -
Abbildung 4-27: Zyklovoltammogramme eines Sauerstoffsensors.	- 85 -
Abbildung 4-28: Zyklovoltammogramme mit zunehmender Scanrate in Medium mit FBS.	- 86 -
Abbildung 4-29: Exemplarische Messung in Medium mit 10 % FBS bei 0,05 V/s.	- 87 -
Abbildung 4-30: Amperometrische Messungen über 60 s.	- 88 -

<i>Abbildung 4-31: Exemplarische Messungen eines gelaserten Sensors.</i>	- 89 -
<i>Abbildung 4-32: Exemplarische Messungen eines Sensors vor und nach PDL-Beschichtung.</i>	- 91 -
<i>Abbildung 4-33: Kurven der pH-Sensitivitätsmessungen mit Schichtdicken von 20 nm, 40 nm und 60 nm.</i>	- 92 -
<i>Abbildung 4-34: Optisch erkennbare Verfärbung der pH-Sensoren in Folge der unterschiedlichen Schichtdicken.</i>	- 92 -
<i>Abbildung 4-35: Darstellung der berechneten Sensitivitäten mehrerer Chips (N=3) in Abhängigkeit der Messrichtung.</i>	- 93 -
<i>Abbildung 4-36: Darstellung der Mittelwerte der Potentiale mehrerer Sensoren.</i>	- 94 -
<i>Abbildung 4-37: Darstellung der Potentiale bei sich wiederholenden Messungen.</i>	- 95 -
<i>Abbildung 4-38: Wiederholte Messungen mit GeSiM-Chip im pH Bereich von pH 6 bis pH 8.</i>	- 95 -
<i>Abbildung 4-39: Beschichtungsmessungen mit 60 nm Sensor.</i>	- 97 -
<i>Abbildung 4-40: Messwerte der selbstgefertigten pH-Sensoren auf den Chips nach 10 s in Messlösung.</i>	- 98 -
<i>Abbildung 4-41: Wiederholte Messungen mit SLV-Chip im pH Bereich von pH 6 bis pH 8.</i>	- 98 -
<i>Abbildung 4-42: IDES Messungen im Fluidiksystemen (4A-OB).</i>	- 102 -
<i>Abbildung 4-43: Änderung der Kapazitätsdifferenz ($-\Delta C$) und C_{PK}-Werte der Messungen über 11 Tage in Kultur.</i>	- 103 -
<i>Abbildung 4-44: Ideale Messung in Kultursystem (4A-Sg) mit V2-Chip ohne Beschichtung.</i>	- 105 -
<i>Abbildung 4-45: IDES Messungen mit den SLV-Chips im Stimulationssystem.</i>	- 107 -
<i>Abbildung 4-46: Aufnahme einer Referenzelektrode.</i>	- 108 -
<i>Abbildung 4-47: Vergleich des pH abhängigen Wachstums von MC3T3-E1 und MG63 Zellen.</i>	- 109 -
<i>Abbildung 4-48: WST-Messungen mit MC3T3-E1 Zellen in Medium (AMEM-CF) mit verschiedenen pH-Werten.</i>	- 110 -
<i>Abbildung 4-49: MC3T3-E1 Proliferation bei pH 7,4 und pH 7,8 mit verschiedenen Zusätzen.</i>	- 110 -
<i>Abbildung 4-50: Darstellung der ATP-Konzentration von Zellen auf verschiedenen Substraten.</i>	- 112 -
<i>Abbildung 4-51: Aufnahmen des Systems mit kontinuierlicher Medienversorgung im Vorlauf.</i>	- 114 -
<i>Abbildung 4-52 Zellen im Fluidiksystem 4A-OB</i>	- 115 -
<i>Abbildung 4-53: Exemplarische Sauerstoff-Verbrauchskurven gemessen im GeSiM-System mit 25 μm Sensor.</i>	- 116 -
<i>Abbildung 4-54: Messungen der Ansäuerung im GeSiM-System (V2-Chip, 4A-OB).</i>	- 117 -
<i>Abbildung 4-55 Zellen in den SLV-Systemen.</i>	- 119 -
<i>Abbildung 4-56: Sauerstoffdiffusion in das Zellkultursystem.</i>	- 120 -
<i>Abbildung 4-57: Parallele Messungen in zwei SLV-Systemen.</i>	- 121 -
<i>Abbildung 4-58: Messungen in 2-Systemen mit elektrochemischem und optischen pH-Sensoren.</i>	- 123 -
<i>Abbildung 4-59: Vergleich des Sauerstoffgehaltes (oben) und des pH-Wertes (unten) in 2 Systemen.</i>	- 125 -

1 Einleitung

1.1 Biologisch-medizinischer Hintergrund

Dieser Abschnitt dient der allgemeinen Darstellung von Informationen der Zellbiologie, der Zellkultur und der Anatomie des Knochens, sofern sie für das Verständnis des Themas sowie der Motivation der Arbeit notwendig sind. Soweit nicht anders aufgeführt, sind die Informationen aus den Lehrbüchern [1] (Zellbiologie) und [2] (Histologie) und [3] (Physiologie) entnommen.

1.1.1 Zellzyklus

Die Proliferation von Zellen ist der grundlegende Prozess für das Wachstum und die Regeneration des Organismus. Proliferierende Zellen durchlaufen den sogenannten Zellteilungszyklus, der alle Ereignisse zwischen den Zellteilungen umfasst. Bei schnell proliferierenden Zellen kann der Zellteilungszyklus 12-24 Stunden umfassen wobei die Teilungsphase ca. 1 h beansprucht. Es ist besonders wichtig zu verstehen, dass sich die Zellen eines ausgereiften Gewebes nicht im Zellzyklus, sondern in einem proliferatorischen Ruhezustand (G_0) befinden. In diesem Zustand sind sie differenziert und erfüllen ihre spezifischen Funktionen. Einige Zelltypen können bei Stimulation mit Wachstumsfaktoren wieder in den Zellzyklus eintreten. Bei anderen Zelltypen wird diese Aufgabe durch im Gewebe befindliche Stammzellen übernommen [1].

1.1.2 Zelltod

In einem ausgewachsenen Organismus muss die Proliferation immer in einem Gleichgewicht zum Zelltod gehalten werden. In einem wachsenden Körper kann das Gleichgewicht zugunsten der Proliferation verschoben sein, allerdings kann dies zu einem krankhaften Zustand führen wenn der Körper diese nicht mehr kontrollieren kann. Zellen können durch Apoptose oder Nekrose sterben. Die Apoptose ist der geregelte, physiologische Verlauf infolge dessen die Zelle einen programmierten, vom Körper kontrollierten „Selbstmord“ durchführt. Das Apoptose-Programm kann durch unterschiedliche Stimuli, wie fehlende Wachstumsfaktoren, Hormone oder durch Häufung genetischer Defekte ausgelöst werden. Häufig sterben nur einzelne Zellen, welche sich kontrolliert auflösen und infolgedessen keine Immunantwort hervorrufen. Die Nekrose hingegen ist der krankhafte, unregelmäßige Fall in dem die Zelle aufgrund einer irreversiblen Schädigung durch physikalische oder chemische Einwirkungen sowie Krankheitserreger abstirbt. Hierbei werden entzündungsfördernde Substanzen frei, wodurch eine Immunantwort hervorgerufen werden kann [1].

1.1.3 Zellen der Zellkultur

Zellen die unkontrolliert wachsen, weil sie nicht mehr auf Apoptosesignale reagieren, werden als entartete Zellen bezeichnet. Sie können zu einem Karzinom und somit zur Erkrankung Krebs führen. Derartige Zellen sind unsterblich und können über längere Zeiten

kultiviert werden, weshalb sie in der Zellkultur genutzt werden. Viele als Modellsysteme verwendete Zelllinien, so auch die in dieser Arbeit getesteten MG63-Zellen, sind Krebszellen. Aufgrund ihrer natürlichen Immortalisation weisen diese Zellen eine veränderte Charakteristik im Vergleich zu gesunden Zellen des Ursprungsgewebes auf. So zeichnen sie sich durch gesteigerte Proliferation, verminderte Apoptose und ungenügende Differenzierung aus. Darüber hinaus gibt es verschiedene andere Techniken Zellen zu immortalisieren um die Hayflick-Grenze zu überschreiten, welche die maximale Anzahl an Zellteilungen, vor Einleitung der Apoptose, definiert [1]. Sie liegt für menschliche, somatische Zellen bei 50 ± 10 Teilungen [4]. Die Immortalisierung kann zur Dedifferenzierung von Zellen führen, weswegen die Ergebnisse nicht mit den Experimenten von primären Zellen, also direkt aus dem Körper gewonnenen Zellen, vergleichbar sein müssen.

1.1.4 Zellulärer Metabolismus

Der Stoffwechsel definiert die Gesamtheit der Stoffumsetzungen einer Zelle. Zentraler Energielieferant sind generell Kohlenhydrate, deren zentraler Abbauweg die Glykolyse ist. In diesem Prozess wird das Glucose-Molekül in Energie und Pyruvat abgebaut. Beim Vorkommen von Sauerstoff kann das Pyruvat im Citratzyklus weiter abgebaut werden, wobei Sauerstoff verbraucht und CO₂ sowie H₂O produziert wird. Neben diesen werden im Citratzyklus auch viele Vorstufen für verschiedene Biosynthesen synthetisiert, wodurch er für die anabolischen Prozesse der Zelle von großer Bedeutung ist.

Der alternative Weg den die Zellen nutzen wenn kein Sauerstoff zu Verfügung steht, ist der Abbau zu Lactat. Hierbei wird das Pyruvat durch Fermentation zu Lactat abgebaut, wobei aber wesentlich weniger Energie entsteht als bei der Atmung und die Ansäuerung bei gleichem Stoffmengenumsatz erhöht ist (siehe Übersicht in Abbildung 1-1) [1].

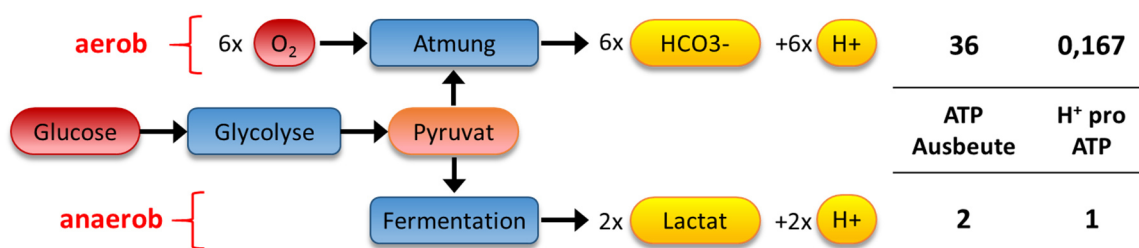


Abbildung 1-1: Vereinfachte metabolische Prozesse von Zellen.

Edukte sind rot, Zwischenprodukte orange, Endprodukte gelb und Reaktionen blau dargestellt. Außerdem sind die ATP-Ausbeute und die dabei frei werdenden und somit zur Ansäuerung beitragenden H⁺-Ionen der Reaktionen, entnommen aus [5] aufgeführt.

Aufgrund dieser beiden metabolischen Reaktionswege stehen der Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerung durch die Zellen in einem direkten Verhältnis. Neben den freigesetzten H⁺-Ionen, sind auch das CO₂ und das Lactat an der zellulären Ansäuerung beteiligt. Den Sauerstoffgehalt kann der Körper nur durch eine verbesserte Sauerstoffversorgung oder durch eine bessere Durchblutung kompensieren, während der pH-Wert durch verschiedene Puffersysteme stabilisiert wird.

1.1.5 Das Carbonatpuffersystem

Der Blut-pH-Wert wird hauptsächlich durch das Carbonatpuffer (CO_2/HCO_3^-) System stabilisiert (1.1). Daneben ist noch der Einfluss von des Hämoglobins und der Plasma Proteine von Bedeutung. Bei Erhöhung der CO_2 -Konzentration durch Zellatmung, führt die Umwandlung des CO_2 in HCO_3^- und der damit verbundenen Freisetzung von H^+ -Ionen zu einer pH-Wert Erniedrigung. Ist durch eine unzureichende Atmung der Organismus nicht mehr fähig dieses CO_2 zu entfernen, kommt es zu einer respiratorischen Azidose [6]. Im umgekehrten Fall wenn H^+ -Ionen durch die metabolische Aktivität der Zellen produziert werden, wird der pH-Wert erniedrigt und es kommt zur Reduktion des HCO_3^- -Niveaus ohne großen Einfluss auf den CO_2 -Gehalt. Werden überschüssige H^+ -Ionen nicht durch die Nieren ausgeschieden, führt dies zu einer metabolischen Azidose[7]. Auch der umgekehrte Effekt ist bekannt. Bei künstlicher Beatmung oder Hyperventilation führt das Absinken der CO_2 -Konzentration zu einer respiratorischen Alkalose [8], wodurch der pH-Wert des Blutes zunimmt [3,7].



1.1.6 Das Carbonatpuffersystem in der Zellkultur

Aufgrund seiner Nähe zum biologischen System und seiner einfachen Handhabung, wird das Carbonatpuffersystem schon seit langem in der Zellkultur verwendet [9]. Die Stabilisierung erfolgt hierbei über die erhöhte CO_2 Konzentration (5 %) im Inkubator sowie die Konzentration des $NaHCO_3$. Die Reaktion zur Stabilisierung des pH-Wertes ist dieselbe wie im Körper, nur erfolgt der Austausch direkt über die Grenzfläche Medium/Luft. Auch wird dieses System überwiegend in der stationären 3D-Kultur verwendet [10–12]. Obwohl der Gasaustausch in 3D-Kultur, im Vergleich zur Perfusionskultur, limitiert ist, ist es das am häufigsten verwendete System. Zum Teil wird es unterstützt durch Zugabe von HEPES, welches dann als zusätzlicher Puffer fungieren soll. Die Limitierung des Gasaustausches in 3D-Systemen haben diese Systeme mit dem Knochen gemeinsam. Auch bei diesem ist die maximale Distanz (Diffusionsweglänge) zwischen der Zelle und der nächsten Kapillare (bis zu 200 μm) im Gegensatz zur maximalen Distanz in anderen Geweben (10-20 μm) erhöht. Dies hat Einfluss auf die Sauerstoffversorgung aber auch auf die Ansäuerung der interstitiellen Flüssigkeit und des Blutes [6,13]. Aufgrund dessen gehört der Knochen zu den langsamen aufsättigenden Geweben, welche verzögert auf pH oder Sauerstoffänderungen reagieren können [14].

1.1.7 Der Knochen

Knochen besteht aus Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sowie weiteren Zelltypen und mineralisierter extrazellulärer Matrix (EZM), welche sich aus den Kollagenfibrillen und Hydroxyapatit-Kristallen zusammensetzen. Das Hydroxyapatit (HA), bestehend aus Kalziumphosphat und Hydroxydionen, macht den Knochen druckfest, während die eingebetteten Kollagenfasern für die Zugfestigkeit verantwortlich sind. Die Lammellenknochen kommen in zwei Formen vor. Dem spongiösen Knochen in welchem

die Lamellen flächig zu Knochenbälkchen strukturiert sind und trabekelförmige Strukturen bilden. Sowie dem kompakten Knochen mit konzentrisch angeordneten Lamellen welche Osteone und die Havers-Systeme bilden [2].

Im Wesentlichen unterscheidet man drei Formen des Knochenwachstums: desmale und endochondrale Ossifikation, die während des Knochenwachstums die vorherrschenden Formen sind, sowie die Knochenumformung, welche in Bezug auf die Anpassung des Knochens an verschiedene Belastungen, die vorherrschende Wachstumsform ist. Die Regulation der Knochenmasse unterliegt einer hohen Anzahl an Einflussfaktoren welche entweder auf die Knochenproduktion oder Resorption wirken können [15]. Während die Osteoblasten den aufbauenden Prozess übernehmen, sind die Osteoklasten die Zellen die den abbauenden Gegenprozess initiieren. Die Osteozyten sind die in den Lamellensystemen eingelagerten noch lebenden Osteoblasten, die sich im Laufe der Osteogenese „eingemauert“ haben. Ihre Funktion ist nicht genau geklärt, allerdings ist

bekannt, dass Knochen ohne lebende Osteozyten abgebaut wird.

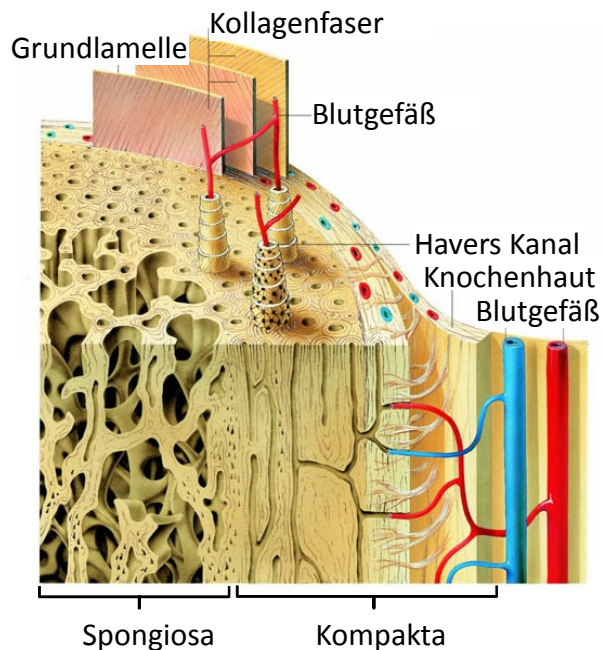


Abbildung 1-2: Darstellung des menschlichen Röhrenknochens.

(Quelle: www.jameda.de)

Diffusion über das Knochenmark. Aufgrund ihrer Größe von ca. 300-400 μm ist die maximale Diffusionsweglänge ca. 200 μm . In der Kompakta bilden sich homogene Strukturen, die Osteone (Havers-Systeme) aus. Diese bestehen aus 5-20 Knochenlamellen, die den Havers-Kanal konzentrisch umschließen. Die Anordnung der Kollagenfibrillen verläuft, mit abwechselnden Drehrichtungen, schraubenförmig in Kanalrichtung. Osteone sind kreisförmig bis oval und haben einen Durchmesser zwischen 100 μm und 400 μm . Die das Osteon radial durchlaufenden Knochenkanälchen (Canaliculi) sind mit interstitieller Flüssigkeit gefüllt und stehen mit dem Havers-Kanal in Kontakt [20]. Über diese Kanäle werden die Osteozyten durch Diffusion versorgt (Diffusionsweglänge < 200 μm). Im Havers-Kanal verlaufen die Blutgefäße und Nervenstränge. Die Querverbindungen der Havers-

Dort wo Knochengewebe sehr rasch gebildet wird, entsteht zuerst Geflechtknochen, welcher nachfolgend zu Lamellenknochen umgebaut wird. Dieser natürliche Umbau („remodeling“) richtet sich an der Belastung des Knochenmaterials aus [16–19]. In der Spongiosa führt dies zur Ausbildung von Trabekeln entlang der Belastungstrajektoren des Knochens, sodass diese nur auf Druck oder Zug belastet werden. Die Struktur der Spongiosa kann somit als porös beschrieben werden. Die Trabekel verfügen über keine Gefäße und die Versorgung erfolgt durch

Kanäle werden als Volkmann-Kanäle bezeichnet. Diese stehen mit der Markhöhle in Verbindung, die mit Endost ausgekleidet ist. Im äußeren Bereich der Kompakta gehen die Lamellen in die äußeren Generallamellen über, welche den Umfang des Knochens umfassen [2].

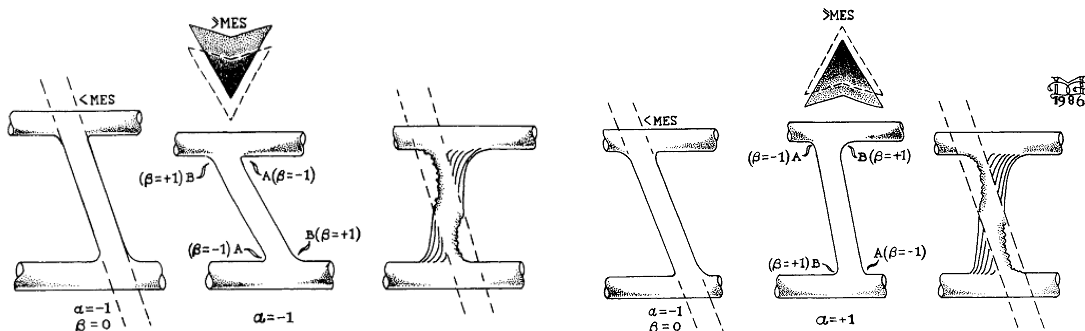


Abbildung 1-3: Darstellung des Remodeling Prozesses nach Frost [17].

Links: Darstellung der Änderung bei Druckapplikation, Rechts: Anpassung durch Umbau bei Zugapplikation

Während des gesamten Lebens ist der Knochen im Umbau begriffen. Besonders während der Wachstumsphasen ist ein kontinuierlicher Umbau notwendig. Während des Wachstums wird der Geflechtknochen durch Lammellenknochen ersetzt, da dieser widerstandsfähiger ist. Auch nach Beendigung der Wachstumsphase ist ein kontinuierlicher Umbauprozess (Remodeling) im Gange (Abbildung 1-3). Bei diesem Prozess wird im Laufe eines Jahres ca. 10 % des Knochens umgebaut. Sinn des Umbaus ist die Anpassung an veränderte mechanische Belastungen, Reparatur von Strukturschäden bzw. Vorhalten von schnell verfügbarem Kalzium.

Die Knochenstruktur wird im Zuge des „Remodeling“ zuerst durch Osteoklasten aufgelöst, die dadurch einen Tunnel in den Knochen ätzen. Diesen folgen die Osteoblasten welche den Knochen durch Exkretion der EZM und Abscheidung von HA wieder aufbauen. Dadurch wird ein Teil mit eingebaut und diese differenzieren in Osteozyten. Die jüngsten Osteoblasten wandeln sich in Zellen des Endost um und kleiden den Kanal aus, in den, während des Wachstumsprozesses, Blutgefäße eingewachsen sind. Die Regulation dieser Prozesse ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Aufbau und Abbau des Knochens und somit für dessen Stabilität. Als wichtigstes Regulativ wird hier die mechanische Beanspruchung gesehen.

1.1.8 Implantat-Knochen-Wechselwirkungen

Aufgrund der vielen zu berücksichtigenden Variablen (ECM, Zellsignale, Design-Prinzipien, Vaskularisierung, Immunantwort), konnte trotz intensiver Forschung bisher kein zufriedenstellender „Knochenersatzstoff“ entwickelt werden [21]. Deshalb müssen größere Knochendefekte, z. B. hervorgerufen durch Tumore oder Splitterbrüche auch weiterhin durch Implantate ersetzt werden. Die Forschung fokussiert sich hierbei auf die Suche nach neuen möglichst biodegradierbaren Materialien, welche sich hinsichtlich ihrer Stabilität und Biokompatibilität als Implantate eignen [22]. Besonders die Initialadhäsion sowie die Verbesserung der Implantat-Knochen-Wechselwirkungen stehen hier im Vordergrund, um die Einbettung des Implantates zu verbessern. Dies ist wichtig, da diese

Parameter sowohl für die Akzeptanz des Implantates durch den Körper, als auch für die Haltbarkeit des Implantates bzw. die Verweildauer desselben von großer Bedeutung sind. Optimal wäre daher ein Implantat mit den mechanischen Eigenschaften des Knochens, das im Laufe der Zeit vom Körper abgebaut werden kann [23]. Neben der Verwendung neuartiger Materialien wird vor allem die Optimierung der bisherigen auf Edelstahl oder Titan basierenden Implantate geforscht. Der Fokus liegt hier auf der verbesserten Adhäsion der Zellen, optimierte Oberflächenstrukturen bzw. optimierte Designs, um die Fixierung des Implantates und somit seine Haltbarkeit zu verbessern. Dies ist notwendig, da viele Implantate mit der Zeit locker werden und ausgetauscht werden müssen.

Alles, was ein besseres Verständnis der Zell-Oberflächen- bzw. Zell-Material-Interaktionen oder des Knochenwachstums ermöglicht, kann nützlich sein, um dem Knochenschwund entgegen zu wirken und Therapien zum Ersatz oder der verbesserten Regeneration von beschädigtem Knochen zu entwickeln.

1.1.9 Mechanische Stimulation zur Förderung des Knochenwachstums

Da die mechanische Stimulation als wichtigstes Regulativ für das Knochenwachstum angesehen wird, ist die wachstumsfördernde Stimulation von Knochen ein Thema der Forschung im Bereich der regenerativen Medizin und in der Grundlagenforschung. Der Grund liegt in der nachgewiesenen Förderung des Wachstums von Knochenzellen durch mechanische Stimulation [19]. Trotz der intensiven Forschung in diesem Bereich, sind die Effekte unzureichend verstanden [24]. Die Ursache für dieses Unverständnis, liegt in der Komplexität des Knochens und in der begrenzten Möglichkeit direkt Messungen, in den für die Knochenzellkultur verwendeten Scaffolds, durchzuführen. Außerdem variieren sowohl die experimentellen Ansätze als auch die Stimulationsformen. Selbst die Stimulationsintensität, welche in μ -strain ($\mu\epsilon$, $\mu\text{m}/\text{m}$), also der μm -Längenänderung pro Meter Knochenlänge gemessen wird, variiert erheblich. Eine einheitliche Aussage über die Wirkung der Stimulation konnte daher bisher nicht getroffen werden. Zum Teil wird auch die Wirkung elektrischer Stimulation auf mechanische Einwirkungen, z. B. durch piezoelektrische Reaktion des Knochens zurückgeführt. Dies ist auch der Hauptgrund für die Zielsetzung ein Stimulationselement in ein überwachbares Zellkultursystem zu integrieren.

1.2 Zellkulturüberwachung

Dieser Abschnitt dient der allgemeinverständlichen Darstellung relevanter Informationen zum Verständnis der Anforderungen und den Hintergründen der zellbiologischen Messungen, sowie der Einordnung der Arbeit in dieses Themengebiet. Die Quellen sind, sofern sie nicht extra aufgeführt wurden, im Abschnitt 2.3 angegeben, da dieser spezifischer ausgeführt ist.

1.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur *in vitro* ist eine Technik die etwa seit 100 Jahren genutzt wird. So beispielsweise die Arbeiten von Ross Harrison, welcher 1906 und 1910 Axone von Froschembryonen in einer *in vitro* Kultur beobachtete. Als erste Arbeiten, die sich mit der Überwachung von Parametern der Kultur beschäftigen, könnte man die Untersuchungen von Otto Warburg ansehen. Er arbeitete an der Aufklärung der Atmung von Bakterien [25]. Die Weiterentwicklung der Zellkultur führte zu den heute gängigen 2D-Methoden, welche zumeist in Kulturschalen oder Zellkulturplatten realisiert werden.

Nach Kieninger [26] ermöglicht die technische Entwicklung eine immer bessere Kontrolle der Umgebungsbedingungen von Kulturen. Dennoch hinkt die Überwachung von Zellkulturen, besonders der von eukaryotischen Kulturen, hinter der technischen und biologischen Entwicklung (Co-Kultur, 3D-Zellkultur) hinterher. Dieser Umstand ist vor allem den Anwendungsfeldern der Zellkulturüberwachung geschuldet. Bei der Überwachung von Bioreaktoren werden in der Biotechnologie nicht adhärente Produktionsorganismen (Bakterien, Hefen) verwendet, wodurch sich auch Nährstoffverteilung, Temperatur und pH-Wert leicht kontrollieren und steuern lassen [27]. Die Bioreaktoren sind so groß, dass konventionelle Sensorik, oftmals auf Langlebigkeit optimiert, direkt verwendet werden kann. Dem gegenüber stehen die adhärennten eukaryotischen Kulturen wie sie in der Grundlagenforschung verwendet werden. Die geringen Größen der Kulturen, aber auch die für das Wachstum der Zellen notwendige Adhäsion, stellen ganz eigene Herausforderungen dar.

1.2.2 Einzelpunktmessungen

Die häufigsten Möglichkeiten zur Messung von Parametern der Zellkultur sind die Bestimmung von Proteinen oder Molekülen durch die Umsetzung von Farbstoffen oder durch die Markierung mit Antikörpern. Die meisten in der Zellkultur eingesetzten Assays (z.B. ELISA) und Farbstoffe (z.B. Tetrazoliumsalze) sind für die Einzelmessung von Werten, meistens in Multiwellplatten ausgelegt. Zellkulturassays, also Tests die mit Markern in Multiwellplatten durchgeführt werden, benötigen außerdem eine Auslesetechnik (Reader), welche aber zu groß ist, sodass sie meist nicht integriert werden kann. Oft machen die verwendeten Assays zudem einen Aufschluss der Zellen notwendig (Bsp. ATP-u. ALP-Assays), was die kontinuierliche Nutzung verhindert. Selbst bei Assays bei denen das Medium abgenommen und gemessen werden kann, ist oft eine Zugabe eines Markers/Substrates in die Kultur notwendig, wodurch die Zellen beeinträchtigt werden.

Ähnlich sieht es mit verschiedenen Sensorsystemen für die Bestimmung kleiner Moleküle (H^+ , CO_2 , O_2 , NO , H_2O_2) aus, die zum Teil auch für längere Messungen nutzbar wären. Dieser Verwendung steht aber ihre Größe oder ihre Stabilität entgegen. Ein solches Beispiel ist die häufig verwendete pH Glaselektrode. Ihre Größe erschwert eine kontinuierliche Messung in der Zellkultur, obwohl die Stabilität ausreichend wäre und die Elektronik leicht für kontinuierliche Aufzeichnungen modifiziert werden könnte. Solche Sensoren sind somit nur für Messungen nutzbar bei denen sie manuell bzw. automatisiert, zu definierten Zeitpunkten, in das Kulturmedium eingebracht werden können oder machen eine Entnahme des Mediums notwendig.

1.2.3 Kontinuierliche, markierungsfreie Überwachung

Der Begriff „Zellkulturüberwachung“ ist, wenn er auch auf alle Varianten der Kontrolle angewendet werden kann, in diesem Fall bezogen auf die kontinuierliche, markierungsfreie Messung, welche die Zellen selbst nicht beeinflusst. Dies bedeutet im Normalfall die Anwendung von Sensoren, welche den Einfluss auf die Zellkultur auf ein Minimum reduzieren und kontinuierlich arbeiten können. Im Gegensatz zu Markern oder Assays, liefern solche Sensoren nur eine punktuelle Darstellung des Zustandes des Systems. Dies kann, insbesondere bei Erhöhung der Anzahl der Sensoren eine Ortsauflösung ermöglichen, wodurch sich dies zu einem Vorteil wenden lässt.

1.2.4 Zell-Monitoring-Systeme (ZMS)

Systeme für die Überwachung von Zellkulturen (Zell-Monitoring-Systeme) sind von hohem Interesse in der Forschung. Entsprechend der Zielsetzung ihrer Anwendungsgebiete können sie erheblich variieren. Eine grobe Übersicht über die möglichen Einsatzfelder und Anforderungsprofile sowie die Einordnung dieser Arbeit ist in Abbildung 1-4 gegeben. Die Abszisse stellt die Anzahl an Parametern dar welche ein entsprechendes System parallel oder zumindest zeitnah messen können muss. Die Ordinate markiert die notwendigen Messzeiten ohne Kalibration. Mit zunehmender Messzeit steigt die Anforderung an die Sensorstabilität im Verhältnis zu den Reaktionszeiten stark an, womit auch die Anforderungen an ein solches System steigen. Medikamentenscreenings (IC_{50} -Bestimmung) benötigen schnelle Reaktionszeiten der Sensoren über mehrere Wiederholungen, müssen dafür aber nur über kurze Zeiträume betrieben werden, wobei die Zellen extern vorkultiviert werden können. Im Gegenzug dazu würde die Züchtung von künstlichem Gewebe oder die Beobachtung von Langzeiteffekten eine dauerhafte Überwachung notwendig machen, wobei höhere Sensorreaktionszeiten aufgrund des Zeiträhmens akzeptabel sind.

Für die Überwachung der Zellkultur kommen viele Parameter in Frage, beginnend mit direkt bestimmbaren Werten wie pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Temperatur und Impedanz sowie indirekt bestimmbaren Parametern wie Glucose, Lactat, Stickstoffmonoxid, Wasserstoffperoxid sowie Neurotransmittern oder Hormonen. Bereits die Miniaturisierung

der Sensoren für die direkt messbaren Größen stellt die Entwickler vor ernsthafte Probleme. Bei der Weiterentwicklung zu Biosensoren potenzieren sich die Herausforderungen aufgrund der notwendigen Integration der biologischen Erkennungselemente [28–30].

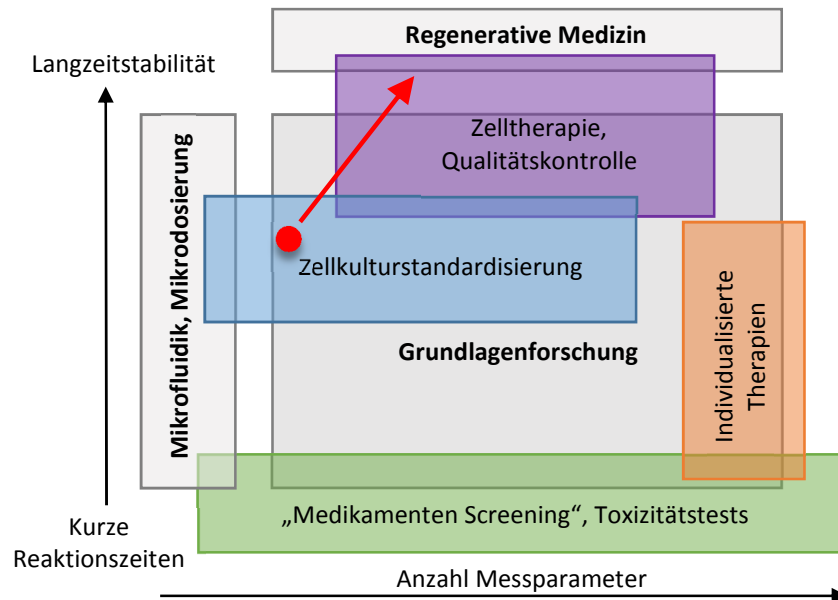


Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung der Nutzungsgebiete der Zellkulturüberwachung.

Die Anwendungsfelder sind als 2-dimensionale Anordnung entsprechend den Anforderungen (lange Kulturzeiten = höhere Langzeitstabilität, kürzere Zeiten = kurze Reaktionszeiten der Sensoren) gegen die Anzahl an zu bestimmenden Messparametern aufgetragen. Neben dem Feld der Grundlagenforschung sind die Überschneidungen zu anderen Forschungsfeldern angedeutet. Der rote Punkt definiert die Position des in dieser Arbeit konzipierten Systems und der rote Pfeil gibt die avisierte Entwicklungsrichtung vor (Darstellungsform übernommen und entsprechend angepasst aus [26]).

Neben der Empfindlichkeit (Sensitivität) des Sensors, unter der man das Verhältnis der Änderung einer Anzeige des Messgerätes zu der sie verursachenden Änderung der Messgröße versteht¹, ist die Stabilität des Sensors eine wichtige Größe welche über seine Eignung für ein ZMS bestimmt. Besonders für Biosensoren stellt die Stabilität ein großes Problem dar, da die biologischen Erkennungselemente oft nur geringe Langzeitstabilitäten aufweisen.

Anwendungsfälle die in Abbildung 1-4 zueinander in Bezug gesetzt wurden, sind:

- **Die Grundlagenforschung:** Welche sich allgemein mit der Reaktion von Zellen auf bestimmte Effekte, Umgebungsänderungen oder spezielle Substrate beschäftigt. Hier sind vor alle die Standardmethoden der Zellkultur wie Assays (ELISA), Proliferationstests (z. B. WST, ATP) sowie PCR und andere molekularbiologische Methoden die Techniken der Wahl. Nur vereinzelt werden ZMS genutzt.
- **Qualitätskontrolle:** Auch in der Forschung kann, besonders bei längerfristigen Kulturen oder Experimenten, die Qualitätskontrolle durch ZMS wesentlich

¹ http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/ee_sensitivity.html

verbessert und somit die Aussagekraft von Experimenten gesteigert werden. Besondere Relevanz besitzt sie aber, wenn es um therapeutische Zwecke geht.

- **Zelltherapie:** Sollen Zellen in den menschlichen Körper eingebracht werden, z. B. für die Züchtung von Transplantaten, ist die Qualitätssicherung von essentieller Bedeutung. Dies ist der wohl wichtigste Anwendungsfall für ZMS und eine der größten Herausforderungen vor denen das „Tissue-Engineering“ steht.
- **Individualisierte Therapie:** Zur Optimierung der Erfolge von Therapien können Zellen des Patienten *in vitro* kultiviert und ihre Reaktion auf die Medikation untersucht werden. Dies ist für Krebszellen bereits etabliert², denn diese reagieren patientenabhängig sehr unterschiedlich auf Zytostatika, sodass eine individualisierte Auswahl und Einstellung essentiell für den Behandlungserfolg sein kann.
- **Zellkulturstandardisierung:** Die Vereinheitlichung der Kulturbedingungen und die Stabilisierung derselben können die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Ansätzen erhöhen. Durch die Möglichkeit der kontinuierlichen Kontrolle und der Nachsteuerung haben ZMS hier einen potentiellen Vorteil.
- **Medikamentenscreening:** Zell-Monitoring-Systeme können in Medikamentenstudien genutzt werden, um eine Vorauswahl zu treffen sowie die Anzahl an Tierversuchen und die Kosten der Entwicklung zu reduzieren [31]. Dadurch kann der Durchsatz sowie die Vergleichbarkeit erhöht werden kann.
- **Toxizitätstests:** Beim Toxizitätstest wird die Giftigkeit einer Substanz auf Zellen oder Gewebe zu bestimmt. Die Vorteile der ZMS sind hier dieselben wie beim Medikamentenscreening. Dieser Aspekt hat durch REACH³ der Verordnung zur Registrierung und Klassifikation von Substanzen auf ihre Schädlichkeit eine neue Bedeutung erhalten.

Dieses System ist daher in der Grundlagenforschung angesiedelt mit der Ausrichtung auf die Überwachung von Zellkulturen bis hin zur 3D-Kultur im „Tissue Engineering“.

² <http://www.celltrend.de/onkologie.html>

³ <http://echa.europa.eu/regulations>

1.3 Ziele der Arbeit

Neben dem grundlegenden Interesse, nähere Informationen über die Mikroumgebung im Knochen zu erlangen, liegt das Forschungsinteresse entsprechend der Ausrichtung des Graduiertenkolleg WELISA; „Analyse und Simulation elektrischer Wechselwirkungen zwischen Implantaten und Biosystemen“, in der Aufklärung von Interaktionen der Zellen mit artifiziellen Oberflächen wie Implantatmaterialien (Titan, Magnesium) und Scaffoldmaterialien (Kalziumphosphate, Kollagene). Zur Erreichung dieses Zieles können ZMS einen wichtigen Beitrag leisten.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines ZMS, welches die Kultur von Knochenzelllinien erlaubt und geeignet ist, die metabolischen Parameter pH-Wert, Sauerstoffverbrauch und Adhäsion, parallel zu bestimmen und diese zu beeinflussen. Weiterhin soll es die Möglichkeit bieten die Zellen zu stimulieren. Da in einem ZMS die Effekte der mechanischen Stimulation besser zu beobachten sein dürften als in 2D Zellkultur und es, nach Kenntnisstand des Autors, keine Systeme gibt die eine Überwachung der Parameter und die mechanische Stimulation ermöglichen, soll ein mechanischer Aktor für die Stimulation integriert werden.

Sensorik:

- Entwicklung von elektrochemischen Sensoren für die Überwachung zellphysiologischer Parameter auf Glas
- Fertigung der Sensorik und Anbindung an die Auswertelektronik
- Charakterisierung der Sensorik
- Anbindung an elektronische Komponenten und Programmieren der Messroutinen

Mikrofluidik und Systemtorso

- Konzeption und Fertigung eines Zellkultursystems, in das die Sensorik integriert werden kann.
- Auswählen und Optimieren des Designs der Fluidik
- Anbindung des Systems an die Pumpe und Entwickeln von Befüllungsprotokollen
- Integration eines mechanischen Stimulators

Zellkultur:

- Etablierung mindestens einer Zellkulturlinie als Modellsystem für Osteoblasten
- Überprüfen der Biokompatibilität der Systeme und Optimierung der Zellkulturparameter
- Kultivierung ausgewählter Zelllinien in dem System, unter stationären und aktiv versorgten Bedingungen

2 Stand der Forschung

In diesem Kapitel wird der wissenschaftliche Stand der Knochenzellforschung, der Kulturtechniken sowie der Einfluss des Materials beschrieben. Zudem wird auf die für die zellbiologische Forschung geeigneten Sensorkonzepte, ihre zugrundeliegenden Funktionsweisen sowie ihre Anwendung und Integration in ZMS eingegangen. Abschließend werden die Standardtechniken der Mikrofluidik- und der Chip-Fertigung dargelegt, weil ihre Möglichkeiten und Limitierungen einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von ZMS haben.

2.1 Knochenzellforschung

Neben den primären Zellen aus Patienten sowie Stammzellen aus verschiedenen Geweben, werden primär etablierte Zelllinien in der Forschung verwendet [32]. Die beiden am häufigsten als Modellsysteme verwendeten Zelllinien sind die humane Osteosarcoma Zelllinie MG63 und die von der Maus abstammende Osteoblasten-Vorläuferzelllinie MC3T3-E1. Die MC3T3-E1 Zelllinie produziert Prostaglandine [33] und ist z.B. durch Polyphosphate zur Kalzifikation anregbar [34]. Des Weiteren wurde die Zelllinie auch zur Evaluation üblicher Implantatmaterialien eingesetzt [35]. MC3T3-E1 und MG63 sind beide fähig den „macrophages-colony-stimulating factor“ (M-CSF) zu sekretieren, der einen wichtigen Einfluss auf die Osteoclastendifferenzierung hat. [36]

Im direkten Vergleich MG63 vs. MC3T3-E1 zeigen beide Zelllinien, sowohl bei der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), als auch bei der Produktion der Metalloproteinase, vergleichbare Werte. Die Produktion von „Nodules“ genannten Kalziumkristallen, welche durch die „Von-Kossa“ Färbung sichtbar werden, wurde bisher nur bei MC3T3-E1 gefunden. Das Auftreten von Nodules ist direkt abhängig von der Zugabe von Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat [37]. Nodules werden als Kalzifikationsmarker angesehen, da es sich um extrazelluläre Abscheidungen von Kalziumphosphaten handelt und wurden besonders nach längeren Kultivierungszeiten beobachtet [38].

2.1.1 Marker und Indikatoren für die Charakterisierung von Knochenzellen

Neben der optischen Beobachtung von Kalzifikationsvorgängen, wie bei den oben bereits erwähnten „Nodules“, wird der Status der Osteoblasten, respektive der Modellzelllinien, mithilfe verschiedener Markerproteine beschrieben. Die ALP, als einem der Markerproteine für die Kalzifikation, wird hierbei eine hohe Bedeutung zugewiesen obwohl die genaue Funktion für die Knochenbildung noch umstritten ist. Wahrscheinlich spielt sie eine wichtige Rolle beim Mineralisationsprozess, da sie in der Lage ist organische Phosphatester zu spalten und damit zur Versorgung mit anorganischen Phosphaten beitragen, was zur Bildung von Hydroxylapatit führen kann [39]. Damit könnte es sich um das von [40,40] beschriebene Enzym handeln, da es in den Matrixvesikeln mineralisierender Gewebe sehr häufig gefunden wurde [41]. Auch spricht der Umstand, dass Mauszelllinien mit fehlendem ALP-Gen nicht in der Lage sind zu mineralisieren dafür, dass dieses Enzym ein wichtiger Baustein im Prozess der Knochenbildung ist [42,43]. Sie

wird daher als sinnvoller Indikator für die Überwachung der Knochenbildung betrachtet [44]. Ein besonderes Merkmal der alkalischen Phosphatase ist ihr hohes pH-Aktivitätsoptimum, welches über pH 8 und somit weit über physiologischen Verhältnissen liegt [45].

Ähnlich unvollständig ist das Verständnis der Funktion des Osteocalcins, das als ein spezifischer Marker für die Osteoblastencharakterisierung verwendet wird [46]. Osteocalcin ist ein kalziumbindendes Protein, welches 1,5 % der Proteine im Knochen bzw. bis zu 20 % der nichtkollagenen Matrixproteine stellt [47,48]. So führt das Fehlen von Osteocalcin im Mausmodell sogar zu einer erhöhten Knochenmasse [49], wobei es möglicherweise mehr Einfluss auf die Knochenqualität zu haben scheint [50].

2.1.2 Einfluss der Materialoberfläche auf Osteoblastenwachstum

Die Grenzfläche zwischen dem organischen System (Körper) und dem artifiziellen Implantat - vor allem die Einflüsse der Morphologie und Materialzusammensetzung des Implantates bezüglich der Initialadhäsion und Fixierung des Implantates - werden intensiv erforscht. Die Forschung konzentriert sich hierbei vor allem auf die Untersuchung in Zellkultur und die Reaktion der Zellen bzw. der Produktion der identifizierten Marker. Die Untersuchung an strukturierten Implantaten zeigte, dass eine rauere Oberfläche zu einer höheren ALP-Aktivität und zu höheren Kalzifikationsraten führt [51,52]. Experimente mit MC3T3-E1 auf TiAl6V4 Oberflächen zeigten allerdings eine schlechtere Verteilung der Zellen auf rauen Oberflächen und fanden zugleich eine geringere Adhäsion und Proliferation [51]. Das Wachstum wurde auch auf Glas untersucht, da dieses als Kalziumquelle für die Kalzifikation dienen kann [53].

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung der Implantat-Zell Reaktion ist, dass das Implantatmaterial auch Auswirkungen auf den Zellmetabolismus haben kann und die Differenzierung der Zellen beeinflusst, was möglicherweise einen stärkeren Einfluss als die Oberflächenstruktur haben kann [35]. Der Einfluss der Oberflächenrauheit gilt als erheblich, da für MG63 [54] und auch für MC3T3-E1 Zellen [55] ein besseres Ansprechen auf Stimulation auf raueren Oberflächen beobachtet wurde.

Die Stimulation ist daher auch bei der Betrachtung der Implantat-Zell-Wechselwirkungen von Interesse. Wobei der Schwerpunkt der Forschung auf der Förderung des Wachstums und dem Knochenerhalt liegt. So zeigen verschiedene Untersuchungen [56,57] eine verbesserte Matrixproduktion oder auch erhöhte Kalziumproduktion durch mechanische Stimulation [58]. Ein positiver osteoregulativer Effekt durch mechanische Stimulation während des Wachstums gilt als sicher [19].

2.1.3 Entwicklung abbaubarer Trägermaterialien

Die bereits beschriebene Forschung an der Grenzfläche Implantat/Körper sowie ihre Optimierung führt zu dem Konzept des biodegradierbaren Implantates, bzw. dem vollständigen Ersatz durch „künstlichen Knochen“. Zusammen mit dem Übergang zu immer komplexeren Modellsystemen, führt dies zur Entwicklung 3-dimensionaler

Trägermaterialien (Scaffolds). Künstliche Scaffolds, die ein 3D-Wachstum von Knochenzellen ermöglichen sind das Ausgangsmaterial und markieren den Übergang zu voll resorbierbaren Implantatsystemen. Dadurch erklärt sich das große Interesse der biologischen Forschung an diesem Thema [23,59].

Die meisten Ansätze zur regenerativen Medizin hängen von der Fähigkeit der biomedizinischen Forschung ab, neuartige biokompatible Materialien zu entwickeln und diese in verwendbare 2D- und 3D-Formen zu überführen. Besonders auch die Anforderung diese so anzupassen, dass sie die gewünschten medizinisch/biologische Reaktionen (Einwachsen, funktioneller Ersatz) hervorrufen, stellt die aktuelle Herausforderung der biotechnologischen Forschung dar [22,21]. Für die Scaffoldmaterialien der Knochenzellkultur, d.h. für „künstlichen Knochen“, besteht die Herausforderung vor allem in der enormen mechanischen Belastbarkeit des Materials bei gleichzeitiger Porosität bzw. knochenähnlichem strukturellem Aufbau, um das Einwachsen von Zellen zu ermöglichen und deren Versorgung im Implantat sicherzustellen.

2.1.4 Übergang von 2D-zu 3D-Zellkultur

Dass die meisten Versuche in 2D, also auf Flächen gemacht werden, ist der Einfachheit der Experimente geschuldet. Für die Untersuchung des Zellverhaltens auf Oberflächen mag dies reichen, für eine Modellierung des Verhaltens komplexerer Zellverbände, wie Geweben oder Organen nicht. Neben der Interaktion mit anderen Zelltypen, ist vor allem die veränderte Versorgungssituation und die Zell-Zell-Interaktion in 3D-Kulturen eine andere. Verglichen mit 2D-Kulturen zeigen Zellen in 3D-Kulturen eine verstärkte metabolische Aktivität [60,61], respektive ein verändertes Interaktionsverhalten mit anderen Kulturen [62]. Nach Jarrahy *et al.* wird beispielsweise das Angiogenesepotential in 3D-Kulturen anders beeinflusst. Die vermehrte Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt zur erhöhten Expression von Angiogenesefaktoren. Diese induzieren die Angiogenese und verbessern die Versorgung der Zellen in komplexen Scaffolds [63].

Nach Abbot *et al.* [64] kann die Kultur in 3D das Verhalten bzw. die Sensitivität von Zellen, besonders die Reaktion auf Botenstoffe (z. B. EGF) vollständig verändern. So erhöht in 3D-Kollagenmatrizes die Stimulation durch mechanische Streckung die Zellproliferation und die Expression von Markergenen [65]. Entsprechend wird auch die Zellkultur von Osteoblasten auf die 3D Kultur erweitert. Als Materialien kommen Keramiken wie Sponceram® [66], Gelen [67], Gelatine-Mikrokugeln [68], Sintermaterialien wie Kalziumphosphat [69] oder auch bearbeitete Titaniumlegierungen [70,71] zur Anwendung. Auch werden Polymere wie Polycaprolacton aufgrund der guten 3D-Fertigungsmöglichkeiten und ihrer Biokompatibilität immer intensiver erforscht [59,72,73]. Interessant sind natürlich auch Kollagen basierte Scaffolds, da Kollagen biokompatibel ist und eine wichtige Rolle bei der Kalzifikation spielt [74,75].

Selbst die adhäsionsfreie 3D-Kultur in freischwimmenden sphärischen Aggregaten [76,77] zeigt bereits mehr organotypische Charakteristika als 2D-Kulturen. Die Weiterentwicklung zum 3D-Perfusionsreaktor ist somit die logische Konsequenz und wurde

schon zur Kultivierung von Stammzellen eingeführt [78]. Im Falle von Knochenzellen sind hier die Experimente von Takagishi *et al.* [79] zu nennen, denen es gelang in Gelatine eingeschlossene MG63 Zellen zur Produktion von HA in Ca^{2+} angereichertem Medium zu stimulieren. Bei Kultivierung von MG63 Zellen in Gelatine-Scaffolds konnte sogar eine knochenartige Gewebeformation generiert werden, indem die Produktion von HA in Ca^{2+} angereichertem Medium induziert wurde. In anderen Arbeiten zeigte sich aber keine Osteocalcin-Produktion bei Verwendung von MG63 Zellen [67].

Auch eine Einbettung in Collagen durch nachträgliche Vernetzung, stellt einen vielversprechenden Ansatz für biomedizinische Materialien dar. Die Möglichkeit zur nachträglichen Vernetzung von lebenden Zellen ohne aggressive Chemikalien wurde besonders durch die Transglutaminase möglich [80]. Im Bereich des „Tissue Engineering“ wurden bereits NIH/3T3 Zellen erfolgreich im Gel eingeschlossen und kultiviert [81]. Als wesentliche Hemmnisse bei der Etablierung von 3D-Kulturen sind die veränderten zellkulturtechnischen Bedingungen zu nennen, z. B. keine Mikroskopierbarkeit oder die anspruchsvolle, oft kontinuierliche Mediumversorgung. Die Fertigung von nutzbaren zellkulturkompatiblen Scaffolds wird durch neue Herstellungsmethoden wie 3D-Druck einfacher [23]. So ist die Herstellung elastischer 3D-Strukturen durch direktes Laserschreiben möglich. Die Möglichkeit zum Aufbau angepasster Strukturen erweitert die theoretischen Möglichkeiten für die 3D-Zellkultur und gestattet zudem die Untersuchung der Beeinflussung des Zellverhaltens durch unterschiedliche räumliche Strukturen [82,83].

2.1.5 Stimulation zur Förderung des Wachstums

Als ein wesentlicher Stimulationsfaktor wird der induzierte Mediumstrom innerhalb des kanalikulären Systems des Knochens betrachtet [84,85]. Im direkten Vergleich des Einflusses des Mediumstromes zur mechanischen Stimulation konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss des Medienstromes signifikant höher ist [86]. So zeigten Simulationen massive Differenzen zwischen verschiedenen Scaffolds, wobei unter Stimulationen lokal bis zu 100-fach höhere Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb des Scaffolds im Vergleich zur Injektionsgeschwindigkeit gemessen wurden. Das wiederum verschärft die Problematik des Experimentdesign [87]. Ein weiterer Punkt bei der Stimulation ist, dass Belastung nur zu Wachstum führt, wenn sie mit gewissen Pausenintervallen kombiniert wird [88]. Die Gruppe um Gross *et al.* betrachtet das adaptive System als Kombination kleinerer Netzwerke, da hier die beobachteten Reaktionen mit gewissen mathematischen Modellen [89,90] zu „Small world networks“ übereinstimmen. Diese Netzwerke zeichnen sich durch ein Potenz-Verhalten aus. Das bedeutet, dass wie bei der natürlichen Stimulation des Knochens Signale geringerer Stärke sehr häufig auftreten, während sehr starke Effekte nur selten und sporadisch vorkommen [91]. Des Weiteren reagieren solche Netze mit einem Grenzwertverhalten. Bis zu einem Schwellenwert reagieren die Netze kaum oder gar nicht auf Signale. Erst bei Überschreiten des Schwellenwertes können weitere auch nur geringe Effekte zu sehr starken Antworten des Netzwerkes führen.

Eine Alternative zur reinen Belastungsstimulation kann die Streckung der Zellen sein. So konnte gezeigt werden, dass die Streckung einer MC3T3-E1 Zellen beinhaltende Matrix zur Erhöhung der Proliferation führte, während bei der Kombination von Streckung und Stauchung die Differenzierung induziert wird [92]. Zusammengefasst kann man sagen, dass nur ungewöhnlich starke, häufige oder unübliche Belastungen einen positiven Effekt haben und dass die Wirkung der mechanischen Stimulation am stärksten von den Maximalpeaks abhängt [19].

Nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft lautet der Konsens für die mechanische Stimulation, dass die hochfrequenten (100-1000 Hz), aber niedrigenergetischen Pulse (10-40 $\mu\epsilon$), die Zellen für die niederfrequenten, aber hochenergetischen Pulse (0,2-2Hz; 100-2000 $\mu\epsilon$), sensibilisieren [93,94]. Wie die Stimulation aber von den Zellen registriert wird, ob die Streckung bzw. Zerrung des Zytoskelettes oder der Scherstress durch das in Bewegung versetzte Umgebungsmedium (Blut, Lymphe, Zellkulturmedium) in den Haverschen bzw. Volkmannschen Kanälen den entscheidenden Reiz darstellen, ist umstritten [85]. Unklar ist, ob die Ergebnisse direkt auf das biologische System übertragen werden können, da Knochen nach Noonan *et al.* [95] vor allem in belastungsfreien Zeiten wachsen. Angesichts der Tatsache, dass mechanische Stimulationsexperimente bisher nur unter statischen Bedingungen (Perfusionskultur mit täglichem Medienwechsel) stattfinden, stellt sich hier auch die Frage, ob das erhöhte Wachstum nicht auf verbesserte Versorgung durch die induzierten Strömungen zurückzuführen ist. Das würde auch die Effekte auf Knochenzellen durch Stimulation mit Ultraschall erklären [96,97]. Da Ultraschall als wachstums- bzw. regenerationsfördernde medizinische Therapie von Weichgewebe zur Verbesserung des Stofftransportes erfolgreich eingesetzt wird, ist ein ähnlicher Effekt im Knochen naheliegend. Die beschriebene therapeutische Wirkung von Ultraschall bei Tibia-Frakturen ließe sich somit ebenfalls auf diesen Effekt zurückführen [98]. Dies wiederum würde den Wert von vielen statischen Zellkulturexperimenten in Frage stellen, weil verschiedene Experimente gezeigt haben, dass sich aktiv versorgte Zellkulturen anders verhalten als statische. So erhöht sich die Matrixproduktion in 3D-Kulturen, wenn diese aktiv betrieben werden [56]. Weiterhin unterscheidet sich die Versorgungssituation von Zellen im Inneren von 3D-Kulturen zwischen aktiv versorgten und passiv betriebenen erheblich [99]. Des Weiteren verändert sich unter diesen Bedingungen, die Interaktion zwischen zwei Zelltypen in Co-Kulturen [62].

Während die Stimulation als Ansatz zum Erhalt der Knochenmasse bzw. als therapeutische Maßnahme gegen Knochenschwund im Fokus der Wissenschaft steht, wird ebenfalls versucht Knochen *in vitro* zu züchten, um größere Knochendefekte reparieren zu können. Auch für dieses Ziel ist ein größeres Verständnis der Knochenregulation und der Wechselwirkungen zwischen den Knochenzellen notwendig.

Auch hier gibt es natürlich vereinzelte Entgegnung, so z. B. durch Chao und Inoue, welche behaupten, dass die biophysikalische Stimulation keinen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat [100]. Zustimmung muss man allerdings Ihrer Aussage, dass die Konzepte nur unzureichend verstanden sind. Und das vor allem weil das Spektrum der

verschiedenen experimentellen Ansätze betreffend Intensität, Peakform und Häufigkeit bzw. Frequenz der Stimulation erheblich variieren [101].

Die Spanne der Experimente reicht von einfachen Versuchen in Zellkulturschalen [24,97,102], über Kultivierung in dafür angepassten Kultursystemen [93,103] bzw. speziellen Mikrofluidiksystemen [65,104,105], bis hin zur mechanischen Stimulation im Tierversuch [96,100,106,107].

Neben den rein mechanischen Effekten besteht auch eine Verbindung zu den elektrischen Stimulationsmethoden, z.B. durch Entstehung von Strömungspotentialen [108] oder über den von Fukada und Yasuda entdeckten Piezoeffekt am Knochen [109]. Mit dem Nachweis des Effektes im biologischen System an „feuchten“ Knochen [110], bietet dieser eine Erklärung, wie mechanische Effekte elektrische Stimuli hervorrufen können bzw. umgekehrt elektrische Stimulationen zu mechanischen Reaktionen führen können.

Gerade bei der elektrischen Stimulation sind die Experimente sehr vielfältig und die Wirkungsmechanismen Gegenstand heftiger Diskussionen [111]. So sind nach der von Schmidt-Rohlfing im Jahr 2000 vorgestellten Metaanalyse die meisten Studien zu dem Thema nicht in ausreichendem Maße aussagekräftig. Seiner Meinung nach ergibt sich daraus folgender Schluss: „Der Einsatz von pulsierenden elektromagnetischen Feldern bei orthopädischen Krankheitsbildern ist bislang wissenschaftlich nicht sicher belegt.“ [112]. Auch Griffin und Bayat kommen, trotz der Nutzung der elektrischen Stimulation im klinischen Betrieb, zu dem Schluss, dass nur sehr wenige gute Studien existieren die den Nutzen elektrischer Stimulation stützen [113].

2.1.6 Kultur in Bioreaktoren

Die 2D-Kultur, insbesondere aber die 3D-Kultur werden immer komplexer und werden, unter dem Aspekt der Optimierung der Zellkulturversorgung in Form von Reaktorsystemen, kontinuierlich weiter entwickelt. So hat beispielsweise die Arbeitsgruppe Vogler [38] die Kultur von MC3T3-E1 in einem Bioreaktor auf Membranen über mehrere Monate erfolgreich demonstriert. Obwohl dieser Ansatz noch als 2D-Versuch ausgelegt war, konnten dennoch Multilayer aus bis zu 6 Lagen geschaffen und über Zeiträume von ca. 120 Tage kultiviert werden. Gerade die erheblich erhöhte Phosphatase-Aktivität sowie die erhöhten Kalziumwerte zeigen, dass dies ein sehr vielversprechender Weg zur Schaffung von *ex vivo* Knochen ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Kultur von MC3T3-E1-Zellen in einem Durchflussbioreaktor, in Form eines Zweikreis-Perfusionssystems beschrieben. Auch hier zeigten sich signifikante Vorteile gegenüber stationärer Kultur [114].

2.1.7 Einfluss von pH-Wert und Sauerstoffkonzentration

Die Weiterentwicklung zu aktiv versorgten Reaktorsystemen ist ein vielversprechender Ansatz. Im Gegensatz zu modernen Großbioreaktoren verfügen diese aber oft über keine Sensorik. Dies wäre für eine Zustandsbeschreibung der Kultur und Optimierung der Kulturparameter aber notwendig. Gerade der Überwachung von pH-Wert als auch von Sauerstoff müsste in mehrlagigen oder 3-dimensionalen Systemen besondere

Aufmerksamkeit geschenkt werden, da diese durch längere Diffusionswege und höherer Zelldichten stark wachstumslimitierend wirken können. Besonders der pH-Wert hat eine steuernde Funktion auf die Knochenbildung [115,116]. So dient ein niedriger (azidoser) pH-Wert im Knochen als Stimulator für die Osteoklasten und gleichzeitig inhibiert er die Knochenneubildung durch die Osteoblasten [117]. Er erhöht unter anderem die Aktivität der ALP und erhöht die Produktion des Osteocalcins [6].

Besonders unter dem Aspekt der Wundheilung, im Zuge einer Fraktur, kommt es zu einer erheblichen Ansäuerung der Mikroumgebung. Wobei besonders auch die Produktion von Entzündungsmarkern, wie Interleukin (IL-6), in den Osteoblasten induziert wird [118,119]. Auch die Einbringung von Knochenschrauben führt durch die Degradation des Knochens zu einer pH-Senkung an der Grenzschicht von Knochen und Schraube [120]. Gleichzeitig wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen pH und Biomineralisation hergestellt [13,121–123]. So führt eine metabolische Alkalose zu einer Stimulation der Osteoblasten bei gleichzeitiger Suppression der Osteoklasten [124]. Dies wird gestützt durch die Beobachtung einer beschleunigten Knochenheilung bei Patienten mit einer respiratorischen Alkalose [8]. In der Literatur gibt es auch eine Anzahl von Negativbeispielen, bei denen gezeigt wurde, dass eine Azidose den entsprechenden negativen Effekt auf die Mineralisation zeigt [125,126]. Der Haupteffekt ist die Freisetzung von Knochenmineralien, weshalb impliziert wird, dass sie in der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt ist [127,128].

Wie wichtig der funktionierende Austausch von Gasen ist wird unter anderem darin deutlich, dass sowohl die Alkalose als auch die Azidose respiratorisch hervorgerufen werden können. Im Körper und in der Zellkultur ist der Einfluss des Gasaustausches auf den pH-Wert ein sehr wichtiger Aspekt. Die Zielgröße des pH-Wertes im arteriellen Blut liegt normalerweise bei pH 7,4, während er im venösen Blut bei ca. 7,36 liegt [3]. Der pH-Wert der interstitiellen Flüssigkeit liegt hingegen generell tiefer und ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Distanz zur nächsten Kapillare, Zelltyp und metabolischer Aktivität. Der Wert ist unzureichend untersucht und wird für Haut, einem sehr gut durchblutetem Gewebe mit pH 7,1 angegeben [129]. Für Knochen gibt es vereinzelte Messungen. Der Wert für sich regenerierenden Knochen von Ratten wird mit pH 7,28 bis zu pH 7,56 angegeben [130]. Der pH-Wert des Blutes nimmt im Alter ab, was als Folge, aber auch als potentielle Ursache von Nierenfunktionsstörungen diskutiert wird [131]. In diesem Zusammenhang könnte die gestörte Homöostase des Kalziumhaushaltes als potentielle Ursache für altersbedingte Osteoporose betrachtet werden [132].

Eine der wichtigsten Nebenfunktionen der Skelettknochen ist die Eigenschaft als Reserve zur Pufferung der Ansäuerung zu dienen, wenn die Nieren oder die Lungen nicht mehr fähig sind das Säure-Base-Gleichgewicht in engen Grenzen zu halten [6]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Änderungen des pH-Wertes einen direkten und unmittelbaren Einfluss auf die Knochenresorption haben.

Neben der pH-Wert Stabilisierung besteht noch die Notwendigkeit der ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff. Gerade die problematische Versorgung in 3D-Scaffolds macht

die aktive Versorgung des Scaffolds und Kontrolle des Sauerstoffgehaltes während der Kultur so wichtig [99]. Die Umstellung der metabolischen Prozesse der Zellen unter hypoxischen Bedingungen [67,117,133], kann wiederum die Ansäuerung beschleunigen. Wobei Zellen relative lange unter hypoxischen Bedingungen überleben können, was nicht verwundert, da die Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* zwischen 12 % im arteriellen Blut und 3 % in normalen Gewebe beträgt [134]. Bereits in den Lungenalveolen sinkt die Sauerstoffkonzentration auf 14 % ab, während die CO₂-Konzentration 5,6 % beträgt [3].

Für Stammzellen wird zudem eine regulierende bzw. stimulierende Wirkung der Hypoxie beschrieben, wodurch diese die Proliferation oder Lebensspanne erhöhen können [135–137]. Dies wird als eine Möglichkeit für die regenerative Medizin betrachtet, da die hypoxische Vorkonditionierung von Zellen die Adhäsion und Überlebensfähigkeit *in vivo* erhöhen kann [138,139].

2.2 Optische Sensorik

Die Messung des Sauerstoffgehaltes ist in vielen Bereichen, wie der Medizin, der Bioverfahrenstechnik, der Chemie, der Gewässerkontrolle oder der Zellbiologie von Interesse und hat daher viele Messsysteme hervorgebracht. Für die Messung von Sauerstoff im biologischen Bereich haben sich vor allem einige der optischen Methoden durchgesetzt. Neben technisch anspruchsvollen Techniken wie der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) [140], sind mittlerweile auch kommerziell verfügbare preisgünstige Systeme verfügbar (z. B. Pulox Pulsoximeter), die auch für Laien benutzbar sind und auf der Pulsoxymetrie basieren [141].

Für die Überwachung des Sauerstoffes werden neben den elektrochemischen Messmethoden, vor allem auf Fluoreszenz bzw. auf Phosphoreszenz basierende Methoden verwendet [142–145]. Ähnlich sieht es bei der Messung des pH-Wertes aus. Obwohl hier die elektrochemische pH-Wert Bestimmung dominiert, gibt es auch hier fortgeschrittene optische Sensoren (z. B. von Polestar Technologies, Inc. Ma, USA). Im Falle von Sauerstoff ist der wesentliche Vorteil der optischen Sensoren, dass diese keinen Eigenverbrauch besitzen. Ein Nachteil aller optischen Sensoren ist die Notwendigkeit Lichtleiter zur Auslesung des Sensors bis zum Messgut zu führen, womit die Komplexität steigt bzw. eine optische Zugänglichkeit (Mikroskopierbarkeit) gewährleistet werden muss. Ein Beispiel für einen optischen Sauerstoffsensoren für Zellkultur und Bioreaktoren wäre das OxyLite System [146], ein kommerzielles System, das auf Rutheniumchlorid als sauerstoffsensitivem Material basiert. Die Fluoreszenzlebensdauer dieses Fluoreszenzfarbstoffes ist umgekehrt proportional zur Sauerstoffkonzentration, sodass über Messung der Fluoreszenzabklingzeit die Sauerstoffkonzentration bestimmt werden kann. Auf dieser Basis funktionieren auch die in dieser Arbeit verwendeten PreSens-Systeme für pH und Sauerstoff (www.presens.de). Alternative, neuere Konzepte basieren auf Holographie, wobei die Farbänderung eines speziellen Testsubstrates ausgelesen wird und die für die Verwendung in der Zellkultur bzw. *in vivo* von Interesse sein könnten [147].

2.3 Elektrochemische Sensoren

In der Biosensorik und der elektrochemischen Sensorik im biologischen Umfeld finden sich verschiedene elektrische Messmethoden, welche sich im Wesentlichen nach ihren Messsignalen unterteilen lassen. Die Messung des Stromes als Antwort auf ein gegebenes Potential bzw. auf eine Potentialverschiebung, wie die Zyklovoltammetrie und die Amperometrie zählen zu diesen Methoden. Die auf der Auswertung von Strom-Spannungskurven basierenden Methoden werden unter dem Begriff *Voltammetrie* zusammengefasst [148].

Die Alternative ist die möglichst stromlose Messung eines Potentials an einer Elektrode gegenüber einer Referenz. Dieses als Potentiometrie bezeichnete Verfahren wird in Form von sogenannten Indikatorelektroden verwendet [149]. Die häufigste und bedeutendste Elektrode ist hierbei die pH Elektrode, oft in Form der Einstabmesskette. Die dritte Variante der elektrochemischen Messung beinhaltet die Messung des Widerstandes. Dies kann die Messung der Leitfähigkeit in Form der Konduktometrie, aber auch die Messung des komplexen Wechselstromwiderstandes sein, damit lassen sich unter anderem die Änderungen von Lösungen oder Grenzflächenänderungen beispielsweise durch chemische Umsetzungen bestimmen.

Die Vorteile elektrochemischer Sensoren sind die einfache Realisierung der Elektroden in lithographischen Prozessen oder in Dickschichttechnik. Auch sind Sie als CMOS Systeme mit hohen Integrationsmöglichkeiten, mit zum Beispiel interner Verstärkung, realisierbar [150,151]. Die Sensoren können als Dünnschichtsensoren auf Siliziumbasis [152] aber auch als Edelmetallsensoren auf Glas ausgeführt sein [153–155]. Eine Vielzahl weiterer Kombinationen inklusive flexibler Substrate sind möglich [156].

Neben der direkten Messung eines Parameters werden diese Sensoren auch zur indirekten Messung von Substanzen herangezogen. Elektrochemische Sensoren zur Messung von O₂, pH und Impedanz sind die häufigsten elektrischen Transducerelemente in Biosensoren [28,156,157]. Sie ermöglichen die Messung einer Vielzahl weiterer Substrate wie beispielsweise Toxinen [158], Hormonen [159], Stickoxiden [160,161], DNA [162,163], Glucose [164–167] und Lactat [168].

2.3.1 Sauerstoffsensoren

2.3.1.1 Clark Sauerstoffsensor

Der erste elektrochemische Sauerstoffsensor für biologische Anwendungen wurde von Leyland C. Clark 1956 entwickelt [169]. Er bestimmt den Sauerstoffgehalt basierend auf der elektrochemischen Umsetzung des gelösten Sauerstoffes und der Messung des daraus resultierenden Stromes. Der Sensor nach Clark besteht aus einer Arbeitselektrode aus Platin und einer Gegenelektrode zweiter Art; in diesem Fall einer Ag/AgCl-Elektrode, welche durch eine sauerstoffpermeable Membran (Teflon, Cellophan) vom Analyt getrennt sind. Der im Messgut befindliche Sauerstoff diffundiert durch die Membran und wird dann elektrochemisch umgesetzt (Abbildung 2-1). Es handelt sich somit um einen

amperometrischen Sensor, bei dem die Spannung an der Arbeitselektrode, relativ zur Lösung konstant gehalten wird. Das Messsignal - der Diffusionsgrenzstrom - ist proportional zur Sauerstoffkonzentration. Die Arbeitselektrode wird je nach Quelle und Aufbau mit angelegten Gleichspannungen von -550 mV [155] bis 800 mV [148] betrieben. Nach Clark ist der Spannungsbereich von -600 bis -800 mV (vs. Ag/AgCl) nutzbar [169].

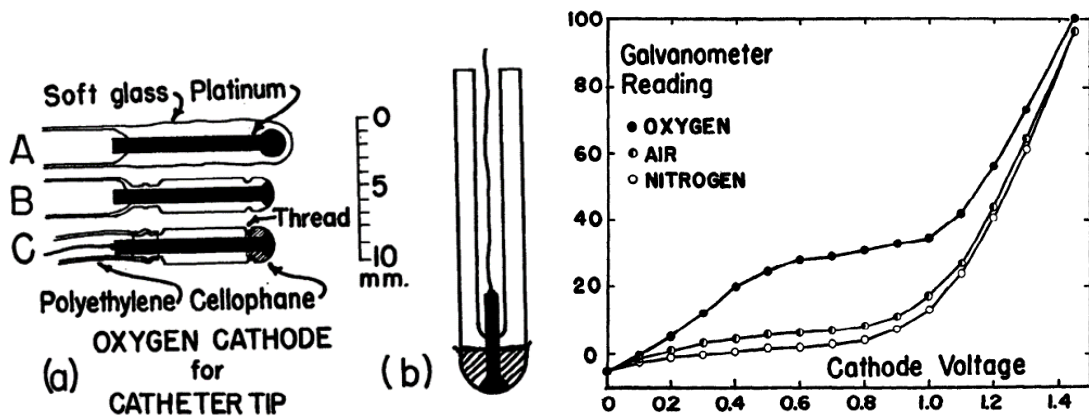


Abbildung 2-1: Sauerstoffelektroden von Clark und dazugehörige Messung des Reduktionsstromes.

(a) Herstellung der Elektroden: A, Einguss der Platinelektrode in Glas. B, abschleifen des Glases und Herstellen einer Nut für die Folie. C, nach Anbringung der Zellophan-Folie und Anlöten des Kupferdrahtes. (b) fertige Elektrode. Rechts: Messungen bei verschiedenen Sauerstoffgemischen in isotonischer Salzlösung bei 40 °C. [169]

Basierend auf dem Clark Prinzip gibt es verschiedene Weiterentwicklungen, welche sich vor allem im Material der Membran [170,171] und Aufbau der Elektroden [155,172] unterscheiden, aber alle die Messung des Diffusionsgrenzstromes gemeinsam haben.

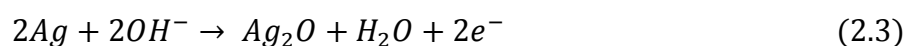
Die Umsetzung des Sauerstoffs an der Kathode erfolgt nach Formel (2.1), die Gegenreaktion an der Anode (Ag/AgCl) entspricht Formel (2.2). Eine alternative Anodenreaktion, welche den Verbrauch der produzierten Hydroxidionen (OH^-) zur Folge hat entspricht Formel (2.3) [148].



Die Umsetzung des Sauerstoffs führt zu Bildung von OH^- Ionen, welche in Lösung übergehen bzw. an der Gegenelektrode verbraucht werden. Für die Standard Clark-Elektrode wird für die Gegenreaktion die Formel (2.2) angegeben, da die Gegenelektrode eine Silberchloridelektrode ist die im Idealfall in gesättigter KCl-Lösung liegt und über ein Diaphragma den Stromkreis zur Arbeitselektrode schließt.



Die alternative Gegenreaktion (Formel (2.3)) ist seltener angegeben. Sie stellt aber die wahrscheinlichste Reaktion dar, wenn der Referenzelektrode nicht genug Chlorid-Ionen für die Standardreaktion zur Verfügung stehen. Dies kann z. B. bei Pseudoreferenzsystemen ohne KCl Reservoir der Fall sein [173,174].



Im Zuge der Weiterentwicklung seit der Beschreibung durch Clark sind die meisten O₂-Elektroden aufgrund der Miniaturisierungsbestrebungen bzw. aufgrund des Lab-on-a-Chip Fokus in Form von planaren Elektrodensystemen realisiert worden. Zumeist werden die Arbeitselektroden durch verschiedene Varianten mit einer Sauerstoff selektiven Schicht, z. B. Nafion [170] oder anderen Membranen [155] versehen. Als andere Modifikation ist das sogenannte Ross-Prinzip, bei welchem die 2-Elektrodenanordnung durch eine 3-Elektrodenanordnung ersetzt wurde [172,175]. Hierbei ist eine dedizierte Gegenelektrode aus Platin vorhanden, an welcher die Rückreaktion der OH⁻-Ionen erfolgt. Entsprechend den Entwicklern ist dies vorteilhaft, da die Sauerstoffzehrung des Sensors und somit die Gegenreaktion entsprechend Formel (2.2) minimiert wird. Dadurch sind Pseudoreferenzen wesentlich länger nutzbar und der Sensor kann vergrößert werden, ohne die Sauerstoffzehrung zu steigern.

2.3.1.2 Weiterentwicklungen basierend auf Sauerstoffsensoren

Sauerstoffsensoren können weiterhin als Transducer für enzymatische Prozesse in Biosensoren genutzt werden. Die meist genutzte Modifikation des Sauerstoffsensors ist der Glucose-Sensor. Hierbei ist auf dem Sauerstoffsensor ein sauerstoffverbrauchendes, Glucose abbauendes Enzym, meist Glucose-Oxidase aufgebracht [164,176]. Dieser Sensortyp ist auch der kommerziell erfolgreichste. Er wird für die Blutzuckerbestimmung von Diabeteskranken verwendet [165]. In Mikrofluidiksystemen wird die Konzentration bzw. der Verbrauch von Glucose durch Zellen bestimmt. Durch Verwendung anderer Sauerstoff verbrauchender Enzyme (Bsp. Lactat-Oxidase) können weitere Analyten detektiert werden. Besonders die Kombination von Lactat- und Glucose-Sensor ermöglicht die Unterscheidung zwischen anaerober und aerober Stoffwechselwege [168].

2.3.2 pH-Sensoren

Die häufigste Form der elektrochemischen pH-Elektrode ist die Einstabmesskette, sie ist in verschiedenen Formen in jedem Labor zu finden. Es handelt sich hierbei um ein Konzentrationselement, welche die Konzentrationsdifferenz von H⁺-Ionen misst. Gemessen wird die Potentialdifferenz zwischen einer inneren (Referenzlösung) und der äußeren (Messlösung) an der Grenzschicht der Glasmembran [148]. Die Potentialdifferenz (ΔE) berechnet sich hierbei nach Gleichung (2.4), wobei die Referenzlösung (pH_r) standardmäßig auf den Wert von pH 7 justiert ist und die Differenz zur Messlösung (pH_m) mit dem Faktor von $-0,059 V$ (bei Raumtemperatur, entspricht der Sensitivität der Elektrode) multipliziert wird [177]. Das berechnete Potential kann dann direkt in den pH-Wert der Messlösung umgerechnet werden.

$$\Delta E = -0,059 V * (pH_r - pH_m) \text{ mit } pH = -\lg(aH^+) \quad (2.4)$$

Aufgrund der Notwendigkeit einer Referenzlösung und der Integration einer Referenzelektrode in der Referenzlösung ist dieser Elektrodentyp nur begrenzt miniaturisierbar und wird daher z. B. für Lab-on-Chip Anwendungen nicht verwendet.

Für die Integration von elektrochemischen Sensoren in Mikrofluidiksysteme kommen daher hauptsächlich Sensoren auf Basis von Ionensensitiven Feldeffekttransistoren oder potentiometrische Sensoren mit Iridiumoxid zum Einsatz [26,178–185].

Feldeffekttransistoren (FETs) sind potentialgesteuerte Halbleiterbauelemente auf Siliziumbasis[186]. Dieser steuert den Stromfluß zwischen „Source“ und „Drain“ durch eine Potentialänderung einer Elektrode am „Gate“ des Transistors.

Bei einem **Ionensensitiven Feldeffekttransistor (ISFET)** wird die Elektrode durch ein chemisches oder biologisches Erkennungselement, im Falle eines pH-Sensors also durch eine H^+ -Ionen sensitive Schicht ersetzt. Dadurch wird der Strom über die Potentialdifferenz in der Membran gesteuert. Die Verhältnisse in der Schicht sind wiederum abhängig von der Lösungsaktivität der Ionen in dem Medium, welches in Kontakt mit der Membran steht, sodass sich das konzentrationsabhängige Potential zu der an der Referenzelektrode angelegten Gatespannung (z. B. Ag/AgCl Elektrode) addiert [149,187].

Dieser Sensortyp ist weit verbreitet [150,151,166,188], unter anderem weil viele Enzym-modifizierte FETs auf pH-sensitiven ISFETs aufbauen (Abbildung 2-2). Der wesentliche Vorteil dieses Sensortypes ist die gute Miniaturisierbarkeit [29]. Weiterentwicklungen des Sensortyps betreffen vor allem Modifikationen der sensitiven Schicht durch Oberflächenvergrößerung, z. B. durch poröse SiO_2 -Strukturen [189,190]. Der Fokus der Forschung liegt aber auf der Membran des Gates. Für die pH-Messungen werden vor allem anorganische Materialien wie Al_2O_3 , Si_3N_4 , SiO_2 , Ta_2O_5 , RuN oder TiO_2 verwendet [5,178–182].

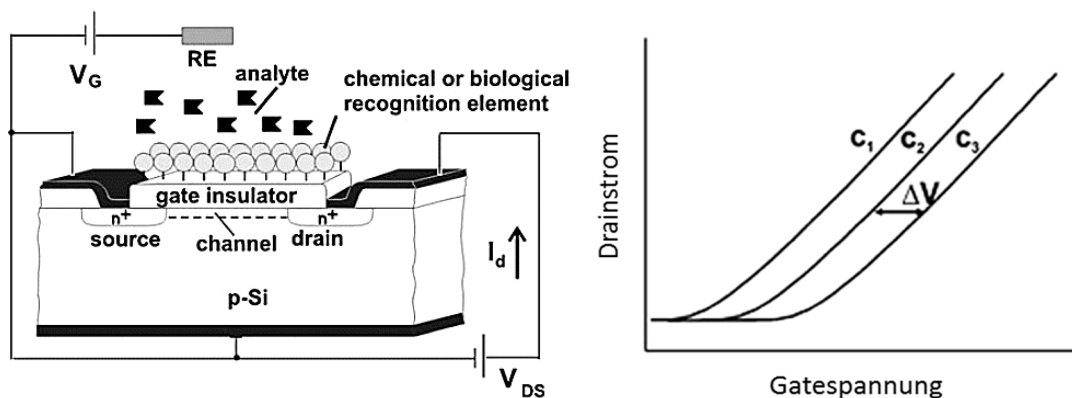


Abbildung 2-2: Exemplarische Darstellung eines FETs und dem Strom-Spannungs-Diagramm.

Biosensor basierend auf einem FET als Transducer, entnommen aus Schöning und Poghossian [191] mit exemplarischem Strom-Spannungs-Diagramm, c_1 - c_3 entsprechen unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten.

Als das am häufigsten verwendete und somit auch am besten untersuchte Gatematerial kann Siliziumnitrid (Si_3N_4) angesehen werden [180,192]. Es hat eine gute Sensitivität und Stabilität. Vor allem ist es ein Standardmaterial in der Mikroelektronik, sodass seine Prozessierung gut beherrscht wird und weshalb es für diese Arbeit verwendet wurde.

2.3.2.1 Theorie der Potentialentstehung an Si_3N_4 -Schichten

Da die in dieser Arbeit beschriebenen Sensoren auf dünnen Si_3N_4 Membranen basieren kann das Modell der Potentialentstehung an Si_3N_4 -ISFETs auch für die potentiometrisch arbeitenden Sensoren verwendet werden. Die Potentialentstehung an der Grenzfläche zwischen Membran und Elektrolyt (Medium) ist komplexer als bei der Glaselektrode und abhängig von der Art der Membran. Für die Potentialausbildung wird weiterhin die Nernst-Gleichung (2.5) herangezogen [187].

$$E = \text{const} + \frac{RT}{F} \ln a_{\text{H}^+} \quad (2.5)$$

E = Elektrodenpotential; $R = 8,31447 \text{ J}/(\text{mol K})$; $T = 298,15 \text{ K}$, a = Aktivität

Aus ihr ergibt sich das Sensitivitätsmaximum von -0.059 V/pH (bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) für die Glaselektrode bei Messung einwertiger Ionen wie in Gleichung (2.4). Für die sensitiven Schichten auf den ISFET gilt dieser Wert daher ebenfalls als Maximum. Die meisten Substrate erreichen diesen Wert nicht, weil die Einschränkungen des ungehinderten Austausches von Ionen zwischen Elektrolyt und Membran, die Einstellung eines elektrochemischen Gleichgewichtes und damit die Ausbildung eines definierten Potentials negativ beeinflussen.

Um die Potentialentstehung und Sensitivitätseinstellungen an sensitiven Membranen und die Einflüsse der Fertigungstechnologien zu beschreiben bedurfte es neuer Modelle [179,187,193]. Nach Hara *et al.* [192] findet die Ladungsgenerierung in den äußeren 100 \AA (10 nm) der Membran statt, welche durch den Kontakt mit der Lösung ionisch leitfähig wird. Das Modell, welches die Potentialentstehung beim ISFET am besten erklärt und sich als das gängige Modell etabliert hat, ist das Site-Binding-Modell.

2.3.2.2 Das Site-Binding-Modell

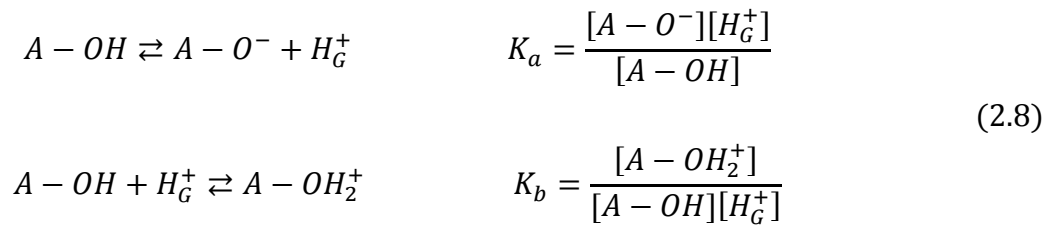
Nach Redlin [187] basiert dieses Modell auf Vorstellungen, die von „kolloidchemischen Arbeiten zur Potentialbildung an der Grenzfläche Metalloxid/Elektrolyt ausgehen“. Basierend auf dem Modell befinden sich an der Oberfläche der sensitiven Membran, welche dem Gateisolator entspricht bzw. auf diesen aufgebracht ist, eine diskrete Anzahl amphoterer OH Gruppen, die mit den H^+ -Ionen des Elektrolyten in einem Reaktionsgleichgewicht stehen. Über das Ionenprodukt des Wassers $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$ stehen H^+ -Ionen und OH^- -Ionen wiederum zueinander in Beziehung. Infolge der Gleichgewichtseinstellung befinden sich 3 verschiedene Verbindungen an der Oberfläche des Isolators: A-O^- , A-OH , A-OH_2^+ , wobei A für Silizium bzw. Metallatome bei Metalloxiden steht. Die Dichte der Ladungsgruppen des Isolators (N_I) ist hierbei materialabhängig:

$$N_I = [\text{A} - \text{O}^-] + [\text{A} - \text{OH}] + [\text{A} - \text{OH}_2^+] \quad (2.6)$$

Die sich ergebende Ladungsdichte (σ) an der sensitiven Oberfläche des Isolators entspricht:

$$\sigma_I = q(-[\text{A} - \text{O}^-] + [\text{A} - \text{OH}_2^+]) \quad (2.7)$$

Somit ergeben sich zwei potentialbestimmende Reaktionsgleichgewichte an der Isolatoroberfläche wobei H_G^+ der H^+ -Ionenkonzentration an der Grenzfläche Elektrolyt-Isolator entspricht [5,194]:



Der Zusammenhang der H_G^+ Konzentration zur H^+ Konzentration im Elektrolyten lässt sich unter der Annahme einer Boltzmannverteilung mit Formel (2.9) beschreiben. Hierbei entspricht ψ_I dem Potential an der sensitiven Schicht und ψ_E dem Potential im Elektrolyten.

$$[H^+] = [H_G^+] e^{-\frac{q}{kT}(\psi_I - \psi_E)} = [H_G^+] e^{-\frac{q}{kT}(\psi_{IE})} \tag{2.9}$$

Eine umfangreiche Betrachtung der weiteren Herleitung der finalen Sensitivitätsfunktion (2.10) mit dem Sensitivitätsparameter β und der Doppelschichtkapazität C_{DL} , findet sich in den Arbeiten von Meixner, Hame, Redlin sowie von Köhler und Landgraf [181,187,192,195].

Bei Verwendung der in diesen Arbeiten für Si_3N_4 bestimmten Parametern, mit $pK_a=5,2$; $pK_b=0,8$; $pH_{pzc}=5,2$ sowie der Ladungsdichte $N_I/cm^2 = 5 \cdot 10^{14}$ [5,181,187], ist diese Sensitivitätsfunktion nicht linear und kleiner als die Nernstsche Sensitivitätsfunktion. Entsprechend den Messungen von Meixner und Koch [195] ist dies abhängig von den Oberflächengruppen, je mehr Aminogruppen umso besser die Sensitivität und Linearität. Bei Verhältnissen höher als 3:2 (Amino:Silanol Gruppen) kann von einem linearen Verhalten im Bereich von pH 2 bis pH 11 ausgegangen werden. Die maximal erreichbare Sensitivität variiert hierbei je nach Quelle zwischen 54 mV/pH (30 nm Si_3N_4) [196] und 57,9 mV/pH (100 nm Si_3N_4) [180], wobei die Entstehung von SiO_2 -Gruppen den Wert auf durchschnittlich ca. 41 mV (und weniger) sinken kann [192].

$$\psi_{IE} = -2,303 \frac{kT}{q} \frac{\beta}{\beta - 1} pH + \frac{\sigma_H}{C_{DL}(\beta - 1)}$$

mit dem Sensitivitätsparameter β : (2.10)

$$\frac{1}{\beta} = \frac{kT}{q} * \frac{C_{DL}}{qN_I \sqrt{4K_a K_b}}$$

2.3.2.3 Alternative pH-Sensoren

Neben den ISFETs gibt es noch Sensoren die nach dem potentiometrischen Prinzip arbeiten. Materialien sind hierbei neben Polymeren [197,198] zumeist Oxide bestimmter Metalle. Am häufigsten ist der Sensor auf Iridiumoxidbasis [199]. Es gibt aber auch Sensoren die Rutheniumoxid, Palladiumoxid oder Platinoxid verwenden [153,200]. Diese zeigen oft eine geringere Stabilität und Sensitivität als die Iridiumoxidsensoren. Diese Metalloxidsensoren werden durch Sputterdeposition, PE-CVD bzw. elektrochemische Abscheidung auf Metallelektroden hergestellt. Aufgrund ihrer geringen Größe sind sie neben den ISFETs eine elektrische Sensoralternative für mikrofluidische Systeme [183–185]. Nachteile sind die seltenen und damit teuren Metalle. Für Iridiumoxid ist Super-Nernst Verhalten beschrieben, wodurch diese Sensoren eine außergewöhnlich hohe Sensitivität aufweisen können [199,201]. Für die potentiometrischen Metalloxidsensoren werden oft keine Haltbarkeiten angegeben, diese dürften aber in der Größenordnung der ISFET-Varianten liegen (3-5 Wochen) [187,202]. Für die Polymersensoren werden Maximalwerte von 20 Tagen genannt [197,198].

2.3.3 Interdigitierende Elektrodenstrukturen (IDES)

Impedanzspektroskopie ist eine immer häufiger verwendete Technik in den bioanalytischen Anwendungen wie Screening und Zellkulturüberwachung [203–206]. Typische Verwendung findet sie in der Lebensmittelanalyse [207], bei Toxizitätstests [208] und sie kann auch zur Zelltypbestimmung dienen, da die Spektren zellspezifisch sein können [206]. Weiterhin werden Impedanzsensoren als Transducer für Biosensoren verwendet [157,209]. Die für die auf den in dieser Arbeit präsentierten Chips aufbrachten Elektroden wurden in Form zweier ineinandergreifender (interdigitierende) Elektroden ausgeführt da dies die gängigste Bauform für planare Elektroden ist.

Die Impedanz ist ein komplexer Wert, der als Quotient der Strom-Spannungsfunktion

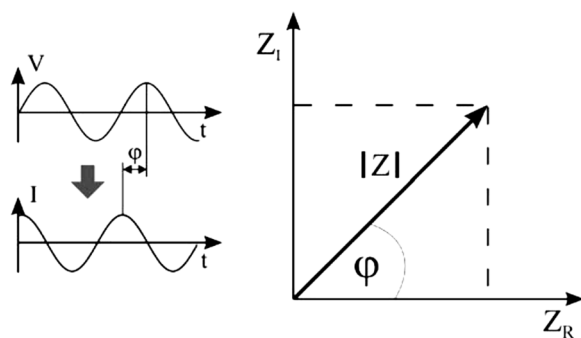


Abbildung 2-3: Verhalten von Spannung (V) und Strom (I) als Funktion der Zeit von Wechselstrom.

Die Impedanz kann als Modulus $|Z|$ und Phasenwinkel φ oder durch den Realteil (Z_R) und den Imaginärteil (Z_I) angegeben werden [157].

definiert ist (Siehe Abbildung 2-3). Für die Messung der Zelladhäsion wird in der Literatur überwiegend die Impedanz bei einer festen Frequenz bestimmt. Alternativ und zur Bestimmung der Sensorcharakteristik bzw. der zellspezifischen Impedanz werden Spektren über einen größeren Frequenzbereich gemessen [206]. Im Grunde besteht ein Impedanzsensor aus zwei Elektroden, die als Äquivalent zu einem Plattenkondensator betrachtet werden können [210]. Zwar

haben auch die geometrischen Parameter der Elektrode Einfluss auf die Funktion [211]. Da sich die Elektrodengröße nicht ändert, ist das Signal hauptsächlich abhängig von der Grenzfläche zwischen Elektroden und Elektrolyt sowie von den Eigenschaften des

Elektrolyten selbst. Bei Änderung der Grenzfläche durch Zellbewuchs oder Adhäsion von Molekülen ändern sich die gemessene Kapazität und der Widerstand, was als Messsignal erfasst wird. Auch die Schichtdickenänderung, z. B. durch Bindung von Molekülen an gebundene Antikörper oder bei Hybridisierung an fixierte DNA Einzelstränge, kann somit detektiert werden [205]. Für die Beschreibung der Vorgänge am Sensor wird auf Ersatzschaltbilder zurückgegriffen [157]. Ein allgemeines Schaltbild für eine elektrochemische Zelle aus zwei Elektroden ist in Abbildung 2-4 dargestellt.

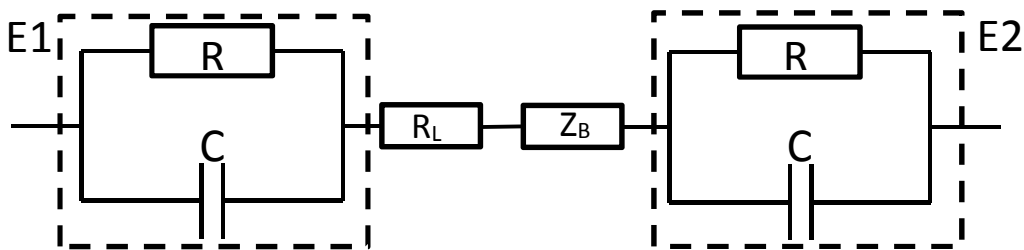


Abbildung 2-4: Ersatzschaltbild für eine elektrochemische Zelle.

R_L = Lösungswiderstand, Z_B =Impedanz des biologischen Elementes, E1, E2 = Elektroden 1 und 2 mit R =Elektrodenwiderstand (Durchtrittswiderstand) und C =Kapazität der jeweiligen Elektrode

In den Widerstand bzw. die Kapazität der einzelnen Elektrode gehen zwar Leitungseffekte mit ein, aber der Durchtrittswiderstand der Elektronen aus der Elektrode ins Elektrolyt bzw. die Kapazität der elektrochemischen [149] Doppelschicht stellen den Haupteinfluss dar. Dazu kommen der elektrische Widerstand des Elektrolyten und die Impedanz des biologischen Elementes (z. B. Beschichtungen, Zellen, gebundene Moleküle). Dieses Modell ist sehr vereinfacht und kann noch erweitert bzw. modifiziert werden, es ist aber für die meisten Anwendungen ausreichend [157].

2.4 Mikrofluidik

2.4.1 Mikrofluidiksysteme

Mit Mikrofluidiksystemen wird versucht möglichst viele, oft komplexe Prozesse wie Bindungsreaktionen [158], Separation [212], Vervielfältigung [213] und Mischung [214] zu miniaturisieren und zu automatisieren [215]. Hierbei wird versucht ein „Lab-on-a-Chip“ zu schaffen, um langfristig „Point-of-Care“ Diagnostik für medizinische Anwendungen anbieten zu können [216–218]. Die Anzahl an Publikationen zu dem Thema ist sehr umfangreich, doch trotz erheblichen Forschungsaufwandes gibt es kaum kommerzielle Produkte [215]. Im Folgenden wird aus thematischen Gründen nur auf die Zellkultur auf Chips bzw. auf 2.4.1 Zell-Monitoring Systeme eingegangen.

2.4.2 Zell-Monitoring-Systeme

Aus dem Englischen „cell monitoring systems“ übersetzt, beschreibt es die zellbasierte Variante eines Lab-on-Chip-Systems bei der eine lebende Zellkultur auf den Systemen etabliert und mithilfe der integrierten Sensoren überwacht wird. Die Chips basieren häufig auf Dünnschichttechnik [219,220]. Vor allem weil die gängigen Methoden und Materialien der Mikrotechnologie genutzt werden, basieren die Chips und Sensoren größtenteils auf Silizium [5,178,221,222]. Immer häufiger werden auch Chips aus Glas gefertigt, da eine

mikroskopische Beobachtung bzw. die Integration von optischen Sensoren erwünscht ist [150,200]. Unter anderem ermöglichen optisch durchlässige Systeme auch die Bestimmung der optischen Dichte [223].

Die Steigerung stellen 3D-Systeme dar [76,224], bei denen die Integration von Sensoren zur Überwachung aufgrund fehlender visueller Zugänglichkeit notwendiger, aber auch komplexer wird. Es gibt einzelne kommerzielle Systeme wie das Bionas System, welches als Ausgangssystem für diese Arbeit verwendet wurde [133,225]. Ein weiteres System ist IMOLA (intelligent mobile lab) eine kommerziell vertriebene Variante eines „Diagnostik-Systems“ mit umfassenderer sensorischer Überwachung [226].

2.4.3 Anschluss und Verbindungstechnik

2.4.3.1 Elektrisch

Die elektrische Anbindung erfolgt in den meisten Fällen durch Federstifte [217], aber auch FFC-Verbinder [26] und einfache Lötverbindungen werden häufig verwendet [227]. Die einzelnen Varianten weisen Vor- und Nachteile auf, welche den Anforderungen entsprechend abgewogen werden müssen, um die jeweils am besten geeignete Lösung zu finden. Eine all-in-one Lösung ist bisher nicht verfügbar.

2.4.3.2 Fluidisch

Die fluidischen Anschlusskonzepte bestehen generell aus fixierten Kanülen über die die Verbindungsschläuche gezogen werden [228]. Für komplexere Systeme kommen Durchfluskköpfe (Deckel, „Flow cells“) zur Anwendung, welche die Schlauchanschlüsse beinhalten und durch Anpressen auf die Fluidik die Verbindung herstellen [133,168,178,221]. Diese Variante kommt auch bei dem GeSiM-System zur Anwendung bei dem die Fluidik durch Anpressen auf den Chip geschlossen wird. Trotz vielversprechender Ansätze [229] gibt es bisher kein Standardsystem, was an den zu komplexen Anforderungen oder aber an den hohen Fertigungskosten aufgrund zu geringer Stückzahlen liegen könnte.

2.5 Mikrofluidik basierend auf PDMS

In der Forschung ist PDMS das Standardmaterial für die Fertigung von Mikrofluidiksystemen. Es zeichnet sich durch eine Vielzahl positiver Eigenschaften aus: es ist hochtemperaturstabil ($>250\text{ °C}$), chemisch inert, biokompatibel, elastisch und transparent. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff in PDMS ist mit $3.56 \times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ bei 25 °C bzw. $5.00 \times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ bei 38 °C [145], sogar höher als in Wasser ($3.33 \times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ bei 40 °C [230]). Da das PDMS beginnend bei Raumtemperatur bis $>100\text{ °C}$ durch das Vernetzen des Monomers (Dimethylsiloxan) mit dem Vernetzungsreagenz hergestellt werden kann, gibt es vielfältige Möglichkeiten der Formgebung. Für die Mikrofluidik wird die Vernetzung auf bzw. in den formgebenden Werkzeugen durchgeführt und das PDMS dann herausgenommen. Die Möglichkeit es durch Plasmabehandlung kovalent mit Glas zu verbinden, ist einer der Gründe für die Kombination von PDMS und Glas in Mikrofluidiksystemen. Neben den in 2.4.2 genannten Varianten wurden verschiedene

Formen von Mikropumpen und Ventilen [215,231–233], sowie Mikroreaktoren [234], Insulininjektoren [167] Perfusionsreaktoren [78] als auch 3D-Systeme [235] in PDMS realisiert.

2.6 Mikrofluidik in Glas

Für die Mikrofluidik ist die Verwendung von Glas aus vielfältigen Gründen von hohem Interesse. Die Vorteile sind seine Festigkeit von Glas, Gasundurchlässigkeit und die Möglichkeit Leiterbahnen oder Elektroden aufzubringen, was für die Fertigung von Sensorchips essentiell ist [236]. Deshalb wird versucht Kanäle der Mikrofluidik nicht (mehr) aus PDMS, sondern direkt in Glas zu fertigen. Neben den isotropen Ätzverfahren mit Masken und Flusssäure, welche sowohl umständlich als auch gefährlich sind, werden größere Strukturen auch durch „Sandstrahlen“ strukturiert. Beide Verfahren haben aber den Nachteil einer hohen Oberflächenrauigkeit. Neuartige photostrukturierbare Gläser (Forturan™) bieten die Möglichkeit, Mikrofluidik in Glas mit geringerem Aufwand [237] und hohen Oberflächengüten zu schaffen. Eine weitere, neuere Fertigungsmethode ist das Laserprozessing [238]. Bei diesem Verfahren werden mit Ultrakurzpuslasern Kanäle in Glas [239] oder andere Materialien mit einer hohen Oberflächengüte eingebracht [240]. Auch die Fertigung von 3D Strukturen in transparenten Materialien möglich sind [239,241].

2.7 Konventionelle Chipfertigung

Die Entwicklung und Fertigung von Strukturen auf Glas wird standardmäßig durch Nutzung von Techniken der Mikroelektronik realisiert. Diese Techniken basieren auf der Abscheidung eines Photoresistes, dessen Belichtung durch eine Maske mit der abzubildenden Struktur und der Entwicklung des Resists. Das entwickelte Resist lässt sich je nach Typ danach entfernen oder verbleibt auf der Oberfläche, sodass ein Negativ bzw. Positiv der herzustellenden Struktur geschaffen wird. Bei der Lift-Off Technik (additiv) wird das Material z. B. durch Sputtern aufgetragen. Es muss also die zu strukturierende Fläche frei von Resist sein. Beim Ätzen wird das Material abgetragen, sodass der Resist als Schutz funktioniert, weshalb die Struktur mit Resist bedeckt bleiben muss (subtraktiv). Je nach Fertigungsart (additiv bzw. subtraktiv) können nun Strukturen hergestellt werden, die den vorgegebenen Formen der Maske entsprechen. Die im Lehrstuhl für Biophysik hergestellten Strukturen basieren auf Platinstrukturen, die partiell oder vollständig mit Si_3N_4 beschichtet werden. Diese Strukturen werden von der Firma GeSiM (GeSiM GmbH, Grosserkmannsdorf, DE) unter Nutzung der Lift-Off Technik produziert. Hierbei wird der Resist so strukturiert, dass die Platin-Strukturen frei bleiben, und alle anderen Flächen mit dem Resist bedeckt sind. Die Beschichtung mit Platin erfolgt dann in einem Sputterprozess. Vor der Beschichtung mit Platin wird noch eine sehr dünne Schicht Titan aufgebracht, um die Haftung des Platins auf z. B. Borosilikatglas zu verbessern. Durch den nachfolgenden Reinigungsprozess wird das Resist „gestrippt“, das heißt es wird aufgelöst und abgetragen. Die auf dem Glas aufgesputterten Strukturen bleiben zurück, während das auf dem Resist aufgesputterte Material mit diesem abgetragen wird. Diese Technik erfordert einen relativ hohen Aufwand. Neben dem obligatorischen Reinraum, müssen auch die verwendeten

Resiste sowie die Prozessparameter gut kontrolliert werden. Die beiden häufigsten Probleme hierbei sind die unzureichende Reinigung nach Entwicklung des Resists und der unzureichende „Unterschnitt“ des Photolacks. Werden die unentwickelten Bereiche nicht vollständig entfernt, so verbleiben Reste in den Bereichen auf denen in nachfolgenden Prozessen die Strukturen abgeschieden werden sollen. Dies führt zu stark reduzierter Haftung der Strukturen und deren Ablösung im Laufe der weiteren Bearbeitung oder bei Benutzung der Chips durch den Endanwender. Bei fehlendem oder zu schwachem „Unterschnitt“ des Lackes, kommt es zu einer Verbindung des ganzflächig abgeschiedenen Substrates zwischen den strukturierten Bereichen und den Bereichen auf dem Resist. Das Ablösen des Resists kann dadurch behindert werden, wodurch die Strukturen nicht korrekt produziert werden können oder aber die Strukturen weisen hochstehende Grate auf. Diese beeinträchtigen die nachfolgenden Prozessschritte und führen zu rauen Kanten der Strukturen.

Das Lift-Off-Verfahren besitzt gegenüber anderen Verfahren den Vorteil, dass Ätzprozesse entfallen, wie sie für die subtraktiven Verfahren notwendig sind. Des Weiteren ermöglicht die Methode eine Verwendung verschiedenster Abscheideverfahren, wie z.B. thermisches Verdampfen, Sputterdeposition oder PECVD (Plasma enhanced chemical vapour deposition). Da die im Lehrstuhl für Biophysik favorisierten Strukturen auf Platin als Leiterbahnelement basieren ist dieses Verfahren dafür sehr gut geeignet. Zum einen lässt sich Platin durch Sputterdeposition abscheiden und zum anderen weist Platin eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Ätzprozesse und somit nur sehr geringe Ätzraten auf. Für die Abscheidung der Passivierungsschicht wird ein PECVD Prozess verwendet. An Positionen wie der Kontaktierung oder den Sensoroberflächen, an denen die Strukturen freiliegen sollen, müssen Öffnungen in die Passivierung eingebracht werden. Die Strukturierung des Si_3N_4 erfolgt dann über Ätzen mit reaktiven Ionen (reactive ion etching, RIE).

Die photolithographischen Mikrostrukturierungsverfahren, benötigen eine Maske, welche zur Strukturierung des Photoresistes notwendig ist. Je nach benötigter Auflösungsuntergrenze ist dies eine durch einen Photoplotter generierte Emulsionsmaske oder eine Chrom-Maske. Die Emulsionsmaske wird mit einem Photoplotter gedruckt, welche bei der Firma GeSiM eine Auflösung von 8000 dpi besitzt. Der einzelne abgebildete Pixel besitzt somit eine Größe von $3,175 \mu\text{m}$, was der Endrauigkeit der Zielstruktur entsprechen kann. Aufgrund der Unschärfe des Kantenbereiches der Masken reduziert sich diese Rauigkeit, wobei sich die abgebildete Kante der Struktur verschieben kann (persönliche Information von Thomas Gehring, GeSiM mbH). Chrommasken werden mithilfe eines Elektronenstrahlverfahrens gefertigt, welche das Bild aus einem 200 nm Raster erzeugen. Dies ermöglicht wesentlich höhere Auflösungen, allerdings ist dieses Verfahren zeitaufwändig und teuer.

Für die am Lehrstuhl für Biophysik bisher konzipierten Sensoren beliefen sich die Größen der kleinsten Strukturen auf 10 μm . Dies war die Lochgröße der Öffnung über dem Sauerstoffsensor der V1-Chips. Die meisten Strukturen unterschritten 30 μm Breite nicht. Die Produktion der Strukturen durch kommerzielle Anbieter hat neben den erheblichen Kosten einen zeitlichen Nachteil. Die Fertigung ab Zusendung der finalen Zeichnungsdatei benötigte mindestens 6-8 Wochen.

Die Verwendung der Standardtechnologien der Mikroelektronik begrenzt die Nutzbarkeit für die geplante Anwendung allerdings in der Größe. Die von GeSiM und von anderen verwendeten Träger basieren auf dem in der Mikroelektronik lange Zeit etablierten 4-Zoll Wafern, Scheiben von 101,6 mm Durchmesser. Diese können nur begrenzt strukturiert werden, da die Halterung den äußersten Rand abdeckt. Die verbleibende Fläche ist zudem durch die kreisförmige Geometrie limitiert, was zu Verlusten bei der Herstellung quadratischer Chips führt. Je größer die Chips desto geringer ist die Anzahl pro prozessiertem Wafer und umso höher wird der Preis pro Chip.

3 Material und Methoden

3.1 Software

Software für den Entwurf, die Simulation, die Fertigung der Mikrofluidik, der Platinen und der Chips, sowie zur Auswertung der Daten.

COMSOL MultiPhysics® 3.5a / 4.2a	COMSOL, Bern, Schweiz
Zu Simulation der Strömungsverhältnisse in den Mikrofluidiksystemen	
AutoCAD Mechanical 2010	Autodesk® Inc., San Rafael, USA
Design und Zeichnung der Chips und der Mikrofluidiksysteme	
LabVIEW®, Datenerfassung	National Instruments, Austin, Texas, USA
Ansteuerung des Bionas 2500 Gerätes, des Impedanzmessgerätes und der Multiplexer	
Origin 8.1	OriginLab Corporation ©, Northampton, USA
Datenauswertung und Aufbereitung für Impedanz, pH und Sauerstoffmessungen	
ISOCAM (PRO)	Fa. BUNGARD Elektronik GmbH & Co. KG, Windeck, DE
Bearbeitung und Transfer der CAD Daten in das Gerber Format für die Fräsbearbeitung	
Scilab® 5.5.0	Scilab Enterprises ©, Freeware, Evry, France
Automatisierte Aufbereitung und Auswertung der Impedanzdaten	
Target 3001 V17 discover	Ing.-Büro FRIEDRICH, Eichenzell, DE
Entwicklung, Zeichnung und Transfer der Elektronikplatinen	
Gwyddion	Download von www.gwyddion.net
Bearbeitung, Anzeige der AFM Daten	
signalgen.exe	Download von www.dr-jordan-design.de/signalgen
Software-Signalgenerator zur Ansteuerung der Stimulations-Aktoren	

3.2 Geräte und Fluidikkomponenten

Materialien und Geräte für die Fertigung und Betrieb der Systeme sowie Labor- und Messgeräte zur Untersuchung der Zellkultur und der Sensoren.

Material	Hersteller
AFM JPK Nanowizzard II	JPK Instruments AG, Berlin, DE
Alpha-Step 500	Tencor Instruments, Mountain View, USA
Ardenne LA-320S Sputteranlage	VON ARDENNE GmbH, DE
Auvisio, VI-88, Resonanzlautsprecher	Pearl.GmbH, Buggingen, DE
Bionas 2500 System	Bionas, GmbH, Rostock-Warnemünde, DE
Dehnungsmesssystem, EDX-10A	ZSE, Elektronik GmbH, Bietigheim-Bissingen, DE
Dehnungsmmessstreifen (DMS)	ZSE, Elektronik GmbH, Bietigheim-Bissingen, DE
Flow-thru Reference Electrode (1/16" Fit.)	Microelectrodes Inc. (Bedford, USA)
Flusssensor A030-014	GeSiM GmbH, Grosserkmannsdorf, DE
Fräsbohrplotter CCD/2	Fa. BUNGARD Elektronik GmbH & Co. KG, Windeck, DE
Impedance/Gain-Phase Analyzer 4194A	Fa. Hewlett Packard, USA
Ismatec IPC-N Peristaltikpumpe	Ismatec®, Wertheim-Mondfeld, DE
Luer®/Luer-Lock®-Schlauch-Verbindungssysteme, Spritzen, Kanülen, Klebstoffe	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
LumiStar	BMG Labtech, GmbH, DE
Mettler Toledo 5 Easy	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
MicCell™ - System	Fa. GeSiM, Grosserkmannsdorf, DE
PalmSens	PalmSens BV, Utrecht, The Netherlands
pH Elektrode, InLab micro-pH Elektrode,	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
PharMed® Ismaprene	Ismatec®, Wertheim-Mondfeld, DE
Platinen	Beta LAYOUT GmbH, Im Aartal 14, Aarbergen, DE
PolarStar	BMG Labtech, GmbH, DE
PreSens	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, DE
ScioSpec ISX-3	Sciospec Scientific Instruments GmbH, Bennewitz, DE
Tygon® ST R-3603/R-3607	Ismatec®, Wertheim-Mondfeld, DE
Zentrifuge, Rotofix 32A	Hettig Lab Technology, Tuttlingen, DE

3.3 Verbrauchsmaterialien

Substrate und Materialien für die Zellkultur und die Systemfertigung.

Material	Hersteller
ALP Assay 2, StamTAG Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Fluoromatic)	CellBiolabs Inc. San Diego, USA
Alpha-MEM ohne NaHCO ₃ , P03-2510	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
a-Minimum Essential Medium mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , (a MEM) F0915	Biochrom, Berlin, DE
ATP-Lite Assay,	PerkinElmer Inc., PerkinElmer, Rodgau, DE
Beta-Glycerolphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
DMEM, Pulver, w/o NaHCO ₃ , mit 1000 g/l L-Glucose und Pyruvat	Gibco, Eggenstein, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l D-Glucose, Pyruvat (DMEM+GlutaMax™-J)	Gibco, Eggenstein, DE
Fetales Kälberserum (FBS), PANsera ES	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Haftvermittler GRUN G790, (C7-C10 Isoalkanes)	Wacker Silicones, GRUN G 790, www.wacker.com
HEPES	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Laminin	Biochrom AG, Berlin, DE
L-Glutamin-Lösung: 200 mM in 0,85 % NaCl-Lösung,	Whittaker Bioproducts, Watersville, USA
Objektträger, ISO Norm 8037/1 (Art.Nr. 0656)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS): 0,2 g KCl, 0,2 g K ₂ HPO ₄ , 8,0 g NaCl und 1,15 g Na ₂ HPO ₄ in 100 ml H ₂ O, pH 7,4	Biochrom AG, Berlin, DE
Photovernetzbares Polymer SL7545	SL7545, Huntsmann Advanced Materials GmbH, Bad Säckingen, DE
Polycarbonat	Acrylics shop, Acryl Ltd, DE
Polydimethylsiloxan (PDMS)/Härter Dow Corning Sylgard 184-Kit	Dow Corning Inc., Midland, Michigan, USA
Poly-D-Lysin-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Polymethylmethacrylat (PMMA); Acrylglas	Acrylics shop, Acryl Ltd, DE
PS-Lösung: (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin,)	Biochrom AG, Berlin, DE
Silikon-Kleber	NuSil Technology, Carinteria, USA
Tergazym	Alconox Inc., 30Glenn St., Str. 309, White Plains, NY 10603
TICKOPUR RW77, Reinigungskonzentrat	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, DE

Trypsin-Lösung: Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA), 1:20 in PBS verdünnt	Gibco, Eggenstein, DE
WST-1 Assay,	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Zellkulturflaschen 50 ml	25 cm ² ; Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zelllinien vom DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE

3.4 Sensorchips

3.4.1 Externe photolithographische Fertigung

Die Chips wurden im Lehrstuhl für Biophysik in AutoCAD Mechanical® konzipiert, wobei für jede zu fertigende Maske ein eigener Layer (Arbeitsebene in AutoCAD) angelegt wurde. Die Abmessungen der einzelnen Chips orientierten sich an den Abmessungen für das MicCell®-System der Fa. GeSiM von 22x27 mm, die Wafergröße betrug 4-Zoll, wobei nur in einem Bereich von 45 mm vom Zentrum aus strukturiert werden konnte. Bei der Erstellung der Maskendatei wurde die Anordnung optimiert, um möglichst viele Chips auf der verfügbaren Fläche unterzubringen. Die im Randbereich für die Chips nicht nutzbare Fläche wurde mit verschiedenen Teststrukturen belegt. Die Dateien wurden dann in das DFX-R12 Format konvertiert und an den Fertiger (GeSiM) gesendet, welcher die benötigten Masken fertigte. Für Strukturen kleiner 10 µm wurde eine Chrommaske, für Strukturen über 10 µm eine Photomaske verwendet.

Das Chipsubstrat bestand aufgrund der Anforderung nach Mikroskopierbarkeit aus Borosilikatglas. Die leitenden Strukturen wurden aus 100 nm Platin strukturiert, das auf 10 nm Titan als haftvermittelnder Schicht lag. Platin ist aufgrund seiner Edelmetalleigenschaften auch gegenüber aggressiven Reinigungslösungen sehr stabil und zellphysiologisch unbedenklich. Als Passivierung wurde eine 1200 nm dicke Si₃N₄ Schicht aufgetragen. Dieses Material weist eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit gegen Säuren, Laugen und organische Lösungsmittel auf, wodurch die Chips autoklavierbar und mehrfach verwendbar sind. Gefertigt wurde auf einem 4-Zoll-Borosilikatglaswafer (D263) in folgender Reihenfolge:

1. Titan-Platin Lift-off Struktur auf D263-Wafer mittels Chrommaske
2. 1200 nm PECVD Passivierung des gesamten Wafers mit Si₃N₄
3. RIE-Öffnung der 1200 nm Si₃N₄-Passivierung mittels Chrommaske
4. Vollständige Beschichtung mit dem pH-sensitiven Si₃N₄, von 20-60 nm Si₃N₄
5. Lithografie der Schutzlackstrukturen auf pH-Sensor (Photomaske, Positivmaske)
6. RIE-Ätzung der 20-60 nm Si₃N₄-Schicht
7. Lackentfernung
8. Vereinzeln

Die zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Reinigungs-, Belichtungs-, Entwicklungs- und Stripping-Schritte sind hierbei nicht weiter aufgeführt, da sie seitens des Herstellers nicht näher erläutert wurden.

3.4.2 Bohrung der Sensorchips

Die Bohrungen und Justiernuten wurden von der „Schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt Mecklenburg Vorpommern GmbH“ (SLV) hergestellt. Die Bohrung erfolgte mit einem Infrarotlaser mit maximaler Leistung bei 1064 nm Wellenlänge. Aufgrund der Materialdicke (550 μm) mussten teilweise nach innen versetzte Umläufe abgetragen werden, um den Materialabtransport in größeren Tiefen zu gewährleisten. Dies führte zur Verengung der Bohrungen mit zunehmender Tiefe und einer Erhöhung der Prozessdauer.

3.4.3 Lasergestützte Fertigung

3.4.3.1 Anfertigung von Halterungen für die Beschichtung

Die Sputterhalterungen waren notwendig, da die Sputteranlage im Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik der Universität Rostock ein nicht variables Trägersystem für 4-Zoll Wafer verwendet das von der Unterseite sputtert. Die Chips müssen somit hängend in das System eingebracht werden. Die Halterungen fungieren als Adapter zu den in der Anlage verwendeten Waferhalterungen für 4-Zoll Wafer. Aufgrund der thermischen Belastung wurde auf Leiterplattenmaterial zurückgegriffen. Das Material für die Leiterplatten (PCB) war stabil genug und ließ sich mit dem Fräsbohrplotter einfach in die benötigte Form bringen.

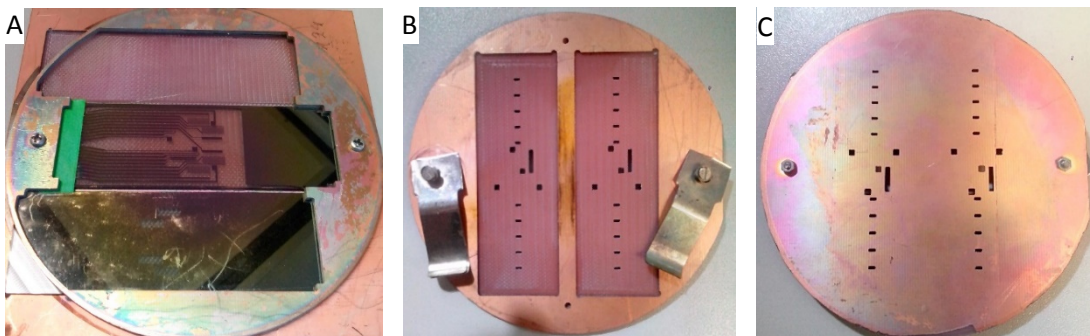


Abbildung 3-1: Aus Leiterplattenmaterial gefräste Halterungen für die Besputterung der pH-Sensoren
 A: Unterseite der Halterung für die flächige Beschichtung mit Platin oder Si_3N_4 für 3 Objektträger; B: Oberseite mit Aussparung zum Einlegen der Objektträger und Halteklammern; C: Unterseite mit partiell noch anhaftendem Si_3N_4 und den Sputteröffnungen (Leiterplattenmaterial 1,2 mm FR4, beidseitig mit 70 μm Kupferschicht).

3.4.3.2 Beschichtung der Objektträger

Die Mikroskopobjektträger wurden mit 70 % Ethanol vorgereinigt um Schmutzpartikel und Fett zu entfernen und in einem Objektträgerhalter aus Glas gestapelt. Unmittelbar vor der Beschichtung wurden die Träger im Reinraum der Elektrotechnik der Universität Rostock mit dem Träger in einer 10%igen wässrigen Lösung von TIKOPUR W77 für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Der Trägerhalter mit den senkrecht liegenden Objektträgern wurde danach zur Reinigung mehrfach in ein Reinstwasserbad eingetaucht. Abschließend wurden die Objektträger einzeln mit frischem Reinstwasser ab gespült und mit gefilterter Druckluft trocken geblasen. Die Objektträger wurden paarweise in die aus FR4 gefertigten Sputteradapter eingespannt und diese in den Waferhalter eingelegt. Der Waferhalter wurde vom Operator in die Sputteranlage (Ardenne LA-320S, VON ARDENNE GmbH, DE)

eingbracht. Die Beschichtung erfolgte per Magnetron unterstütztem DC-Sputtern (Platin, Titan) bzw. per Hochfrequenzsputtern (Si_3N_4) bei einer Leistung von 400 Watt im Hochvakuum mit Argon als Sputtergas. Die Beschichtung mit der 15 nm Titanschicht benötigte 10 s, die folgende Beschichtung mit 130 nm Platin zusätzliche 30 s.

Die Besputterung mit Si_3N_4 erfolgte bei denselben Parametern im HF-Modus, da das Material nicht leitfähig ist. Die Slides wurden in der Anlage für 1 min auf 100 °C vortemperiert und dann bei 400 Watt für 300 s besputtert um die Passivierung von 200 nm Si_3N_4 abzuscheiden. Die maximale Sputterzeit für einen Durchlauf ist seitens der Anlage auf 300 s limitiert. Für Schichtdicken von 400 nm wurden daher eine 180 s Pause und ein weiterer Durchlauf von 300 s angeschlossen, ohne die Träger zwischenzeitlich aus der Anlage zu nehmen.

3.4.3.3 Laserablation

Die direkte Strukturierung mittels Laserabtrag ist ein neueres Verfahren und wurde von der SLV durchgeführt. Die Sensorchipstrukturierung erfolgte durch den Pikosekundenlaser (TRUMP TruMicro 5x50) welcher in das Hochpräzisionsmikromaschinensystem des Typs GL (GFH GmbH) mit einer Genauigkeit von kleiner 1 μm integriert ist. Die in AutoCAD erzeugten Designs wurden als DXF-R12-Datei exportiert und in die Steuersoftware des Lasersystems importiert. Über das Programm des Lasersystems werden die Verfahrswege des Lasers und die zu entfernenden Bereiche definiert. Die Objektträger werden dann einzeln auf dem Arbeitstisch des Lasers fixiert und durch den Laser bearbeitet.

Das ITO-Material mit 100 nm ITO auf einer 15 nm SiO_2 -Kontaktschicht wurde auf die gleiche Weise mit denselben Parametern bearbeitet wie die selbst gefertigten Platinstrukturen.

3.4.3.4 Sputtern der sensitiven pH Schichten

Um die pH-sensitiven Schichten zu sputtern wurde ein Träger geätzt, welcher als Maske fungierte und alle Sensoren, bis auf die für die pH Messungen bestimmten, abdeckte (Abbildung 3-1 B,C). Zusätzlich enthielt die Maske Öffnungen zum Rande des Trägers, welche zur Kontrolle der Sputterrate dienen sollten. Die Maske sollte sicherstellen, dass nur die pH-Sensoren mit einer sensitiven Schicht versehen werden. Um Justierabweichungen zu vermeiden und eine optimale Abdeckung zu gewährleisten, waren die Öffnungen größer als die pH-Sensorpads ausgelegt. Die Sensoren wurden auf diesem Träger in extra ausgefräste Aussparungen gelegt und mit Federdruck fixiert. Entsprechend den experimentell bestimmten Parametern der Anlage wurden die 60 nm Schichten, nach der Temperierung auf 100 °C, bei 300 Watt für 90 s im Hochfrequenzmodus (HF) gesputtert.

3.5 Mikrofluidik

3.5.1 Herstellung der Gussformen für das MicCell®-System

In AutoCAD wurde zuerst in 2D das Fluidikdesign entworfen und in ein Polylinienobjekt überführt. Das für die Herstellung eines Abformwerkzeuges notwendige 3D-Modell wurde dann durch Extrusion der 2D-Struktur erzeugt. Das entstandene 3D-Objekt konnte als STL-Datei abgespeichert und an das Institut für Polymertechnologien e.V. (IPT) verschickt werden. Das IPT generierte daraus das Negativ und fertigte dieses dann mithilfe hochauflösender Stereolithographie aus einem photovernetzbaarem Polymer (SL7545).

3.5.2 Herstellung der Gussformen für die SLV-Systeme

Für die Fertigung der Stimulationssysteme wurden die Gussformen mit dem Isolationsfräser, durch Ausfräsen aus dem Basismaterial erzeugt. Die Genauigkeit ($\pm 6,35 \mu\text{m}$) war ausreichend, da die Strukturen einfacher konzipiert waren und die Oberseite der Fluidik durch die unbearbeitete Oberseite des Materials erzeugt wurde. Die Rauigkeit durch die Fräsbearbeitung blieb auf die Randbereiche beschränkt und konnte durch Polieren mit einer geeigneten PMMA-Polierpaste noch weiter reduziert werden. Durch die Größe konnte das Formwerkzeug für das Gehäuse in Teflon gefräst werden, wodurch sich die Oberfläche und das Handling weiter verbessern ließen.

3.5.3 Gießen der Fluidik mit PDMS

Das PDMS wurde im Verhältnis 10:1 mit der Vernetzungsreagenz (Härter) bei Zimmertemperatur vermischt und in einer Vakuumglocke entgast. Die entgaste Lösung wurde dann mit einer Spritze über eine entsprechende Bohrung in die PMMA bzw. PC-Gehäuse, welche durch die Formwerkzeuge abgeschlossen waren, injiziert. Die Kanäle in den Gehäusen sowie die Verbindung zur Mikrofluidik wurden durch eingesteckte, zurechtgeschnittene Kanülen vom PDMS freigehalten. Das PDMS wurde dann bei 70 °C für 4 h auspolymerisiert. Nach Beendigung der Polymerisationszeit wurden die Formen vorsichtig von der Fluidik gelöst und die Kanülen herausgezogen.

3.6 Fertigung der Zellsystems mit Fräsbohrplotter CCD/2

Die Systeme wurden mit AutoCAD Mechanical in 2D, in einer einzelnen Datei entworfen. Für die Fertigung mussten die einzelnen Bestandteile des Designs in einzelne DFX Dateien kopiert und dies via COREL-Draw in das HPLG-Format konvertiert werden. Dies war notwendig um sie in ISOCAM 5.0 öffnen zu können. In ISOCAM wurden die Fräswerkzeuge ausgewählt und die Bearbeitungswege des Werkzeuges bzw. die zu entfernenden Flächen bestimmt. Die entstanden Fräsdaten wurden abgespeichert und in die Steuerungssoftware ROUTERPRO 2008 des Fräsbohrplotters CCD/2 geladen. Durch Zuweisung bestimmter Frästiefen zu den vordefinierten Werkzeugen konnten mit dem System einfache 3D-Strukturen gefertigt werden. Als Grundmaterial dienten Platten verschiedenster Dicken aus Acrylglas (PMMA) oder Polycarbonat (PC). Das Einfügen von horizontalen Bohrungen bzw. das Einarbeiten von Gewinden erfolgte nachträglich manuell.

3.7 Anschluss und Verbindungstechnik

3.7.1 Elektrische Anbindung

Die elektrische Verbindung wurden von Dipl.-Ing. Thomas Kröger und Dr. Carsten Tautorat als fest verlötete flexible Leiterplatten auf Kaptonbasis realisiert. Die von Ihnen entworfenen Platinen wurden direkt mit den Chips verlötet und die Lötstelle dann mit einem Kunstharz gegen Feuchtigkeit versiegelt. Die Verlötung erfolgte durch die Firma EPSa (EPSa Elektronik & Präzisionsbau Saalfeld GmbH, Deutschland) und konnte (im Zuge von Reparaturen) auch selbst durchgeführt werden. Die Platinen endeten auf einen Steckverbinder mit 26 Kontakten, welcher auf dafür entworfene Steckplatinen bzw. auf die Multiplexerplatinen aufgesteckt wurden. Da bei Weiterentwicklung des Systems aufgrund des Konkurses der Firma Bionas GmbH und der Limitierungen des Systems (BlackBox, d.h. keine Kenntnis der internen Berechnungen oder Verschaltungen) auf andere Elektronik gewechselt werden musste, konnten diese nicht mehr weiter genutzt werden. Für die Verbindung zum Sciospec MUX musste eine gesonderte Platine gefertigt werden. Diese habe ich unter Verwendung von Target 3001 V17-discover entworfen und von PCB Pool (Beta LAYOUT GmbH, Im Aartal 14, Aarbergen, DE) fertigen lassen. Die Platinen ermöglichen die Verbindung zwischen dem Sciospec MUX (Impedanzmessungen) und den Chips (via Flexplatine) und gleichzeitig einen möglichst variablen Anschluss des PalmSens-MUX (Messung von pH-Wert und Sauerstoff).

3.7.2 Optische Anbindung

Die Sauerstoff- und pH-Sensorspots wurden mit 2,2 mm durchmessenden und 2 m langen Optoden (Lichtleiter) ausgelesen. Diese wurden seitlich in den Brutschrank eingeführt und von unten an die Systeme angesetzt. Außer durch die Steifheit der Lichtleiter und dem damit verbundenen Platzbedarfes stellten sie keine weiteren Anforderungen an die Umgebung, da sie gegen elektronische Störungen und Feuchtigkeit resistent waren. Die Fixierung und Ausrichtung der Optoden erfolgte über kreisförmige Polycarbonat-Halter, in welche die Optoden eingesteckt wurden. Die Halter wurden in Aussparungen der Halteplatte unterhalb der Systeme eingesetzt.

3.7.3 Fluidische Anbindung

Für die fluidische Anbindung der Systeme wurden die gängigen Methoden über Spritzenkanülen, Luer® oder Pressverbindern für Teflonschläuchen auf 1/4"-28 Schraubanschlüsse getestet. Für die Stimulationssysteme wurden letztendlich zurechtgeschnittene Kanülen als Anschlusselement verwendet, wodurch Luer- und Luer-Lock-Verbindungen verwendbar waren. Da diese Verbindungen einen großen Leerraum aufweisen, wodurch die Anschlüsse sehr blasenanfällig waren, wurde der Leerraum mit PDMS ausgegossen (Abbildung 3-2). Die Schläuche wurden dafür in die männlichen Gegenstücke integriert. Sie wurde durch das Anschlusselement gesteckt, der weibliche Teil (Abbildung 3-2 A) aufgesetzt und durch diesen eine lange dünne Kanüle bis in den Schlauch eingesteckt, um diesen zu verschließen. Der Leerraum wurde dann mit PDMS ausgegossen und dieses ausgehärtet. Danach war der Schlauch fest und dicht mit dem männlichen Luer-Stutzen verbunden und verfügte über eine PDMS Spitze die den Leerraum ausfüllt (Abbildung 3-2 B, C).

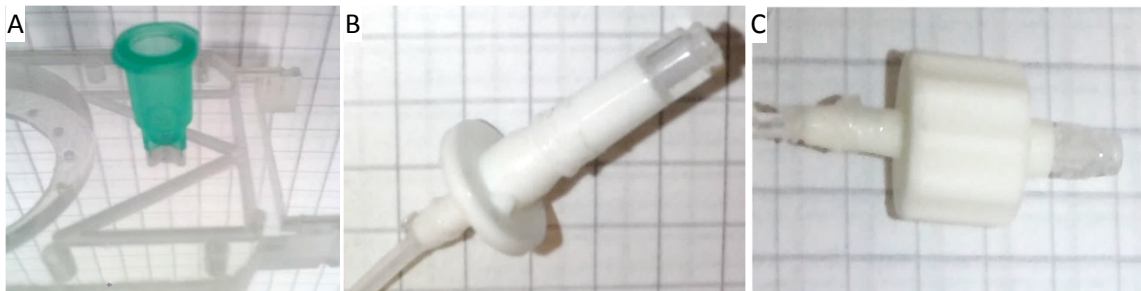


Abbildung 3-2: Anschlusskonzepte für das SLV-System.

A: Grüner „Weiblicher“ Anschlussstutzen von gekürzter Kanüle im Systemtorso; B,C: Verschiedene „männliche“ Luer-Anschlusselemente mit Teflonschlauch und gegossener PDMS Spitze, C: Luer-Lock-Variante

3.7.3.1 Anschlussvarianten 2D-GeSiM-Systeme

Die von GeSiM verwendeten 1/4"-28 Schraubanschlüsse wurden durch Kanülen ersetzt die in den geringfügig kleineren Bohrlöchern fixiert wurden. Die flexiblen Silikonschläuche und auch die steiferen Teflonschläuche konnten danach auf die Enden der abgeschnittenen Kanülen aufgeschoben werden. Weitere gut handhabbare Varianten nutzten die Diaphragmen aus Injektions-Caps die in die Systeme integriert wurden und in die nach Bedarf eine Kanüle eingestochen werden konnte.

3.7.3.2 Anschlussintegration der SLV-Systeme

Die Systeme wurden von Beginn an, trotz der Blasenanfälligkeit, für die Verwendung des Luer®-Systems ausgelegt, da es der Standard für Fluidikanbindungen im medizinischen und biologischen Bereich ist. Für die Anbindung wurden kreuzförmige Aussparungen in die Systemträger gefräst, welche die Aufnahme des Anschlussteils einer Spritzen-Kanüle ermöglichen. Die Kanülen wurden auf das benötigte Format gekürzt und die Anschlussteile in die Aussparungen gedrückt (Abbildung 3-2 A). Die Anschlüsse und der Systemträger wurden dann mit 2-Komponentenkleber verklebt.

3.7.3.3 Stimulation

Die Stimulation erfolgte mit Resonanzlautsprechern (Auvisio, VI-88), welche über einen Abstandshalter direkt auf den Deckel des Systems wirkten. Die Deckeloberseite war so ausgestaltet, dass der Lautsprecher auf den Außenrand aufgesetzt und durch diesen fixiert wurden. Die Lautsprecher wurden per USB-Anschluss mit Strom versorgt und über den Audio-Ausgang eines Laptops angesteuert. Der Software-Signalgenerator (signalgen.exe) generierte für die Stimulation ein Rechtecksignal mit Frequenzen von 0,1 Hz bis 50 Hz. Das Vierecksignal wurde verwendet, weil es einer stoßartigen Belastung, wie sie beispielsweise beim Gehen auftritt am ähnlichsten sein sollte und weil die Auslenkung des Aktors in diesem Modus am stärksten war. Für die Bestimmung der Auslenkung der Membran und der damit verbundenen Stimulationstärke in μstrain ($\mu\text{m}/\text{m}$) wurden $8 \times 1,4 \text{ mm}^2$ große Dehnungsmesstreifen (KFG-4N-120-C1-11-L3M3R) in einzelne Deckel mit eingegossen und die Dehnung mit dem Strain-Messsystem EDX-10A bei einer „sampling rate“ von 50 Hz (für Stimulationen bis 10 Hz) in mit Medium gefüllten Systemen aufgezeichnet.

3.7.3.4 Messung des Stimulationseinflusses und der Pumpgeschwindigkeit

Für die Messung der Pumpgeschwindigkeit bzw. des durch die Stimulation hervorgerufenen Strömungspulses wurde der Flusssensor A030-014 verwendet. Für die Messung des Stimulationseinflusses wurde die Fluidik an einer Seite verschlossen und der Sensor über einen Teflonschlauch an den anderen Fluidikport angeschlossen. Für die Strömungsmessung wurde je ein Sensor im Zulauf bzw. im Nachlauf der Peristaltikpumpe verwendet und bei verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten gemessen.

3.8 Sensorcharakterisierung

3.8.1 Sauerstoffsensoren

Zur Bestimmung der Eigenschaften der Sauerstoffsensoren wurden verschiedene Testmessungen durchgeführt. Zur Bestimmung des Einfluss der Medienzusammensetzung auf das Messsignal bzw. auf die Funktion beeinflussende Faktoren wurden Zyklovoltammogramme mit den Sensoren durchgeführt. Der „Cyclic Voltammetry“-Messmodus des PalmSens wurde verwendet und Zyklen im Bereich von -900 mV bis +400 mV mit einer Auflösung von 0,01 V, einen Startpotential von 0 V und variablen Vorschubgeschwindigkeiten durchgeführt. Die Einschränkung des Messbereiches auf diese Parameter erfolgte aufgrund der Literaturrecherche und praktischer Überlegungen [155,169,175,242]. Der positive Bereich wurde auf +400 mV limitiert, da ab hier ein Peak bei Zugabe des Natriumsulfits (Na_2SO_3) entsteht. Höhere Potentiale wären gegebenenfalls zur Bestimmung einer potentiellen Gegenreaktion sinnvoll gewesen. Aufgrund der Zielstellung und dem störenden Einfluss des Natriumsulfits bei der Messung der sauerstofffreien Lösung wurde es nicht durchgeführt. Die beginnende Wasserstoffbildung und die damit verbundene Ausbildung eines Strompeaks begrenzte das Messfenster nach unten. Besonders wichtig bei den Messungen war der Bereich von -400 mV bis ca. -700 mV vs. Ag/AgCl-Elektrode, da hier die Sauerstoffreduktion stattfindet.

Zur Bestimmung der Stromantwort unter Messbedingungen wurden amperometrische Messungen bei festen Potentialen durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Messmodus „Amperometric Detection“ mit Auflösungen von 0,1 nA, bei Elektrodenpotentialen von -700 mV bzw. -650 mV vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die Messungen liefen zwischen 60 s und 300 s und wurden mindestens fünfmal wiederholt. Damit wurden die zeitabhängige Reaktion des Sensors, sowie die Dauer bis Erreichen eines stabilen Stromes, unter Bedingungen wie sie bei Dauermessung vorkommen, bestimmt.

3.8.2 pH-Sensoren

Die Messungen wurden standardmäßig bei Raumtemperatur durchgeführt, da die Sensitivität mit steigender Temperatur zunehmen sollte und Störquellen durch Nutzung eines faradayschen Käfigs reduziert werden sollten. Die pH-Sensoren wurden charakterisiert indem ihr Potential in pH-Standardpufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten gemessen wurde. Die Chips und die Referenzelektrode wurden dafür zwischen Lösungen mit verschiedenen pH-Werten gewechselt. Zwischen den Wechseln wurden die Chips sowie die Referenzelektrode mit Aqua dest. gespült, um den Übertrag von Lösung anderer pH-Werte zu verhindern. Die Chips wurden dann mit dem PalmSens Gerät im Messmodus „Open Circuit Potentiometry“ für bis zu 600 s gemessen. Für die Bestimmung der Sensitivität wurden die Potentiale bei 120 s verwendet, um einen Sicherheitsspielraum zum t_{90} -Wert (Zeit bis Erreichen von 90 % des Endwertes) von ca. 60 s zu erhalten.

Diese Messungen wurden für alle pH-Sensordesigns durchgeführt. Bei Durchführungen mit einer großen Anzahl an Sensoren, wurde die Anzahl an Stufen von pH 4 bis pH 10 in einzelnen pH Schritten, auf die Stufen pH 9, pH 7 und pH 5 reduziert. Damit konnten die Sensitivität der Sensoren bestimmt, sowie ein potentielles Driftverhalten erkannt werden.

3.8.2.1 Hystereseverhalten

Weiterhin wurden Wiederholungsmessungen ohne Puffertausch und Spülung in einem Bereich von pH 6 und pH 8 durchgeführt, wobei die Lösung (PBS) durch wechselnde Zugabe von HCl bzw. NaOH möglichst genau auf den Ziel-pH eingestellt wurde. Damit konnten die Wiederholgenauigkeit, die Einstellzeit sowie die Sensitivität unter Durchflussbedingungen wie sie auch in der Mikrofluidik auftritt, bestimmt werden.

3.8.2.2 Beschichtungseinfluss

Der Chip der 2. Generation (V2-Chip) mit 60 nm Sensoren wurde für jeweils 5 min in der Standardpufferlösung in einem Becherglas kontinuierlich gemessen. Danach wurde er aus der Lösung genommen und nach Abtropfen der verbliebenden Lösung der Chip in die nächste zu verwendenden Pufferlösung getaucht. Ein Abspülen oder Abtupfen war aufgrund der Beschichtung nicht möglich. Das Wechseln des Chips erfolgte zuerst von pH 9 nach pH 5 und nach einer 10 minütigen Pause in umgekehrter Richtung. Nachdem der Sensor ohne Beschichtung gemessen wurde, wurde er mit PDL beschichtet und mit dem gleichen Messprotokoll vermessen. Die Beschichtung erfolgte entsprechend dem Protokoll der Zellkultur über 4 h.

3.8.3 IDES

Die IDES wurden direkt mit Zellen charakterisiert. Für die Messungen mit den GeSiM Chips wurden die Chips der 1. Generation (V1-Chips) mit einem Trog versehen, um einen Kulturbereich zu schaffen. Das Zellwachstum wurde für 11 Tage täglich gemessen, um den Zellstatus und die Verteilung auf den verschiedenen IDES zu überwachen. Das Wachstum der MC3T3-E1-Zellen wurde mit dem Impedanzmessgerät (HP4194A, Agilent GmbH, Böblingen, Germany) als Paar aus Real- und Imaginärteil bei 25 mV über einen Messbereich von 100 Hz bis 1 MHz gemessen. Ein einfaches RC-Modell, bestehend aus einer Parallelschaltung aus Widerstand (R) und Kapazität (C), wurde verwendet um die frequenzabhängigen Widerstände (R(f)) bzw. die Kapazitätswerte (C(f)) ausrechnen zu können. Entsprechend den Vorarbeiten von Koester *et al.* [204] wurden nur die Kapazitätswerte verwendet (C(f)).

$$C = \frac{1}{\omega} \frac{Z_X}{Z_R^2 + Z_X^2} \quad (3.1)$$

Kapazität (C) als Funktion von Realteil (Z_R) und Imaginärteil (Z_X).

Ein (C(f))-Referenzspektrum wurde nach der Beschichtung der Chips mit PDL (C_{PDL}) gemessen und für die Standardisierung der frequenzabhängigen Spektren (C(f)) während der Wachstumsphase verwendet (C_{cell}). Die Werte wurden hierfür voneinander abgezogen, um so die relative Änderung durch Zellbewuchs zu erhalten ($-\Delta C = C_{cell} - C_{PDL}$). Die Maximalwerte ($-\Delta C$) der standardisierten Spektren (C_{PK}) wurden dann gegen die Zeit aufgetragen um die Zellproliferation zu beschreiben. Das zeitabhängige Verhalten der C_{PK} wurde mit einer modifizierten Verhulst-Pearl Gleichung gefittet (3.2).

$$C_{PK}(t) = \frac{C_{PK}^{min}}{\frac{C_{PK}^{min}}{C_{PK}^{max}} + \left(1 - \frac{C_{PK}^{min}}{C_{PK}^{max}}\right) e^{\left(\frac{-\ln(2)}{T}\right)t}} \quad (3.2)$$

C_{PK}^{min} , C_{PK}^{max} , T , und t stehen für den kleinsten und den höchsten C_{PK} Wert, die Zellteilungsrate und die Kulturzeit in Tagen.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Zelllinien

3.9.1.1 MG63 Zelllinie

Bei MG63 handelt es sich um eine Osteosarcomazelllinie. Sie stammt von einem 14-jährigen Osteosarcom-Patienten und wurde 1977 von Billiau *et al.* etabliert [243]. Da Knochenkrebszellen natürlich immortalisiert sind, wurden Sie als Modellsystem für Knochenzellmodelle verwendet. Sie sind fähig Osteocalcin (OC) und ALP zu produzieren [75], was als Indikator für osteogene Differenzierung gilt [244,245]. Sie sind aber nicht kontaktinhibiert und zeigen bei Mechanotransduktion keine Kalziumantwort [246]. Die Kultur wurde vom DSMZ in Braunschweig (Deutschland) bezogen

3.9.1.2 MC3T3-E1-Zelllinie

Diese Zelllinie wurde aus der Calvaria (Schädelkalotte) einer neugeborenen Maus extrahiert. Sie wurde 1983 aufgrund ihrer hohen ALP-Aktivität und ihrer Fähigkeit in Osteoblasten zu differenzieren von der Arbeitsgruppe Sudo *et al.* 1983 als Zelllinie etabliert [247]. Die von uns verwendete Kultur wurde vom DSMZ in Braunschweig bezogen.

3.9.2 Kulturmedien

Für die Experimente wurde eine Anzahl verschiedener Medienzusammensetzungen verwendet, die entsprechend dem jeweiligen Zelltyp bzw. dem experimentellen Aufbau ausgewählt wurden. Standardmäßig wurden die im Folgenden angegebenen Zusammensetzungen verwendet, Abweichungen werden extra benannt. Prozentuale Angaben beziehen sich immer auf das Volumenprozent (v/v). Sofern nicht explizit angegeben, sind für die Zellkultur unter Standardbedingungen, welche in Multiwellplatten, Kulturflaschen oder Petrischalen im begasten Brutschrank (gesättigte Wasserdampf-atmosphäre, 37 °C, 5 % CO₂) durchgeführt wurden, carbonatpufferhaltige Medien verwendet worden. Diese Medien werden im Folgenden als Kulturmedien bezeichnet. Für die Experimente in den Kultursystemen werden, sofern nicht anders angegeben, die carbonatfreien Varianten verwendet und zur Abgrenzung als Versuchsmedien bezeichnet. Im Falle der carbonatfreien Medien wurde, sofern ein Puffer notwendig war, HEPES als Puffersystem zugegeben.

3.9.2.1 Kryomedium

Für das Einfrieren der Zellen wurden die Zellen in einem speziellen Kryomedium eingefroren. Das Medium bestand zu 70 % aus dem für den Zelltyp benötigten Kulturmedium mit Zusätzen von 20 % fötalem Kälberserum (FBS), 10 % DMSO und von 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % PS-Lösung.

3.9.2.2 DMEM

Als Kulturmedium zur Verwendung mit MG63 wurde das carbonatpufferhaltige Grundmedium DMEM-Glutamax mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % der Pentamycin-Streptomycin-Lösung versetzt.

3.9.2.3 DMEM-CF

Als Versuchsmedium zur Verwendung mit MG63 wurde das carbonatfreie DMEM Pulvermedium (DMEM, Pulver, w/o NaHCO₃, mit 1000 g/l L-Glucose und Pyruvat) in Aqua dest. mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % der Pentamycin-Streptomycin-Lösung versetzt. Um den Medium pH-Wert zu stabilisieren, wurde 2 mM HEPES zugegeben und mit 0,1 M HCl/NaOH Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 bzw. auf alternative pH-Werte eingestellt. Bei Verwendung von höheren HEPES-Konzentrationen (standardmäßig 20 mM) wurde die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl bzw. 1M NaOH Lösung durchgeführt. Danach wurde das Medium steril filtriert.

3.9.2.4 AMEM

Als Kulturmedium zur Verwendung mit MC3T3-E1 wurde das carbonatpufferhaltige Grundmedium α -Minimum-Essential-Medium mit 2,0 g/l NaHCO_3 zusätzlich mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % der Pentamycin-Streptomycin-Stocklösung versetzt.

3.9.2.5 AMEM-CF

Als Versuchsmedium zur Verwendung mit MC3T3-E1 wurde das carbonatfreie α -Minimum-Essential-Pulvermedium in Analysenwasser mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % der Pentamycin-Streptomycin-Lösung versetzt. Um den Medium pH-Wert zu stabilisieren wurde 2 mM HEPES zugegeben und mit 0,1 M HCl/NaOH Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 bzw. auf alternative pH-Werte eingestellt. Bei Verwendung von höheren HEPES Konzentrationen (standardmäßig 20 mM) wurde die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl bzw. 1M NaOH Lösung durchgeführt. Danach wurde das Medium steril filtriert.

3.9.3 Etablierung der Zellkultur im Brutschrank

Die beiden verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, DE) tiefgefroren bezogen. Entsprechend den Vorgaben des DSMZ wurden die Zellen ankultiviert und nach ausreichender Vermehrung über mehrere Passagen wurde ein Grundstock in Kryomedium eingefroren. Für die Vorbereitung von Experimenten wurden eine Fraktion der Zellen entnommen, über fünf Minuten bis auf Raumtemperatur aufgetaut, in Kulturmedium (MG-63 Zellen: DMEM, MC3T3-E1 Zellen: AMEM) verdünnt und bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5 % CO_2 Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen wöchentlich im Verhältnis von 1/10 passagiert. Dazu wurden das Medium dekantiert, die Zellen mit temperierten PBS gewaschen und mit einer Trypsin-Lösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Kulturmedium wurden die Zellverbände durch mehrfaches Pipettieren bzw. Schütteln der Flasche gelöst. Das gelöste Zellpellet wurde in einen 15 ml Falcontube überführt und bei 800 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch die gleiche Menge frischen Kulturmediums ersetzt und mittels einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen nach Bedarf in Multiwellplatten, Kulturflaschen oder Petrischalen ausgesät und wie zuvor kultiviert. Oder es wurde eine definierte Anzahl von Zellen in die 2D- oder 3D-Bioreaktoren injiziert und entweder in einem Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5 % CO_2 -Atmosphäre, oder in einem Wärmeschrank bei 37 °C ohne CO_2 -Begasung kultiviert.

3.9.4 Zellkulturassays

3.9.4.1 Bestimmung der ATP Konzentration

Der ATPlite™ Assay dient dem Nachweis von Adenosine-Triphosphat (ATP) unter Verwendung einer Libellen-Luciferase (*Photinus pyralis*). Es handelt sich um einen Lumineszenzassay mit dem die Proliferation bzw. die Zellaktivität von Zellkulturen überwacht werden kann. Da das ATP nur in den Zellen vorkommt ist es ein destruktiver Assay bei dem die Zellen lysiert werden müssen.

Bei Kultivierung der Zellen in 96-Wellplatten wurde zuerst das Medium abgesaugt, dann 100 µl frisches Medium und 50 µl Lysispuffer zugegeben und die Platte dann 5 min bei 500-700 rpm geschüttelt. Parallel dazu wurden auf der Testplatte (weiße undurchsichtige 96 Well-Platte) mehrere Wells mit 90 µl Medium + 50 µl Lysispuffer befüllt. Die Hälfte der Wells (2 Reihen mit je 8 Wells) dient zur Bestimmung der Leer-Werte, mit der anderen Hälfte wurde der Standard erstellt, indem aus einer Konzentrationsreihe der ATP-Standardlösung den Wells je 10 µl zusammen mit 10 µl Reinstwasser zugegeben wurde. Pro Well wurden je 150 µl lysierte Zellen auf die Testplatte übertragen. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Substratpuffer in jedes befüllte Well der Platte das Vermischen durch 5 min Schütteln bei 500-700 rpm. Die Testplatte wurde in den Reader (LumiStar) überführt und nach einer Wartezeit von 10 min die Lumineszenz gemessen (siehe Anhang A 10).

3.9.4.2 Bestimmung der Zellvitalität via WST-1 Assay

Der WST-1-Assay arbeitet auf der Basis der Umsetzung eines Tetrazolium-Salzes durch die Zellen. Hierbei wird das 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat (WST-1) durch die NADH-Dehydrogenase zu Formazan reduziert. Die daraus resultierende Farbänderung lässt sich durch eine photometrische Messung bei etwa 450 nm, dem Absorptionsmaxima des Formazans bestimmen. Da die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen direkt mit der metabolischen Aktivität lebender Zellen korreliert, ermöglicht dies einen Rückschluss auf die Zellvitalität bzw. die Zellmenge.

Für die Messung wird das Medium aus den Wells der 24-Well Platte abgenommen und durch 500 µl frisches Medium und 5 µl WST-1 Reagenz (1:100) ersetzt. Die Platte wurde dann 1 h bei 37 °C inkubiert. Jedes Well der 24-Well Platte wurde auf 4 Wells mit je 100 µl, auf die 96-iger Messplatte (transparent, flacher Boden) aufgeteilt. Als Blanks wurden je 8 Wells mit 100 µl zellfreiem Medium und je 1 µl WST-1 Reagenz verwendet. Die Messung erfolgte danach bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Polarstar-Photometer.

3.9.5 Beschichtung von Oberflächen

Sofern notwendig wurden die Chips bzw. Zellkulturträger mit Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. Bei Beschichtung von Oberflächen wurde PDL zugegeben bis die Oberfläche vollständig bedeckt war. Bei Beschichtung der Zellkultursysteme wurden diese vollständig mit PDL (100 µg/ml) gefüllt. Die PDL Lösung wurde 4 h bei 37 °C inkubiert, wobei sie nicht

eintrocknen durfte. Danach wurde die Oberfläche bzw. die Fluidik mit PBS gewaschen. Bei einigen Experimenten wurde die PDL-Beschichtung um die Beschichtung mit Laminin erweitert. In diesem Fall wurde nach der PBS-Spülung Laminin in PBS (25 µg/ml) zugegeben und mindestens 4 h inkubiert. Nach der Spülung mit PBS wurde das PBS durch das jeweilige Kulturmedium ausgetauscht.

3.9.6 Variation der Kulturoberfläche

Die Zellen wurden auf verschiedenen Oberflächen ausgesät, um den Einfluss der Oberfläche auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu überprüfen. Hierzu wurde ein spezielles Wellformat verwendet bei dem die Mikroskopobjektträger von den Wells getrennt werden konnten. Die Objektträger wurden durch Sputtern mit verschiedenen Oberflächen versehen und mit Nusil-Silikon-Kleber der Kulturbereich wieder aufgeklebt. Für die PC-Oberflächen wurde eine zurechtgeschnittene 2 mm PC-Platte verwendet. Für PDMS und Gelatine wurden je 100 µl der Substanzen in die Wells gegeben. Die Zellen wurden dann in carbonathaltigen Medien mit 20.000 Zellen/ml ausgesät, kultiviert und mit ATP-Lite oder WST Assay vermessen.

3.9.7 Zellkultur in den Systemen

Die Zellen wurden entsprechend Absatz 3.9.3 (Etablierung der Zellkultur im Brutschrank) behandelt. Die ausgezählten und auf definierte Zellzahlen eingestellten Zelllösungen wurden mit einer 1 ml Spritze aufgezogen und langsam durch die Systeme gespült. Das Durchspülen sollte eine möglichst homogene Verteilung der Zellen gewährleisten. Die Zellzahlen variierten im Verlauf der Arbeit je nach Fluidiksystem (siehe dazu Abschnitt 4.3.1 Fluidikvarianten) und Zielsetzung der Experimente. Eine allgemeine Übersicht ist in Tabelle 1 aufgeführt.

SYSTEM	GESIM-SYSTEM A2 / 4A-S	TROG	GESIM-SYSTEM 4A-OB	STIMULATIONS- SYSTEM
VOLUMEN DES SYSTEMS	35 µl / 100µl	Offen (2 ml)	100 µl	~80 µl (Kulturbereich)
KULTURFLÄCHE	70 mm ² / 124 mm ² -	160 mm ²	168 mm ²	~320 mm ²
KONZENTRATION	50.000 Z/ml	25.000 Z/ml	1,5 Mio. Z/ml	1,5 Mio. Z/ml ~50 % konfluent
FLÄCHENBELEGUNG	25 Z/mm ²	155 Z/mm ²	890 mm ²	477 Z/mm ²

Tabelle 1 Volumen und standardmäßig verwendete Zellzahlen für die Kultursysteme.

Volumen und Flächenbelegung bei Aussaat, berechnet basierend auf den CAD Dateien ohne Anschlussbereiche. Im Trog wurden nur Impedanzmessungen für die 22x27 mm Chips durchgeführt, in der 4A-OB Kammer die pH- und O₂-Experimente.

Als GeSiM-System wird hierbei die Variante bezeichnet, die für die Anwendung mit den 22 x 27 mm Chips verwendet wurde, während als Stimulationssystem die auf den Objektträgern basierenden Systeme bezeichnet wurden. Nach Injektion der Zellen wurden die Systeme 4 h in den Brutschrank gestellt, um die Zellen adhären zu lassen. Danach wurden überschüssige, nicht adhären Zellen mit Medium ausgespült und entsprechend

der jeweiligen Versuchsplanung vorgegangen [248]. Die Pumpgeschwindigkeiten und die Dauer der Zyklen waren abhängig von den jeweiligen Messungen und wurden den Beobachtungen (Änderungen der Messwerte, Stabilität der Zellen, Störungsanfälligkeit) angepasst. Bevorzugt wurden für pH-Messungen 2 h-Zyklen, für Sauerstoffmessungen 5 h-Zyklen und für optische Messungen 6 h-Zyklen.

3.9.8 Ansäuerungsmessungen

Für die pH-Experimente in der „konventionellen“ Zellkultur wurden die Carbonatmedien durch HEPES-gepufferte-Medien ersetzt (AMEM-CF, DMEM-CF), welche auf den jeweils gewünschten pH-Wert mit HCl-Lösung bzw. NaOH-Lösung eingestellt wurden. Die Zellen wurden dann über mehrere Tage bis zu mehreren Wochen kultiviert und ihre Proliferation mit dem WST-Assay bzw. dem ALP-Assay bestimmt. Je nach geplanter Dauer des Versuches wurde entweder täglich eine Messung im Zuge des täglichen Mediumwechsels durchgeführt oder im Zweitagesrythmus. Die Verwendung von zwei verschiedenen Assays diente der Absicherung der Ergebnisse gegen pH-Abhängigkeiten der Assays.

Ziel der Versuche war es zu überprüfen, ob die Zellen auch bei höheren pH-Werten noch vergleichbare Proliferationsraten zeigen wie bei den Standardbedingungen. Bei vergleichbaren Raten wäre die Kultur bei höheren pH-Werten möglich, wodurch sich für die Experimente in den Kultursystemen Vorteile ergeben. Die Ansäuerung des Mediums durch längere Kulturzeiten oder aufgrund erhöhter Zellzahlen könnte so kompensiert werden, ohne Proliferationseinbußen hinnehmen zu müssen oder es könnten höhere pH-Shifts toleriert werden. Weiterhin zeigt die Literatur (siehe 2.1.7), dass ein höherer pH-Wert einen positiven Einfluss auf den Knochenaufbau bzw. die Kalzifikation haben kann.

Da auch die Zugabe von Kalzium bzw. β -Glycerophosphat zur Stimulation der Kalzifikation bei Osteoblasten beitragen soll [37,79,249], wurden ebenfalls Versuche mit Kalzium und β -Glycerophosphat angereichertem Medium durchgeführt. Bei den Versuchen wurden AMEM-CF mit pH 7,4 und pH 7,8 mit jeweils 8 mM Kalzium bzw. 10 mM β -Glycerophosphat zugefügt [79]. Die Zellen wurden dann 2 Wochen in den Medien kultiviert und mit dem WST-Assay ihre Proliferation bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Chip-Design

Die erste Variante des Glaschips sowie die Grundform der Fluidik, welche von Dipl.-Phys. Marko Kaeselitz und Dr. Marco Stubbe am Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock entworfen wurden, werden hier aufgeführt, da diese Designs die Vorgaben für die V2-Chips und die nachfolgenden Fluidikvarianten darstellten (siehe Anhang A2). Dies soll zudem die Entwicklungsrichtung und die zugrundeliegenden Vorgaben verdeutlichen.

Die auf dem Wafer für die 2D-Chips befindlichen radialsymmetrischen Chips (V2R), wurden im Zuge der Vorarbeiten für das Drittmittelprojekt „Fluxel-3D-Zellkulturkörper“ entworfen. Sie verfügen über Sauerstoffsensoren sowie pH-Sensoren mit der gleichen Fläche wie die Chips der 2D-Version (V2). Da sie sich aus Kostengründen auf den Wafern für die 2D-Chips befinden, wurden sie der Vollständigkeit halber aufgeführt. Sie werden aber nicht einzeln behandelt, da die Charakteristik der Sensoren, mit Ausnahme der IDES, aufgrund der nahezu gleichen Größen als identisch betrachtet werden kann. Informationen zum 3D-System sind dem Anhang, Abschnitt A3 zu entnehmen.

4.1.1 Design 2D-Version (V1)

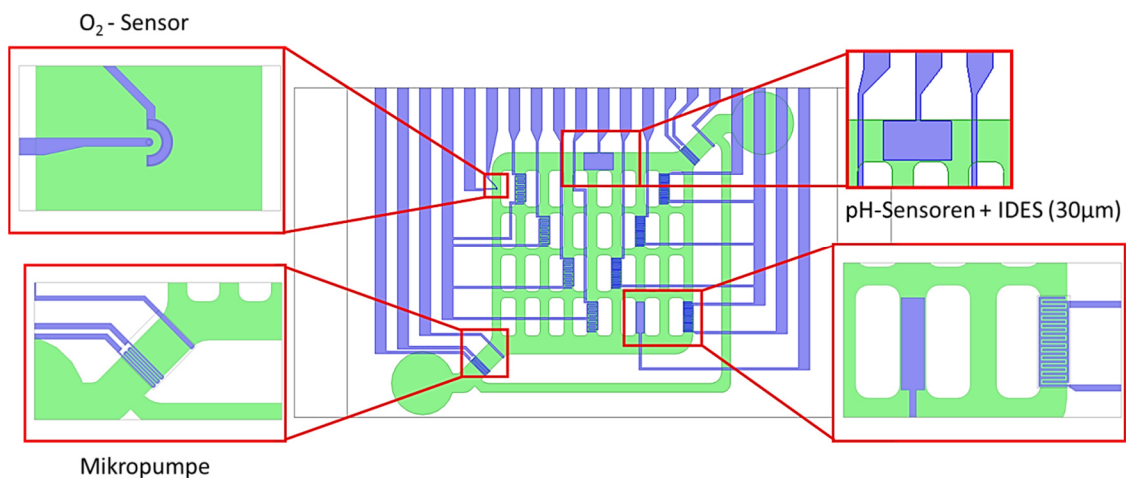


Abbildung 4-1: Fluidikstruktur mit überlagertem MSC-Aufbau 2D-Version (V1).

Fluidikstruktur mit Umlaufkanal (grün) und den Platinstrukturen (violett). Design/Abbildung von M. Kaeselitz.

Die Sensoranordnung der ersten Variante orientierte sich an der für Fluidikstruktur (2A-A) für das GeSiM-System. Die Sensoren wurden so angeordnet, dass sie sich möglichst gleichmäßig verteilen. Bei der Konzeption des 2D-Chips-V1 wurden neben einem Sauerstoffsensoren mit einer Arbeitselektrode von 10 µm Durchmesser und Gegenelektrode, zwei verschiedenen großen pH-Sensoren und insgesamt 8 IDES integriert. Die IDES bestanden aus je zwei ineinander greifenden Elektroden deren Abstand zwischen den „Fingern“ genauso groß wie die ihre Breite ist. Auf jedem Chip waren 4 IDES mit 30 µm sowie 4 IDES mit 50 µm Fingerbreite vorhanden. Dieses Design beinhaltete darüber hinaus noch zwei elektrothermische Mikropumpen (ETµPs).

Die elektrothermischen Mikropumpen (ET μ Ps) basieren auf einer Entwicklung des Lehrstuhls für Biophysik, der Universität Rostock [250,251]. Durch eine meanderförmige Heizstruktur bilden sie einen thermischen Gradienten zwischen den Elektroden, an welche zusätzlich ein hochfrequentes Wechselfeld angelegt wird, aus. Die ungerichtete Kraft des Wechselfeldes wird durch den thermischen Gradienten in eine gerichtete Kraft umgewandelt. Die Pumpen wurden integriert um das Konzept auch in dieser Größenordnung zu testen und eine Durchmischung des Mediums ohne externe Pumpeinrichtungen zu ermöglichen. Im Wesentlichen betraf die Weiterentwicklung eine Anpassung der Pumpengeometrie an die Parameter der Fluidik, durch eine Vergrößerung der Struktur an die Kanalbreite.

4.1.2 Design 2D-Version (V2)

Die zweite Version des 2D-Chips wurde basierend auf den Erfahrungen bzw. Testmessungen der ersten Version, unter den Beschränkungen des vorgegebenen Fluidikformates gefertigt. Unter anderem wurden keine Pumpen mehr integriert, wodurch 6 weitere Anschlüsse freigesetzt wurden. Die Anordnung der Sensoren orientierte sich an den Weiterentwicklungen der Fluidik, wie sie in Abschnitt 4.3.1 näher erläutert sind. Neben der Anpassung an die Fluidik wurde die Anordnung der Sensorik von der Anschlussverteilung der Auswerteelektronik vorgegeben, welche durch das BIONAS-System und den dafür entwickelten Multiplexer (MUX) definiert wurde. Das BIONAS-System, welches als Messelektronik vorgesehen war, verfügte über die Möglichkeit 5 Sauerstoffsensoren, 4 IDES und 4 pH-Sensoren nacheinander anzusteuern und auszulesen. Um die Fähigkeiten optimal ausnutzen zu können, wurden auf der 2D-Variante die entsprechende Anzahl an Sensoren integriert. Da das BIONAS-System Sauerstoff nur in einer 2-Elektrodenkonfiguration gegen die Referenzelektrode messen konnte, wurde auf die dedizierte Sauerstoff-Gegenelektrode verzichtet.

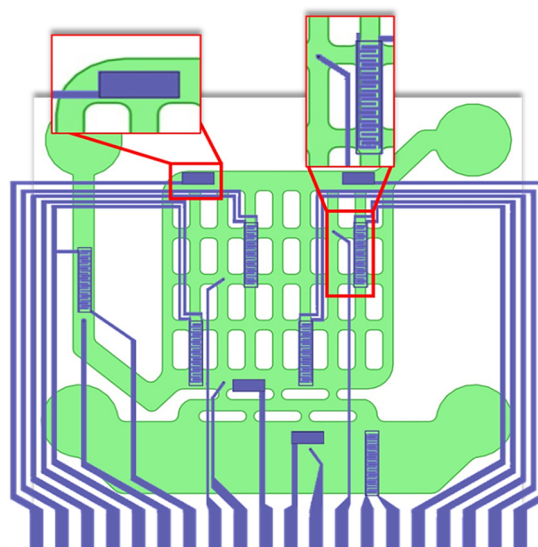


Abbildung 4-2: Fluidikstruktur mit überlagertem MSC-Aufbau 2D-Version (V2).

Fluidikstruktur mit Speicher und 4 Anschlüssen (grün) und den Platinstrukturen (violett). Im Fokusausschnitt oben, links hervorgehobener pH-Sensor. Oben rechts der Sauerstoffsensor (linkes Element) und einem IDES

4.1.3 2D-Laservariante (SLV)

Das Design der als SLV-Chips bezeichneten Chips berücksichtigte die Erkenntnisse, welche bei der Entwicklung und Nutzung der vorhergehenden Chips gewonnen wurden. Die Laserablation erhöhte den Freiheitsgrad in der Auslegung des Designs. Neben den neuen Möglichkeiten die das verwendete Fertigungsverfahren hat, ergaben sich auch andere Anforderungen an die Chips.

Aus den Vorarbeiten mit den vorhergehenden Designs ergaben sich mehrere veränderte Anforderungen. Dazu gehörte eine wesentlich größere Kulturfläche um die Zellzahl erhöhen zu können und um die Integration der optischen Sensoren zu ermöglichen. Weiterhin ergaben sich aus den Vorarbeiten die Notwendigkeit breiterer Dichtungskontaktflächen und die Reduktion der Übergänge in der Fluidik. Die Verringerung der Anzahl der Übergänge hatte die Reduktion von „Kristallisationspunkten“ für die Bildung von Luftblasen zum Ziel. Im Gegensatz zu den V2-Chips wurde wieder eine Gegenelektrode für den Sauerstoffsensoren eingeführt, um im 3-Elektrodenansatz messen zu können. Des Weiteren wurden die Sensoren vergrößert, um eine höhere Sensitivität bzw. Stabilität zu erreichen. Das System für den die Chips vorgesehen waren, sollten außerdem mechanisch stimulierbar sein. Die Anfangsvorgaben sahen dafür ursprünglich das Durchbiegen der Chips (der Kulturfläche) vor, wodurch diese jedoch zerstört worden wären.

4.1.4 Änderungen der Sensorabmessungen

Während des Entwurfes der zweiten Version der 2D- und 3D-Chips im GeSiM-Format durchliefen die Sensoren neben der Änderung der Anzahl auch einige Formanpassungen. Die Vergrößerung der Sensoren sollte zu störungsresistenterem Verhalten führen, wobei der limitierende Faktor immer der nutzbare Raum durch die Fluidik sowie die Anzahl der Anschlüsse bzw. der Anschlussverteilung waren. Eine Übersicht über die Strukturen findet sich in Tabelle 2. Die Vorgaben bestanden zudem immer in der Maximierung der Sensoranzahl, entsprechend der Möglichkeiten der Elektronik des Bionas 2500 Systems. Diese Anforderungen wurden erfüllt, wobei eine Reduktion der Sensoren bei größerer Abdeckung möglicherweise sinnvoller ist. Die größte Änderungen erfuhren die Sensoren beim Entwurf des SLV-Chips, da sich hier die nutzbare Fläche änderte, wobei die Anordnungsmöglichkeiten noch immer durch die Vorgaben der Elektronikchnittstelle (Flexplatine, Anschlussverteilung) definiert wurden. Die Größen der Zuleitungen wurden soweit wie möglich beibehalten um die Fertigung zu vereinfachen. Die Leitungsführung auf den Chips, hatte eine möglichst geringe Beeinträchtigung der mikroskopischen Beobachtbarkeit zum Ziel. Sie könnten bei reproduzierbarer Fertigung aber sowohl dünner, als auch mit geringeren Abständen zueinander ausgeführt werden.

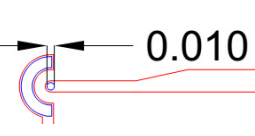
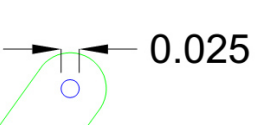
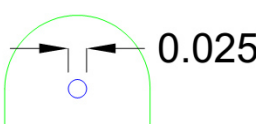
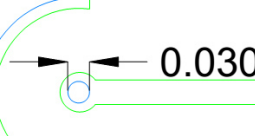
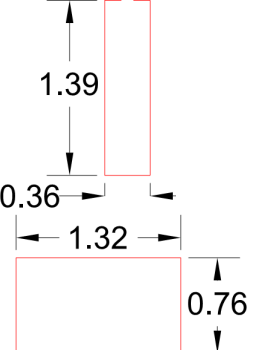
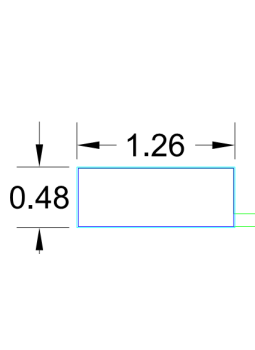
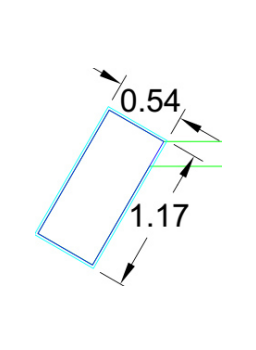
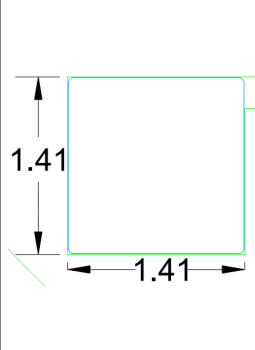
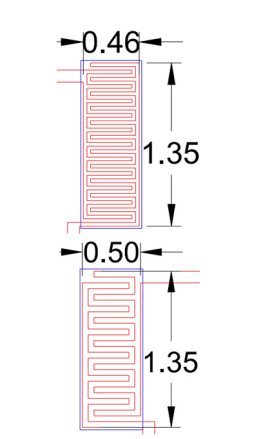
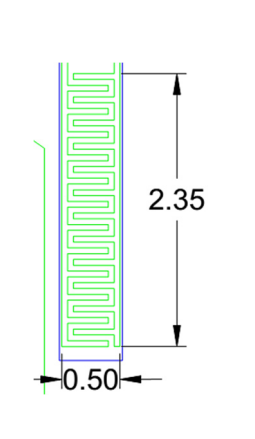
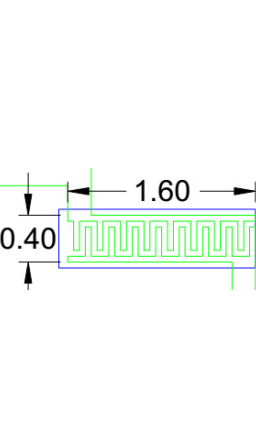
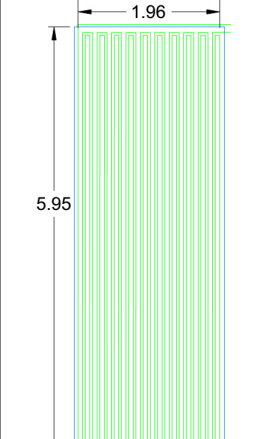
	2D Chip (V1)	2D Chip (V2)	3D Chip (V2R)	2D (SLV)
O₂				
pH				
IDES				

Tabelle 2: Die Sensoren und ihre Abmessungen für die verschiedenen Chipvarianten.

Sauerstoffsensoren wurden 4x größer dargestellt als die anderen Sensoren, SLV-IDES (unten-rechts) im Verhältnis verkleinert dargestellt. Exportiert aus AutoCAD Mechanical®, alle Größenangaben sind in **mm** angegeben.

4.2 Chipherstellung

4.2.1 Konventionelle Fertigung

Basierend auf den im Lehrstuhl für Biophysik an der Universität Rostock konzipierten Designs, wurden die Chips mit lithographischen Techniken gefertigt. Bei der Fertigung des Wafers für die **erste Generation** von Chips (**V1**) wurden von Marko Kaeselitz der zusätzliche Layer für die Si₃N₄-Sensorschicht nicht berücksichtigt (siehe Anhang A2). Das Design verfügte nur über zwei Maskenlayer, Layer 1 für die Platinstrukturen und Layer 2 für die Passivierungsöffnungen. Dies führte dazu, dass die pH-Sensoren auf den 2D-Chips der ersten Generation mit 1000 nm Si₃N₄ beschichtet wurden, wodurch sie nicht funktionsfähig waren. Um die maximale Genauigkeit zu erhalten, wurden für die Lithographie zwei Chrommasken (je 600 €) gefertigt. Die Kosten je Wafer lagen somit bei ca. 750 €.

Der Wafer für die **zweite Chipgeneration (V2)** und die **3D-Chips (V2R, radiales Design)** umfasste bereits drei Maskenlayer (Abbildung 4-3) [252]. Neben der Strukturlayer für die Platinstrukturen (grün), die Passivierungslayer mit den Öffnungen für die Passivierung (blau) und die Sensorlayer (türkis) für die pH-sensitive Schicht. Die Laserbearbeitung

erfolgte nicht bei GeSiM, sondern wurde nach vollendeter Lithographie bei der SLV GmbH durchgeführt. Näheres dazu, siehe Anhang Abschnitt A3 .

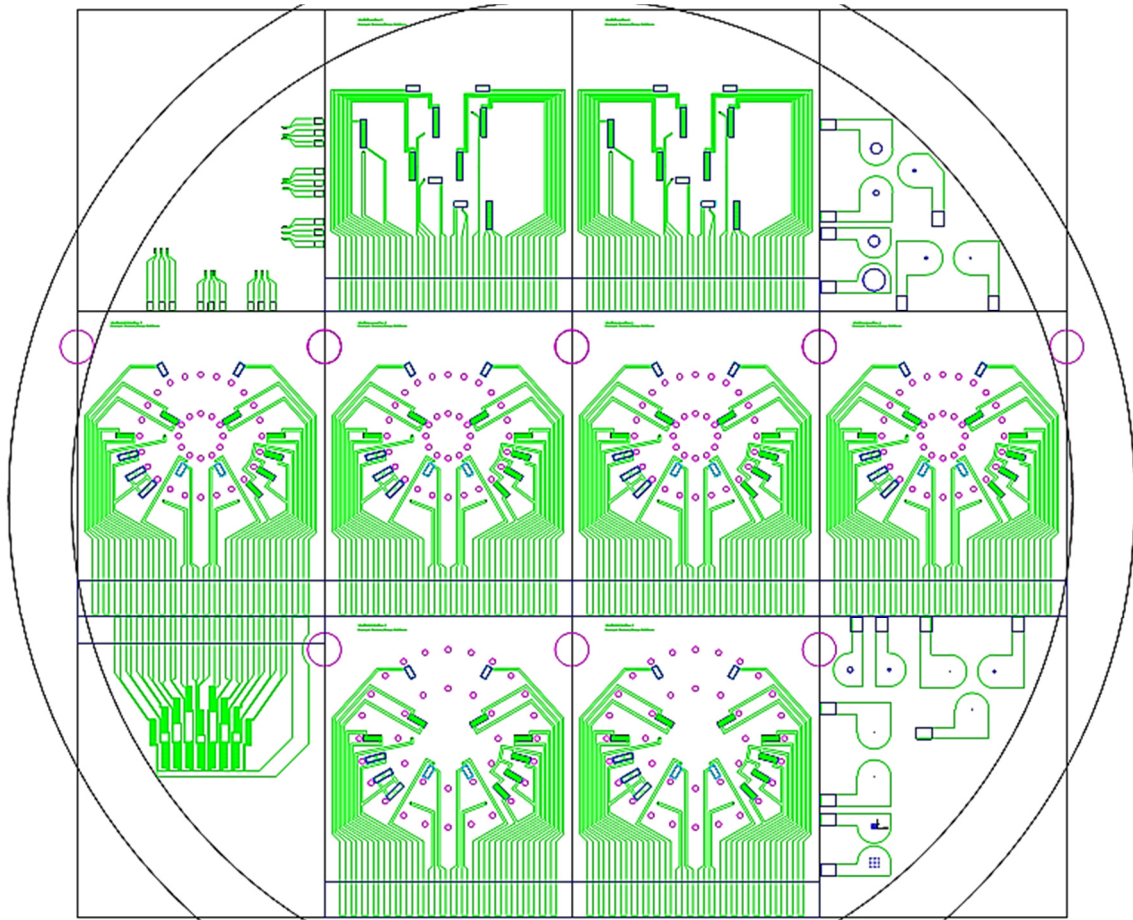


Abbildung 4-3: Darstellung des Wafers für die V2-Chips.

Äußerer Kreis Wafergröße, Innerer Bereich strukturierbare Zone. Obere Reihe Mitte: Chips 2D-V2, Mittlere Reihe: Chips für das 3D-System (Oberste und unterste Layer), Unten Mitte: Chips für die mittlere Layer des 3D-System. Im Abgerundeten Bereich Testchips für verschiedene Anwendungen. Rote Markierungen: Bereiche für die Laserbearbeitung der Chips.

4.2.2 Lasergestützte Fertigung

4.2.2.1 Reinigung

Die zu Anfang verwendeten Reinigungsschritte mit Ethanol, Aceton und Aqua dest. sowie die Reinigung in kochender „Piranha-Lösung“ (50:50, $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$), führten zu keinen besseren Ergebnissen als die ausschließliche Reinigung mit Tikopur, wie in 3.4.3.1 beschrieben. Die Vorreinigung mit Ethanol wurde weiterhin durchgeführt, um das auf den Objektträgern befindliche Fett zu entfernen und eine erste Begutachtung auf Materialfehler durchzuführen.

Um die Güte der Reinigung zu überprüfen, wurde nach dem Sputtern Tesafilm auf den Chip geklebt und schnell abgerissen. Wurde dabei großflächig Material mit abgezogen, so wurde der Chip verworfen. Kleinere Defekte, besonders im Randbereich, wurden toleriert da selbst das Berühren der Oberfläche mit Kunststoffpinzetten bereits ausreichen konnte, um die Materialhaftung auf dem Kontaktbereich zu reduzieren.

Die immer wieder auftretenden Ablösungserscheinungen bzw. Löcher in der Beschichtung, sind daher entweder die Folge eines unzureichenden bzw. fehlerhaften Reinigungsprozesses oder der minderen Glasqualität (einfaches Floatglas). Der Typ des Glases, bzw. seine Herstellung scheint einen Einfluss gehabt zu haben, da sich vereinzelt kein einziger Objektträger einer Packung beschichten ließ. Das deutet auf ein chargenspezifisches Problem hin.

4.2.2.2 Beschichtung

Nach der Reinigung wurden die Chips im Reinraum in die aus PCB gefertigten Adapter eingesetzt (siehe Abbildung 3-1). Die Chips wurden nur an den Kanten mit Handschuhen berührt, da das Halten mit metallischen oder Kunststoffpinzetten zu problematisch war. Nach Fixierung in den Adaptern wurden diese in die 4“-Zoll Waferträger eingesetzt und in die Sputteranlage (Ardenne LA-320S, VON ARDENNE GmbH, DE) eingeführt. Die anfangs aus PC gefertigten Waferträger konnten der Erwärmung in der Anlage nicht standhalten, sodass die weiteren Träger aus FR4 gefertigt wurden. Dies ermöglichte die Temperierung der Chips für 1 min auf 100 °C bevor sie besputtert wurden, da ein positiver Effekt auf die Haltbarkeit und Vergleichbarkeit der Schichten erwartet wurde. Die Sputteranlage der Universität verfügt nicht über ein Schichtdickenmessgerät deswegen mussten die Schichtdicken durch Parameterstudien bestimmt werden. Der Operator besputterte Testsubstrate mit verschiedenen Targets bei variierenden Sputterzeiten und vermaß die erreichten Schichtdicken. Aus der erstellten Tabelle wurden dann die notwendigen Sputterzeiten berechnet. Die Zielgrößen stellten die Strukturdicken der GeSiM-Chips dar, welche Schichtdicken von 10 nm Titan und 100 nm Platin besitzen. Um Schwankungen der Anlage auszugleichen, wurden die jeweils nächsthöheren Sputterwerte aus der Tabelle verwendet, wodurch sich Schichtdicken von 15 nm Titan und 130 nm Platin ergaben.

Zuerst wurde bei 400 Watt für 10 s Titan gesputtert, das als Haftvermittlerschicht zwingend notwendig war. Unmittelbar danach wurde für 30 s mit Platin besputtert. Die Beschichtung mit Si_3N_4 erfolgte ohne Titan-Haftvermittlerschicht. Für das Besputtern mit Si_3N_4 musste die Anlage im Hochfrequenzbetrieb gefahren werden. Für die Passivierung wurde bei der Maximalleistung von 400 Watt der Chip für 300 s besputtert, was einer Schichtdicke von ca. 200 nm entspricht. Danach folgten eine Pause von 180 s und ein weiterer Beschichtungsschritt von 300 s. Die Pause war notwendig, da die Anlage maximal 300 s durchgehend arbeitete und dem Substrat die Möglichkeit zur Abkühlung gegeben werden sollte. Für die Beschichtung der pH-Sensoren wurden die Slides auf eine Maske aus kupferbeschichtetem FR4-Material (PCB) aufgelegt, die nur Öffnungen über den pH-Sensoren aufwies (Abbildung 3-1 B,C). Damit wurden nur die Elektroden der pH-Sensoren bzw. ausgewählte Testsensoren mit einer sensitiven Schicht versehen. Die Schicht wurde im HF-Modus bei 300 Watt in 90 s aufgesputtert, was einer Schichtdicke von etwa 60 nm Si_3N_4 entspricht. Da die abgeschiedene Si_3N_4 Schicht keine scharfen Kanten zum unbeschichteten Untergrund aufwies, war eine Bestimmung der absoluten Schichtdicke mit dem Schichtdickenmessgerät nicht möglich.

4.2.2.3 Strukturierung

Es wurden mehrere Testläufe mit verschiedenen Laserleistungen und Overlap-Einstellungen gefahren, um die optimalen Parameter zu bestimmen. Die Laserleistung bezeichnet die Leistung in % des Maximalwertes pro Puls und der Overlap die prozentuale Überlagerung der Laserstrahlfläche von hintereinander folgenden Pulsen.

Die Einstellung mit den geringsten Leistungen bei vollständigem Abtrag wurde dann für die Fertigung verwendet. Für die Definition der Strukturen wurde der Laser ($\lambda = 343 \text{ nm}$) auf einen 84 % Overlap bei 9 % Maximalleistung ($E \approx 1,25 \text{ } \mu\text{J}$ pro Puls) und 100 mm/s Verfahrgeschwindigkeit justiert. Für die Schraffur, also die Entfernung des restlichen Platins wurde der Chip mit einer Geschwindigkeit von 1000 mm/s bei 400 kHz mit einem Overlap von 84 % bidirektional (Linienabstand $8 \text{ } \mu\text{m}$) abgefahren. Für die ITO-Substrate wurden dieselben Parameter verwendet. Da die ITO-Substrate erst sehr spät während der Arbeit verfügbar waren, wurden diese nur hergestellt, um die Nutzbarkeit des Systems für das Material zu überprüfen. In Abbildung 4-4 sind mikroskopische Aufnahmen des Sauerstoffsensors und eines IDEs dargestellt. Die schwarzen Linien um den ITO-Sauerstoff-Sensor sind auch vereinzelt bei der Herstellung der Platinstrukturen vorgekommen. Die Ursache liegt in einem höheren Energieeintrag aufgrund der radialen Struktur, dadurch wurde das Glassubstrat mit abgetragen. Dass dieser Effekt nur bei einzelnen Platinstrukturen auftrat liegt wahrscheinlich an den, durch die Sputteranlage bedingten, variierenden Schichtdicken des Platins.

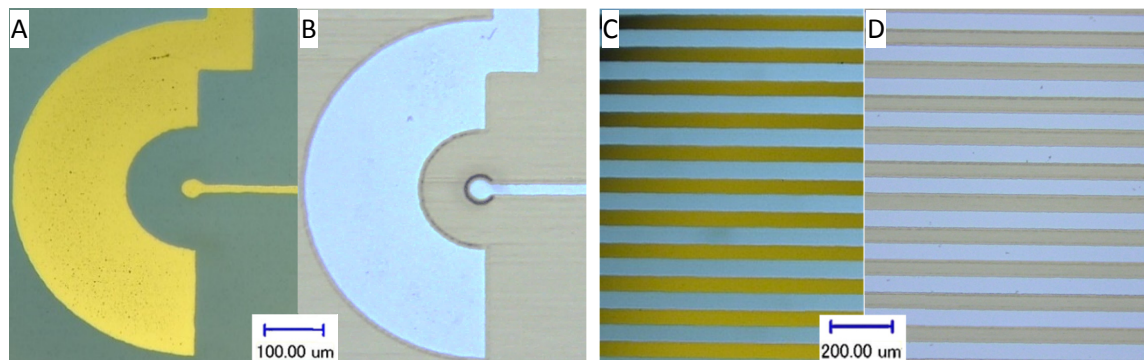


Abbildung 4-4: Vergleich der Platinstrukturen (A,C) mit den ITO Strukturen (B,D).

Links: O2 Sensor Rechts: IDEs-Finger

4.2.2.4 Kantenqualität

Die Kantenrauigkeit wurde mittels AFM (JPK, Nanowizard 2) bestimmt. Es wurden unter Verwendung der Standardeinstellungen mit einem Cantilever im Contact Mode ausgewählte Positionen der Oberfläche abgebildet (Abbildung 4-5). Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit der Freeware Gwyddion.

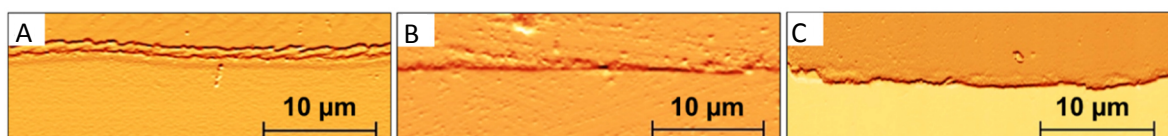


Abbildung 4-5: AFM Abbildungen eines IDEs Fingers.

A. ITO auf Glas, B. Platin auf Glas, C. GeSiM-Chip (photolithographisch hergestellt)

Die Kantenrauigkeit des gelaserten Platins und des ITO war vergleichbar mit der Kantenrauigkeit eines photolithographisch prozessierten Chips von GeSiM, der als Referenz vermessen wurde. Das ITO weist aber eine Stufe zur Schnittkante auf (Abbildung 4-6). Die gelaserten Kanten zeigen eine Wellenstruktur, welche $\pm 1 \mu\text{m}$ um den Fokuspunkt schwankte. Diese wellenförmige Schwankung basiert auf einer Abweichung der Strahlführung vom Idealverlauf. Die Strukturen entsprechen den CAD-Zeichnungen. Allerdings wurde an der Schnittkante $1 \mu\text{m}$ mehr Material abgetragen als vorgesehen, wodurch ein Versatz entstand (Abbildung 4-6, B).

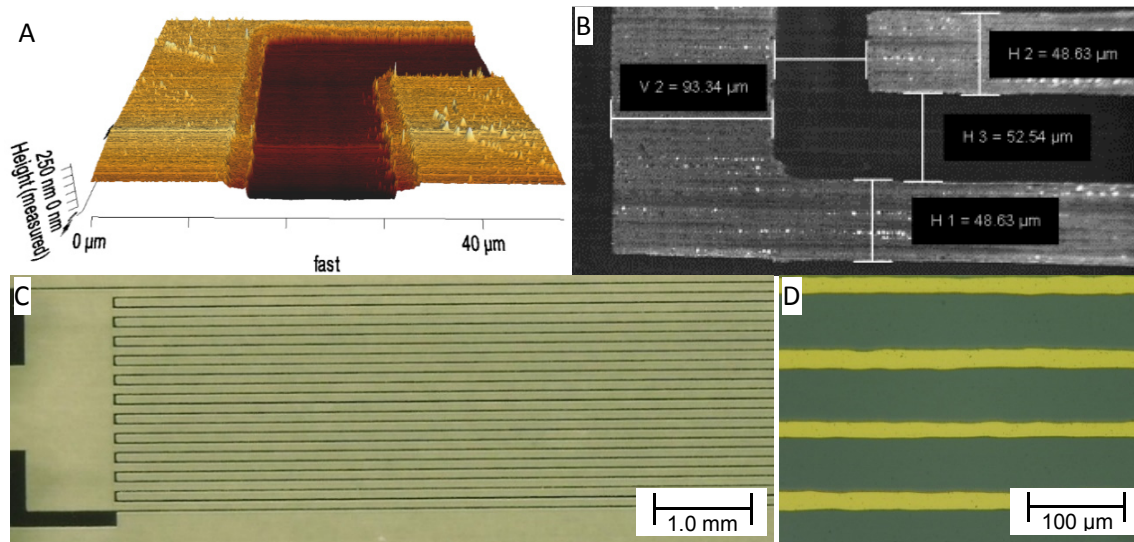


Abbildung 4-6: AFM, REM und optische Kontrolle der gelaserten Substrate

A: 3D-Ansicht eines gelaserten ITO Substrates mit erkennbarer Stufe, B: REM Aufnahme eines IDES aus Platin nach Entfernen der Passivierung. Zielgröße der Finger bzw. Abstände war $50 \mu\text{m}$. C: Aufnahme einer Heizwendel (gefertigt als Teststruktur) mit $20 \mu\text{m}$ Breite und 11mm Länge. Die Struktur konnte ohne Unterbrechungen gefertigt werden. D: Mikroskopische Aufnahme von C: Gut erkennbar die leichte Welle entlang der Schnittkanten.

4.2.2.5 Flächenabtrag

Die Werte für den selektiven Abtrag einer Si_3N_4 -Schicht von 60nm wurden mit einer Parameterstudie bestimmt. Die Versuche wurden bei einer ultravioletten Wellenlänge von 343nm auf einem mit Platin und Si_3N_4 beschichteten Glasträger durchgeführt. Für die Studie wurden Quadrate von $5 \times 5 \text{mm}^2$ und einer schrittweise steigenden Pulsenergie mit parallelen Linien und einem Abstand von $6 \mu\text{m}$ schraffiert. Die Scangeschwindigkeit betrug 1000mm/s , mit einer Pulsfrequenz von 200kHz ergab sich ein Overlap von 68% . Aufgrund der Parameterstudie wurde das Si_3N_4 mit 11% Leistung abgetragen, da bei geringeren Leistungen oftmals noch Si_3N_4 zurückblieb. Auch bei 11% Leistung konnte es vorkommen, dass Si_3N_4 zurückblieb, dieses ließ sich aber mit einem Tuch abreiben.

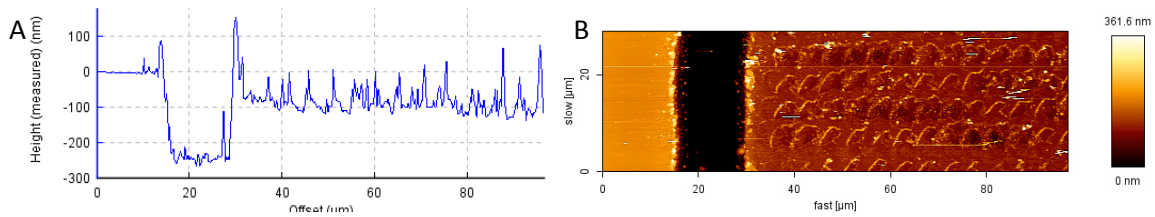


Abbildung 4-7: AFM-Messung der Oberflächenrauigkeit des gelaserten Bereiches bei 11 % Laserleistung. A: Höhenverteilung über den Abbildungsbereich justiert auf Oberfläche des Chips (0 nm). B: Draufsicht auf den Bereich

Nachdem die Parameterstudie mit 60 nm Si_3N_4 gezeigt hatte, dass ein selektiver Abtrag möglich ist, wurden auch Chips mit ca. 400 nm Si_3N_4 (2x300 s Sputtern + 180 s Pause) und mit 1000 nm Si_3N_4 , von GeSiM beschichtete Chips gelasert. Diese Schichten ließen sich mit den gleichen Parametern abtragen, sodass sich weitere Parameterstudien erübrigten.

Für das Bearbeiten der Öffnungen der Arbeitselektrode der Sauerstoffsensoren mussten andere Einstellungen gefunden werden, da diese bei Verwendung der Strukturierungsparameter zerstört wurden. Hierfür wurde die Laserleistung bis an den Wert der Ablationsschwelle verringert. Die Laserpositionen wurden manuell ausgerichtet, da der Scanner durch den häufigen Umbau der Anlage automatisiert nicht exakt genug auszurichten war. Die Öffnungen wurden mit einem Overlap von 68 % bei 9 % Maximalleistung und 100 mm/s gelasert.

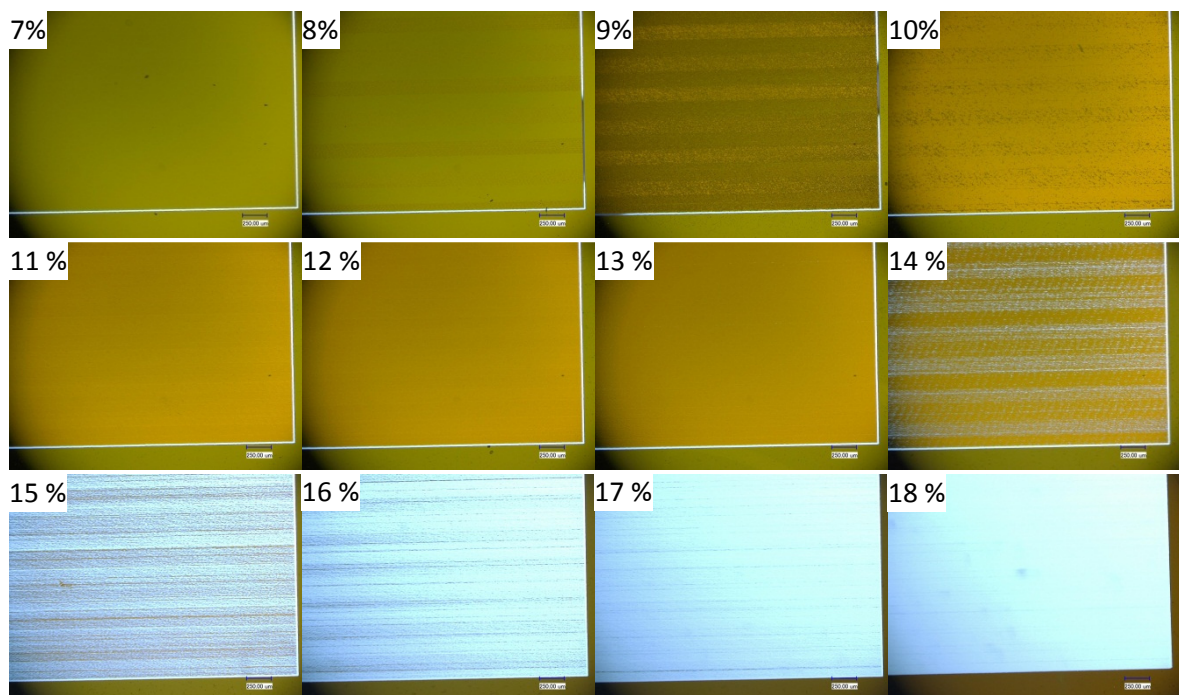


Abbildung 4-8: Mikroskopische Aufnahmen der Parameterstudie zum Abtrag von Si_3N_4 . Die angegebenen %-Werte entsprechen der prozentualen maximalen Laserleistung. Ab 8 % erfolgte Abtrag von Si_3N_4 , ab 11 % erfolgte der Abtrag von Platin, bei 18 % wurden beide Materialien vollständig entfernt.

4.2.3 Diskussion zur Fertigung

Das UKP-Laserablationsverfahren ist ein neues Fertigungsverfahren für Sensorchips. Es eignet sich für die direkte Strukturierung von Platin auf Glas als auch für ITO auf Glas. Es konnte gezeigt werden, dass die Technik für die schnelle Anfertigung von Prototypen geeignet ist und stabile, funktionsfähige Sensorstrukturen gefertigt werden können. Bei Kosten von 220 € pro Mannstunde und Bearbeitungszeiten von 2:30 min pro Chip (ca. 24 Chips/h) ergeben sich Strukturierungskosten von weniger als 10 € pro Layer, was für Kleinserien alternativlos günstig ist. Für dieses Design reduziert die Verwendung von ITO Substraten die Zeit auf 1:05 min pro Chip. Selbst bei Nutzung von Substraten aus Borosilikatglas oder ITO beschichteter Substrate und externer Si_3N_4 Beschichtung sind Kosten pro vollständig prozessierten Chip unter 40 € möglich. Zum Vergleich: Ein Wafer mit 8 V2-Chips von GeSiM kostet etwa 1250 € ohne Masken bei 6-8 Wochen Fertigungszeit.

Die Genauigkeit und Kantengüte des Verfahrens ist bei der Leiterbahnstrukturierung vergleichbar mit der konventionellen Fertigung durch Photolithographie. Die Auflösung ist vergleichbar mit der von Photomasken bei photolithographischen Verfahren.

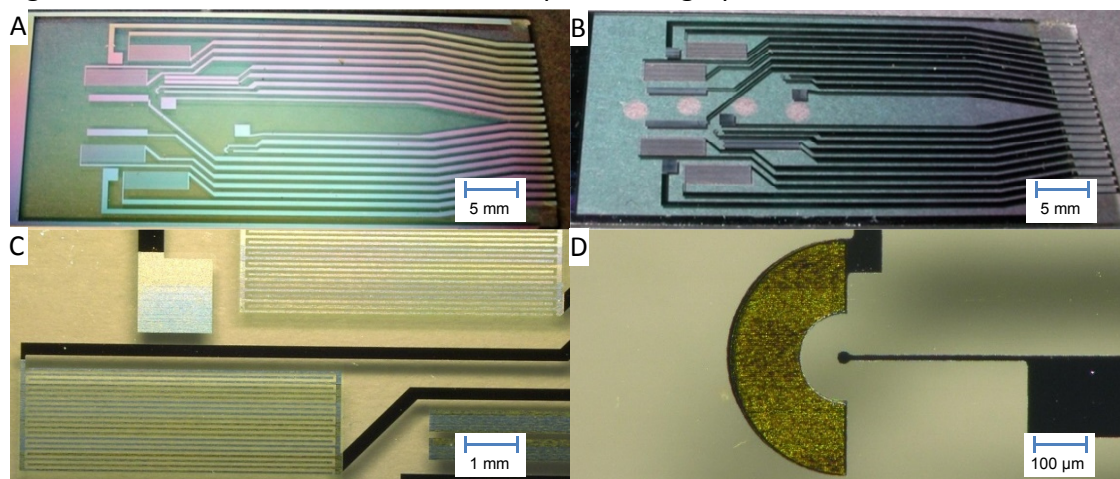


Abbildung 4-9: Gelaserte SLV-Chips.

A: Chip ohne geöffnete Passivierung (200 nm), B: Chip mit geöffneter Passivierung und beschichteten pH-Sensoren, C und D: Mikroskopaufnahmen der Strukturen mit geöffneter Passivierung, IDEs und pH (C) sowie Sauerstoffsensoren (D)

Die nachfolgende Entfernung von aufgetragenen Si_3N_4 wurde ebenfalls realisiert, wobei bei der Prozessierung die Oberfläche der Platinstrukturen angegriffen wurde. Dies lässt sich nicht vermeiden, da eine verringerte Leistung unterhalb der Ablationsschwelle liegt bzw. Leistungsdifferenzen zwischen den Außenbereichen und dem Zentrum des Laserspots auftreten. Wurde Si_3N_4 abgetragen, wurde oft auch die darunterliegende Platinschicht geringfügig mit abgetragen (Abbildung 4-9 D). Mit Ausnahme der Arbeitselektroden der O_2 -Sensoren, war bei 11 % Laserleistung kein nachweisbarer negativer Effekt auf die Stabilität der Strukturen ersichtbar. Einzelne Testchips wurden sogar über mehrere Minuten kochender Piranha-Lösung ausgesetzt, ohne dass dies zu einer Zerstörung oder Ablösung führte. Die Möglichkeit, dieselben Parameter für 60 nm Si_3N_4 als auch für größere Schichtdicken zu verwenden, impliziert, dass der Abtrag nicht top-down erfolgte, sondern ein Effekt an der Grenzfläche zwischen Platin- Si_3N_4 bzw. Glas- Si_3N_4 ist. Etwas Vergleichbares ist bereits von Bovatsek beschrieben worden [253]. Das erklärt auch

die wesentlich gröbere Kantenstruktur des gelaserten Si_3N_4 , da dies in einem solchen Fall zu Spannungsbrüchen zwischen den laserbearbeiteten Zonen und der unbearbeiteten Randzone kommt. Zudem war der Abtrag über Platin besser als über Glas. Auch dies spricht für eine Reaktion an der Materialgrenzfläche, da es diesen Effekt bei einem Abtrag von der Oberseite nicht geben dürfte. Das Si_3N_4 ist für den Laser wahrscheinlich zu durchlässig, sodass ein Großteil der Energie vom darunterliegenden Platin absorbiert oder reflektiert wird. Dies würde zu einem höheren Energieeintrag in Schichten über dem Platin führen, was die Abtragsraten erhöhen und die Differenz der Werte erklären würde. Dieser Effekt ist dennoch als alleinige Erklärung für die gleichbleibende Leistung bei verschiedenen Schichtdicken auf Glas, unzureichend. Hier wird die Auflösung der Haftung an der Grenzfläche zwischen Si_3N_4 und Glas der Hauptfaktor sein [253]. Auch der nicht lineare Absorptionsprozess dieses Lasertyps wird einen Einfluss auf diesem Effekt haben [241].

In beiden Fällen bedeutet dies, dass ein gleichmäßiger oder stufenweiser Abtrag von Si_3N_4 nicht möglich ist. Das wäre wünschenswert gewesen, um die Höhenreduktion der Passivierung auf 60 nm durchzuführen und somit auf einen weiteren Sputterprozess, sowie auf die Sputtermasken für die pH-Sensoren verzichten zu können.

Eine weitere Herausforderung ist die strukturelle Schädigung der Arbeitselektroden der Sauerstoffsensoren. Versuche dies zu minimieren, indem die Laserleistung herabgesetzt oder die Overlapwerte verringert wurden, waren nicht erfolgreich. Bereits die Platinfläche der Arbeitselektrode (50 μm Durchmesser) war kritisch, da der Energieeintrag an den Rändern durch den geringen Radius zu partieller Ablation des Glases führte. Der noch geringere Radius (12,5 μm) für die Passivierungsöffnung verstärkte dieses Problem.

Als Lösungsansätze für die Justierung der Laserparameter solcher Strukturen kommt die Modifikation des Designs oder die Änderung der Schichtdicke der Platinschichten in Frage. Als Alternative zur Fertigung von einzelnen radialen Öffnungen zwischen 25 μm (Zielgröße der Sensoren) und 35 μm (Größe der Arbeitselektroden auf den Chips des Bionas-Gerätes) könnte man auf derselben Oberfläche mehrere einzelne Öffnungen in der Größe des effektiven Laserspots (ca. 10 nm) fertigen. So ließe sich aus einem einzelnen Sauerstoffsensoren eine Mikroelektrodenarray bilden. Da es nur Einzelspots sind, würden die Einstellungen wie Scangeschwindigkeit und Overlap keine Rolle mehr spielen und die Fertigung ließe sich wesentlich vereinfachen. Weiterhin würde ein Mikroelektrodenarray weitere vorteilhafte Eigenschaften bieten:

Die nutzbare Elektrodenfläche und somit der Messstrom ließe sich durch Erhöhung der Spotanzahl vergrößern. Eine Vergrößerung der Elektrodenoberfläche würde die Sensitivität, als Funktion des Stromes in Abhängigkeit des zu messenden Sauerstoffes, erhöhen. Ein großflächiges Array würde außerdem eine höhere Fehlertoleranz und eine bessere Abbildung der realen Sauerstoffverhältnisse im System bieten.

Die andere einzeln bzw. zusätzlich zu realisierende Alternative wäre die Erhöhung der Schichtdicke des Platins, um so einen partiellen Abtrag kompensieren zu können.

4.3 Systementwicklung

4.3.1 Fluidikvarianten

Um die Verringerung der Blasenbildung und eine vereinfachte Befüllung bzw. Besiedelung zu erreichen, wurde im Laufe der Arbeit das Fluidikdesign weiterentwickelt (Abbildung 4-10). Dies führte zu einer Vielzahl von Designs die aufeinander aufbauten und im Folgenden entsprechend ihrer Form bezeichnet sind. Die Grundversion der Fluidik resultierte auf den Simulationen und den Arbeiten von Dipl.-Phys. Marko Kaeselitz und verfügte über zwei Anschlüsse (**2A**) die quer zu der durch Blöcke definierten Gitterstruktur - dem eigentlichen Kulturbereich - lagen. Dies wurde zu Systemen mit **Umlaufkanal** für die ET μ Ps (**2A-U**) mit 3 und 4 Anschlüssen inkl. Medium-Speicher (**3A-S**, **4A-S**, **4A-Sg**, **4A-OB**) fortgeführt. Bei der Entwicklung der Fluidik für die Stimulationssysteme wurde die Fluidik neu konzipiert, was zu den mit **S-1** bis **S-3** bezeichneten Systemen führte.

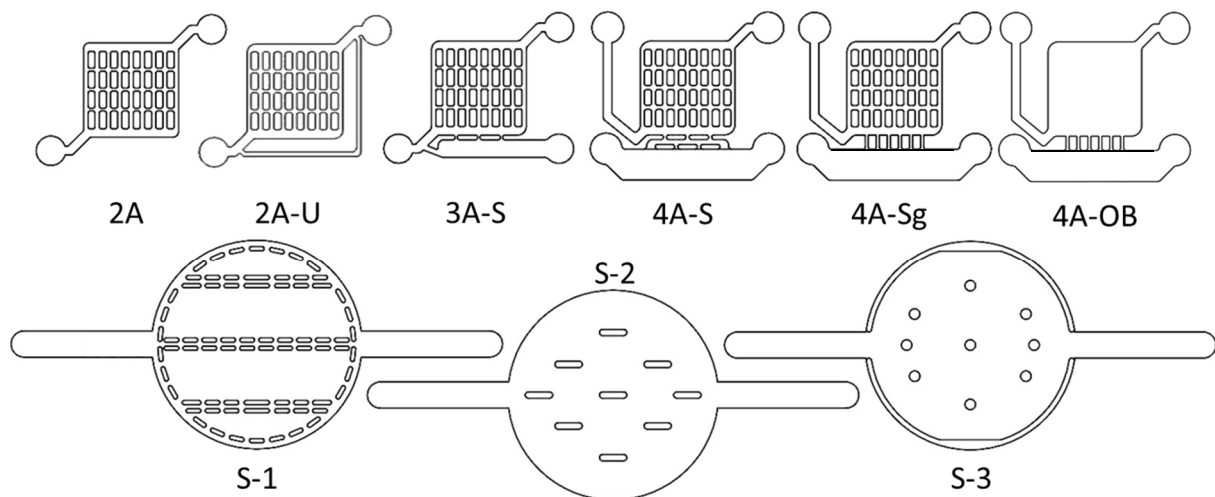


Abbildung 4-10: Übersicht über die gefertigten Fluidiksysteme mit Kurzbezeichnung.
(xA=Anzahl an Fluidik-Anschlüssen, U=Umlauf, S= Speicher, Sg= Speicher groß, OB=ohne Blöcke).

4.3.1.1 Entwicklungsverlauf der Fluidik für die GeSiM-Chips

Die Entwicklung der Fluidik für das GeSiM-System beginnend mit der von Dipl.-Phys. Marko Kaeselitz vorgegebenen Grundform ist in Abbildung 4-11 dargestellt. Beginnend mit dem Grundentwurf, für den Herr Kaeselitz die Simulationen durchgeführt hatte, wurde die Version um einen Umlaufkanal (2A-U) erweitert und die Anschlüsse gedreht, um die elektrothermischen Mikropumpen (ET μ P) integrieren zu können. Bei der Weiterentwicklung der Fluidik wurde auf die Pumpen verzichtet (siehe Abschnitt 4.1.2.), wodurch der Umlaufkanal entfernt werden konnte. Der Kulturbereich mit den „Blöcken“ wurde beibehalten. Um die Besiedelung zu vereinfachen wurde ein dritter Anschluss angebracht. Durch Injektion der Zellen über diesen, sollte die Besiedelung erleichtert werden. Gleichzeitig wurde ein vergrößerter Bereich zugefügt, welcher als Mediumreservoir und aufgrund der Größe und der verringerten Strömungsgeschwindigkeit als „Sammelraum“ für die Zellen fungieren sollte (3S-S).

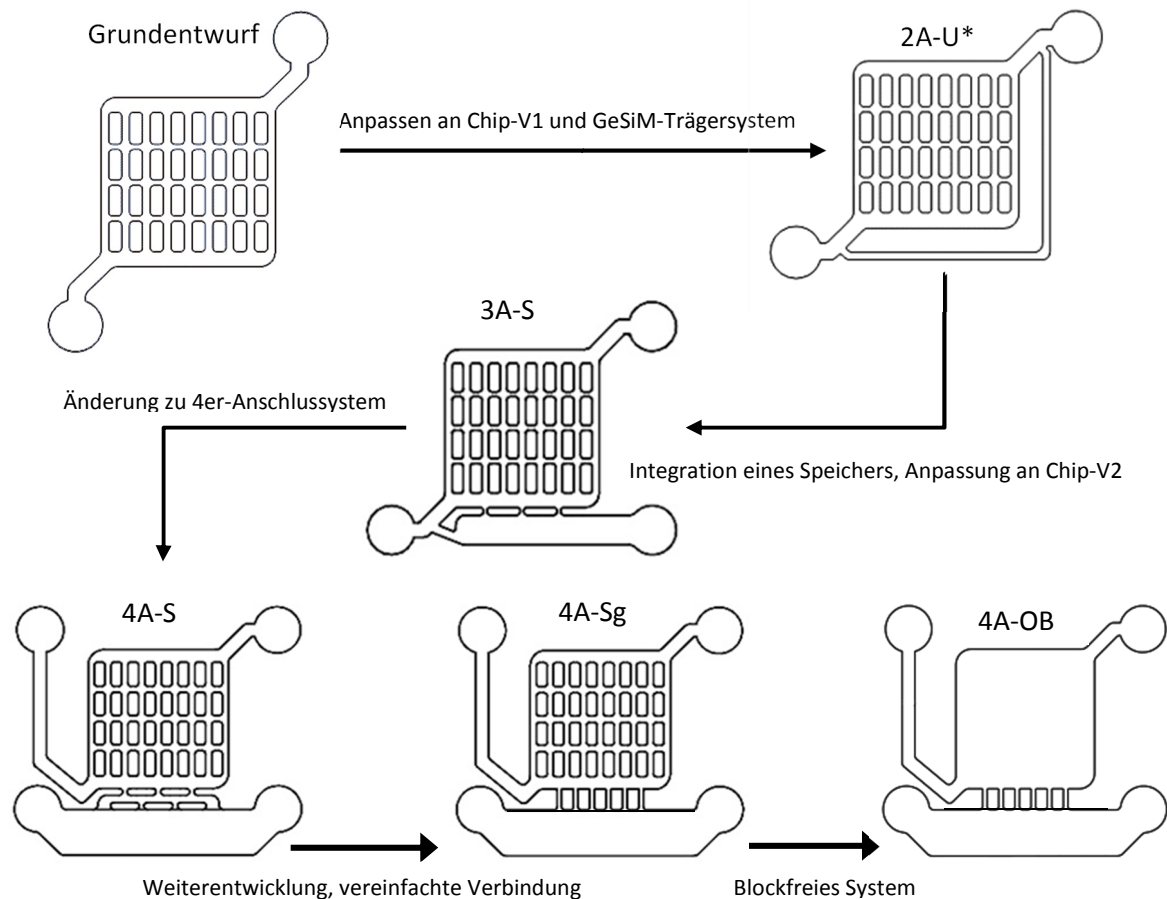


Abbildung 4-11: Darstellung des Entwicklungsverlaufes der Fluidiksysteme.

Mit Stern (*) markierte Systeme wurden von Marko Kaeseltz konzipiert. Die Bezeichnung orientiert sich an der Anzahl an Fluidikzugängen und weiteren Modifikationen. (S= Speicher, Sg= Speicher groß, OB=ohne Blöcke)

Dies wurde zu einem System mit vier Anschlüssen und einem Speicher erweitert (4A-S). Die erwarteten Vorteile waren ein höheres Mediumvolumen und somit längere Standzeiten ohne Pumpenaktivierung sowie bei Erhöhung des Speichers auf 1 mm (4A-Sg) die Nutzung als Blasenfalle. Dadurch waren größere Variationen bei Befüllung bzw. Besiedelung der Systeme (z. B. Teilbesiedelung des Speichers bzw. des Kulturbereiches) möglich. Bei Anschluss von zwei Pumpen ist der Verlauf des Medienflusses im System durch Veränderung des Verhältnisses der Fließgeschwindigkeiten möglich. Die erste Variante (4A-S) wurde mit mehreren Blöcken im Verbindungsbereich versehen, um nachträglich die am Lehrstuhl für Biophysik entwickelten T-Kanalpumpen integrieren zu können [254]. Die weiteren Systeme 4A-Sg und 4A-OB waren Vereinfachungen des Systems 4A-S. Die Vereinfachung der Fluidikführung war der effizienteste Weg um die Blasenbildung zu reduzieren. Die Kanten des PDMS störten die Zelladhäsion, weswegen diese auf ein Minimum reduziert wurden. Bei der Variante 4A-S wurden die fluidischen Verbindungen zwischen den Teilbereichen erhöht und in der Form vereinfacht. Mit Variante 4A-OB wurden die inneren Blöcke entfernt um den Kulturbereich zu vergrößern bzw. zu vereinfachen.

4.3.1.2 Simulation des Fluidikverhaltens der GeSiM-Systeme

Während der Entwicklung der ursprünglichen Systeme 2A bzw. 2A-U wurden durch Marko Kaeselitz umfangreiche Simulationen durchgeführt, um das Strömungsverhalten zu bestimmen. Aufgrund seiner Simulationen kam er zu der finalen Form des Fluidiksystems, welche als die Vorgabe für die weiteren Entwicklungen der Fluidik und der Chips diente und daher in der Grundform auch bei den Weiterentwicklungen für die GeSiM-Systeme verwendet werden musste (Abbildung 4-12).

Das System wurde unter dem Aspekt einer möglichst gleichmäßigen Druck- und Strömungsverteilung bei maximalen Kanalbreiten von 500 μm im Kulturbereich konzipiert. Als Kulturbereich wird hierbei der gitterförmige Bereich bezeichnet, der durch die rechteckigen Strukturen definiert wurde.

Die gleichmäßige Strömungsverteilung konnte weitestgehend realisiert werden, wobei in den Randbereichen die geringsten Strömungsgeschwindigkeiten erreicht wurden (rot markiert in Abbildung 4-12), während im grün markierten Bereich der Abbildung die höchsten Geschwindigkeiten erreicht wurden.

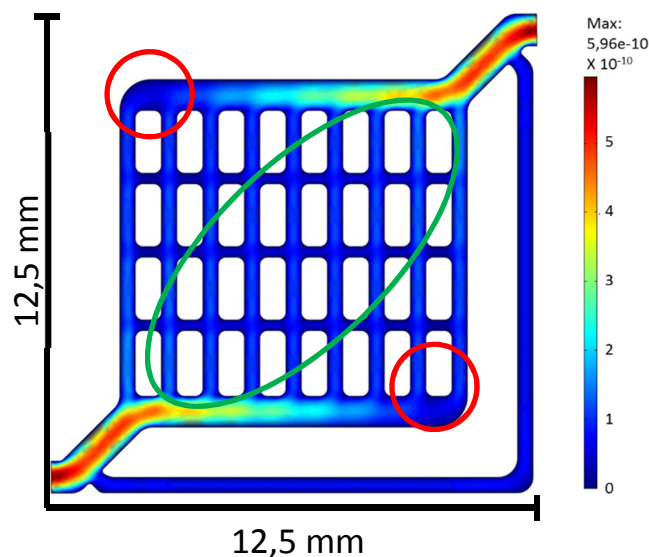


Abbildung 4-12: COMSOL® Simulation (2D) der finalen Version von Marko Kaeselitz.

Simulation des Strömungsverhaltens bei Durchströmung des Mediums durch das System. Dargestellt das Geschwindigkeitsfeld [m/s], Injektionsstrom unten links $5\mu\text{l}/\text{min}$ bei 0 Pa Gegendruck am Anschluss oben rechts. Rot markiert: Bereiche mit den geringsten Strömungsgeschwindigkeiten (Blasen anfällig), Grün markiert: Zone mit den höchsten Strömungsgeschwindigkeiten.

Die Versuche mit den gefertigten Systemen zeigten, dass die Zonen mit den geringsten Strömungsgeschwindigkeiten Problembereiche waren, da sich hier Gasblasen ansammelten. Bei vollständig befüllten Systemen deckten sich die mikroskopischen Beobachtungen mit den simulierten Fluidströmen. Die Simulationen konnten aber die Blasenbildung weder berechnen, noch berücksichtigen. So sammelten sich Blasen besonders häufig in den Ecken bzw. ließ sich der Umlaufkanal nur selten problemlos füllen, da er durch sich sammelnde Blasen verstopfte. Sofern das System mit ausreichend hoher Geschwindigkeit bzw. Druck vollständig befüllt wurde, waren von außen eingebrachte

Mikrobläschen das Hauptproblem. Diese sammelten sich bevorzugt in Bereichen mit geringen Strömungsgeschwindigkeiten. Neben den Ecken gehörten dazu vor allem die horizontal verlaufenden Kanäle.

Aufgrund der durch die Chipdesigns festgelegten Rahmenbedingungen konnte von dieser Struktur nicht mehr wesentlich abgewichen werden. Um diese Probleme zu beheben wurden die nachfolgenden Systeme 3A bis 4A-OB unter Beachtung der experimentellen Beobachtungen entsprechend weiterentwickelt (Abbildung 4-11).

Der Übergang zu den 4A-Versionen mit einem extra Speicherbereich sollte den Wachstums- vom Einsaat-Bereich (Speicher) trennen. Intensives Spülen des Kulturbereiches (zur Blasenentfernung) und eine kontinuierliche Mediumversorgung ohne Durchströmung des Speichers ermöglichen (Abbildung 4-13). Eine ausschließliche Versorgung im Kulturbereich von Anschluss 1 nach Anschluss 3 war weiterhin möglich, aber es bestand auch die Möglichkeit einen der beiden unteren Zugänge des Speichers zu verwenden.

Die Simulationen, welche zur Überprüfung der Systeme durchführt wurden, sind unter Verwendung des COMSOL Multiphysics-Modul, mit den Standardeinstellungen für inkompressible Fluide (incompressible Navier Stokes equation), realisiert worden. Die Umgebungsparameter waren 293,5 K bei einem Umgebungsdruck von 1016 hPa. Die Strömungsgeschwindigkeit wurde auf 0,001 m/s festgelegt was bei den Einlässen mit 0,9 mm Durchmesser (Innendurchmesser der Kanülen) einem Volumenstrom von 37,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ entspricht. Diese Geschwindigkeiten wurden für alle vergleichenden Simulationen gewählt. Darüber hinaus wurden auch Simulationen mit Fluidströmen bis 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt, was der Maximalgeschwindigkeit der Pumpe mit den verwendeten Schlauchdurchmessern entspricht. Die Simulationen zeigten keine unerwarteten Änderungen der Strömungsverläufe, was aufgrund von Reynoldszahlen <10 und damit nicht turbulenten Strömungsverhältnissen zu erwarten war.

Die simulierten Bedingungen bei Strömung durch den Kulturbereich von links unten nach rechts oben (Abbildung 4-13 A, Anschluss 1 \rightarrow 3) zeigten keine relevanten Unterschiede zu den Simulationen von M. Kaeselitz (Abbildung 4-12).

Die Verbindungen zum Speicher reduzieren hier nur in geringem Maße die maximalen horizontalen Strömungsgeschwindigkeiten und verlagerten das Maximum sogar etwas zur unteren rechten Ecke des Kulturbereiches (Abbildung 4-13 D). Mit dem Übergang vom System 4A-S zu System 4A-Sg (Abbildung 4-11) vereinfachte sich der Aufbau, wobei die Verwendung von sechs längeren Verbindungskanälen eine Verschiebung der Strömung zur rechten Seite und damit eine geringere Blasenanfälligkeit für die rechte untere Ecke des Kulturbereiches erreichen sollte.

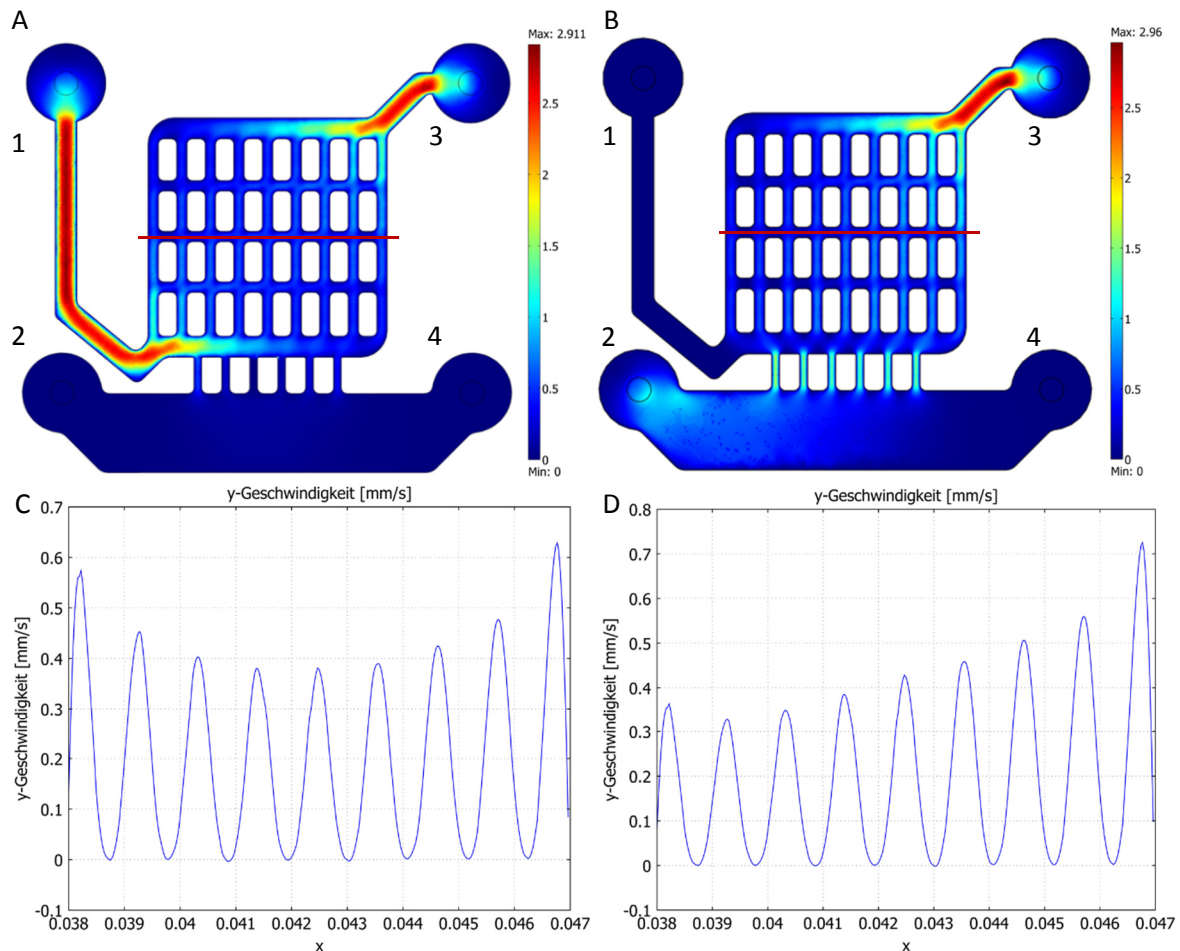


Abbildung 4-13: 3D-COMSOL Simulation der Strömungsverteilung in mm/s.

System mit 500 μm Kanalhöhe und 1000 μm Speicherhöhe (4A-Sg). A: Fluidiksystem mit Injektionsgeschwindigkeit von 1 mm/s (0,63 mm² Einlassfläche) am Eingang und Ausgangsdruck von 1016 hPa, Strömung von Einlass 1 zu 3; B: mit Fluidstrom von 2 nach 3; C: Strömungsverteilung von A entlang der roten Markierung in vertikaler Richtung; D: Strömungsverteilung in vertikaler Richtung von B (rote Markierung); x-Achse in m.

Die Simulationen waren für die Konzeption der Strömungsverteilung sinnvoll, konnten die Probleme durch die Blasen (Bildung, Bewegung) im System aber nicht beschreiben. Diese Problematik konnte nur experimentell gelöst werden. Während der Verwendung der Systeme zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Komplexität der Strukturen und der Häufigkeit der Blasenbildung. Dies war der Grund warum eine Variante ohne Blöcke gefertigt wurde. In ihr konnten Zellen auch über längere Zeiten kultiviert werden, da die entstehenden Blasen relativ problemlos ausgespült werden konnten. Der Verzicht auf die Blöcke reduzierte die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte und die Länge der Kontaktflächen von Zellen mit PDMS. Dies führte zu geringeren potentiellen Angriffspunkten durch die hohe Strömung bzw. durch die daraus hervorgerufenen Scherkräfte und verringerte die Anzahl der Ansatzpunkte für die Blasenbildung oder Blasenfestsetzung. Trotz allem bildeten sich in der oberen linken und der unteren rechten Ecke des Kulturbereiches weiterhin Blasen die sich nicht entfernen ließen.

Während sich Blasen im Kulturbereich häufig festsetzten, waren die sich bildenden Blasen im Speicher überwiegend leicht zu entfernen. Die Beobachtungen im Speicher zeigten, dass neben der einheitlichen Form und den damit einhergehenden sehr

homogenen Flüssen die Höhe des Systems von Relevanz zu sein scheint. Denn mit Erhöhung des Speichers von 500 μm auf 1000 μm löste sich das Problem im Speicher.

Der Speicher war erhöht worden, um bei Injektion der Zellen über dem linken Speicheranschluss und rechten oberen Auslass des Systems (2 \rightarrow 3), Blasen abfangen zu können. Dies erwies sich als erfolgreicher Ansatz, da zumindest die größeren Blasen im Speicher verblieben. Kleinere Blasen wurden weiterhin in den Kulturbereich gespült, konnten aber durch Ankippen in die Nähe des Ausgangs getrieben werden, sodass sie bei dem nächsten Mediumwechsel aus dem System herausgedrückt wurden. Die im Speicher verbliebenen Blasen ließen sich durch leichtes Erhöhen der rechten Seite des Systems oder Öffnen des Anschlusses Nr. 4 herauspülen.

Entsprechend den gewonnenen Erkenntnissen wurde für die Zellkultur eine Vergrößerung der Fluidik bzw. eine Erhöhung angestrebt. Dies steht aber im Gegensatz zu dem Anspruch die physiologischen Parameter zu überwachen. Ein größeres Volumen führt zu trägerem Verhalten des Systems durch höhere Mengen an Sauerstoff, Nährstoffen und pH-stabilisierenden Substraten. Die Alternative bestand in einer Veränderung der Fluidikstruktur, um Bereiche mit herabgesetzten Strömungsgeschwindigkeiten oder andere blasenbildungsfördernde Strukturen zu vermeiden.

4.3.1.3 Fluidikentwicklung für das Stimulationssystem

Die Entwicklung der Systeme sollte den gewonnenen Erfahrungen aus den GeSiM-Varianten Rechnung tragen. Die Blasenproblematik sollte minimiert werden, eine Beaufschlagung mit mechanischen Stimuli implementiert und die Handhabung sollten verbessert werden. Von Anfang an wurde die Konstruktion so ausgelegt, dass die Verwendung von kommerziell verfügbaren 3D-Scaffolds in den Systemen möglich ist. Die Höhe des Systems, sowie die Strukturen im Kulturbereich sind durch den variablen Deckel leicht modifizierbar, wodurch die Flexibilität, Reinigung und die Nachnutzungsmöglichkeiten verbessert werden. Die Zuleitungen sowie der Übergang bzw. die Form der Kulturfläche wurden zudem vereinfacht. Die Höhe des Kulturbereiches bzw. die Höhe der PDMS Strukturen die den Abstand definieren sollte 250 μm betragen, um das durch die Zellen anzusäuernde Volumen zu reduzieren.

4.3.1.4 Simulation der SLV Systeme

Primäre Anforderung war eine möglichst homogene Verteilung des Mediumstromes im System, um die Bildung oder Festsetzung von Blasen zu verhindern. Der erste Entwurf war darauf fokussiert große Bereiche für die Zellkultur zu schaffen, in die später auch ein entsprechendes 3D-Scaffold eingesetzt werden kann. Über verteilte Blöcke sollte die gleichmäßige Verteilung des Mediumstromes sichergestellt werden (Abbildung 4-14 A). Nach der Fertigung zeigte sich, dass sich trotz hoher Strömungsgeschwindigkeiten die durch Spritzeninjektion bzw. durch schnelles Pumpen erreicht wurden, Blasen in den schmalen Bereichen festsetzten oder in den Flächen zurückgehalten wurden. Dieses Verhalten entsprach den bereits zuvor in den GeSiM-Systemen beobachteten Problemen.

Da die Einbringung eines 3D-Scaffolds aufgrund der Probleme mit der Zellkultur auf den Scaffolds nicht weiter verfolgt wurde, lag der Fokus danach auf der homogenen Verteilung des Mediumstromes. Hierfür wurden im zweiten Ansatz längliche Strukturen getestet, welche möglichst wenig Angriffsfläche und eine Gleichverteilung des Mediumstromes erreichen sollten (Abbildung 4-14 B). Der Mediumfluss verteilte sich gleichmäßig im System und die Strömungen folgten direkt dem Druckgefälle, wobei die Strömung in der horizontalen Richtung mit zunehmendem Abstand von der zentralen Achse (definiert durch die Verbindung der beiden Einlässe) zum Rand hin abnahm. Die länglichen Strukturen hatten aber nur minimalen Einfluss auf dieses Verhalten. Die experimentellen Versuche mit diesem Konzept stimmten mit den Simulationen überein. Die sich vereinzelt ansammelnden Luftblasen konnten durch leichten Druck auf den Deckel abgelöst bzw. einfach ausgespült werden.

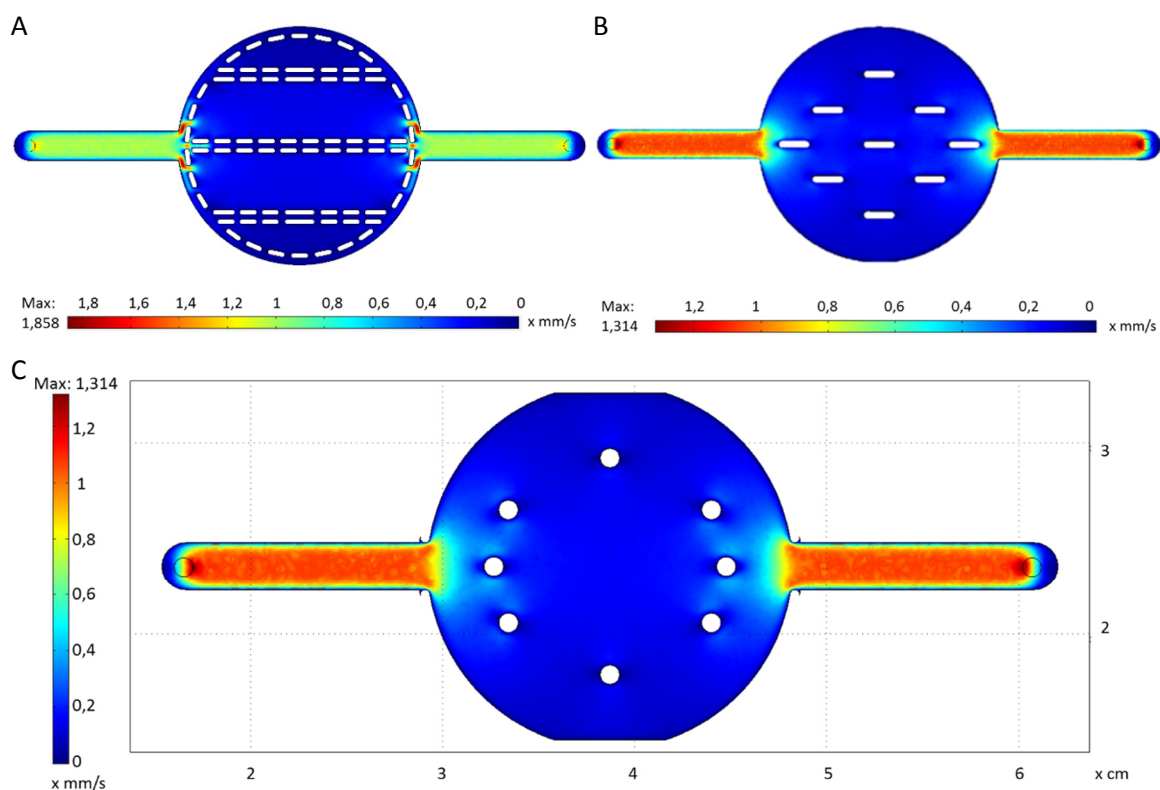


Abbildung 4-14: 3D-Fluidiksimulationen für die Stimulationssysteme mit 250 µm Höhe.

Einströmgeschwindigkeit am Eingangsanschluss 1 mm/s (Linker Kreis) und 101.600 Pa Druck auf Ausgangsanschluss (rechter Kreis) Darstellung des Strömungsgeschwindigkeiten in mm/s. A: Erstes Konzept mit kleinen Blöcken zum Einschluss eines 3D-Scaffolds. B: reduzierte Version mit länglichen Abstandshaltern zur Homogenisierung des Mediumstromes. C: Finale Variante mit kreisförmigen Abstandshaltern im Kulturraum und Außendichtung (500µm).

Die letzte und finale Variante vereinfachte diesen Ansatz durch die Verwendung von runden Pfosten als Abstandshalter, welche nur durch ihre Position eine leichte Veränderung der Strömung zu den Randbereichen hin bewirkten (Abbildung 4-14 C). Der Verzicht auf einen zentralen Pfosten war notwendig, um im Zuge der mechanischen Stimulation bzw. zur Blasenentfernung, den Deckel in der Mitte eindrücken zu können. Dies war auch vorher schon möglich gewesen, aber bei konfluenten dichten Zellrasen führte dies durch die Verbreiterung bzw. Verschiebung des Pfostens zu Abrissen der Zelllayer. Das System wurde durch einen Rand zur Seite noch besser abgedichtet. Der Rand aus 500 µm

breitem PDMS sollte darüber hinaus sicherstellen, dass durch das Verschrauben die Außenbereiche des Deckels nicht auf den Zellen auflagen. Die Experimente bestätigten die Simulationen, die Verschiebung der Pfosten bei Eindrücken des Deckels war minimal. Die Pfosten waren zwar noch Angriffspunkte für Blasen diese sammelten sich aber häufiger im Randbereich wo die Strömungsgeschwindigkeit geringer war.

4.3.2 Fertigung von Kultursystemen

4.3.2.1 Fertigung der Gehäuse für die GeSiM-Chips

Für die Bezeichnung der Gehäuse wurde statt Version auf das englische „Mark“ mit einer Versionsnummer zurückgegriffen, um Verwechslungen mit den Chipsystemen zu vermeiden. Die Gehäuse wurden zuerst aus PMMA gefertigt, da das Material sehr gute Bearbeitungseigenschaften zeigte. Bedingt durch die Schneidlänge der Fräser betrug die Maximaltiefe und somit die Dicke der zu bearbeitenden Platten 8 mm. Welche bei entsprechender Auslegung und Verwendung von 3 mm Fräsern zum Ausschneiden des fertigen Gehäuseteiles beim Mark 3 (siehe Abbildung 4-16) auf bis 10 mm erhöht werden konnte. Die ersten Varianten ersetzten nur die Halterung von GeSiM (Abbildung 4-15).

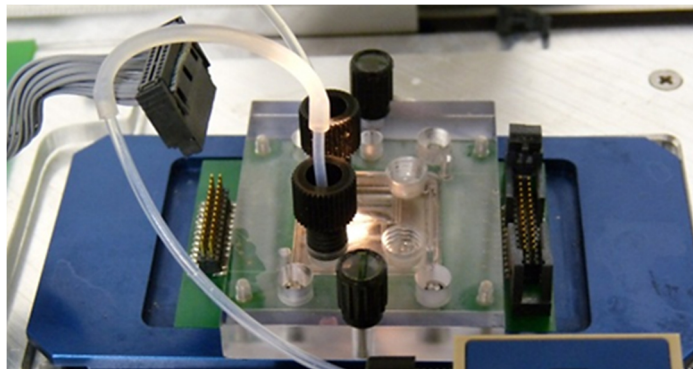


Abbildung 4-15: Das GeSiM-Standardssystem für die Verwendung mit 22x27 mm² großen Chips.

Blau: Chiphalter mit Andruckvorrichtung, durchsichtiges Oberteil mit Fluidik und Fluidikanschlüssen. grün: Platine mit Federkontakten.

Das erste von GeSiM-Komponenten unabhängige System war das **Mark 2**, welches in Abbildung 4-16 A dargestellt ist. Das System orientierte sich noch stark am GeSiM-System, konnte aber eigenständig gefertigt werden, da es keiner Komponenten von GeSiM mehr bedurfte. Zudem wurde keine offene Elektronikplatine mehr verwendet, wodurch es auch in der Zellkultur (Brutschrank) einsetzbar war. Es bestand aus dem Unterteil (grau) und dem Deckel (blau) versehen mit einem kreisförmigen Ausschnitt durch den mikroskopische Beobachtungen möglich waren. Der verbleibende Steg war 1,5 mm dick und die Tiefe betrug 6,5 mm. Das Unterteil hatte eine 25 x 25 mm² große Aussparung, um die stereolithographisch gefertigte Gussform (ca. 2,5 mm hoch) einsetzen zu können (Abbildung 4-17). Dies war notwendig, um Fertigungstoleranzen und das Fehlen eines gefederten Unterteiles, wie es bei der GeSiM-Halterung vorhanden war, zu kompensieren. Durch das Gießen der Fluidik in den jeweils zusammengehörenden Ober- und Unterteilen konnten die Fertigungstoleranzen ausgeglichen werden. Die fluidische Anbindung erfolgte dann durch manuelles Anbohren der Deckel von der Oberseite und dem Schneiden der ¼-28“ Gewinde für die Konnektoren und Luer-Adapter.

Die Weiterentwicklung zum **Mark 3** bestand in einer Vereinfachung der Struktur von Deckel und Unterteil sowie einer damit einhergehenden Verstärkung des freiliegenden Steges auf 2 mm, um dessen Stabilität zu erhöhen (Abbildung 4-16). Hinzu kam die Aussparung zum Herausführen der flexiblen Leiterplatten (Flex-Platinen).

Aufgrund von Materialbrüchen besonders auf Höhe der Schrauben und dem Wunsch die Fluidik variieren zu können, wurde das System zum **Mark 4** weiterentwickelt. Dieses System war größer, um die Anschlüsse seitlich ansetzen zu können und die Schlauchverbinder aus dem mit dem Mikroskop einsehbaren Bereich zu versetzen. Die Vergrößerung des inneren Bereiches ermöglichte die Nutzung des Systems für die Nutzung eines austauschbaren Fluidikträgers mit der PDMS Mikrofluidikstruktur.

Der Fluidikträger ermöglichte die Entfernung des PDMS für die Reinigung der Fluidik bzw. den einfachen Tausch der PDMS-Mikrofluidik. Die Nutzung von 4 Schrauben verteilte zudem die Spannungsbelastungen besser.

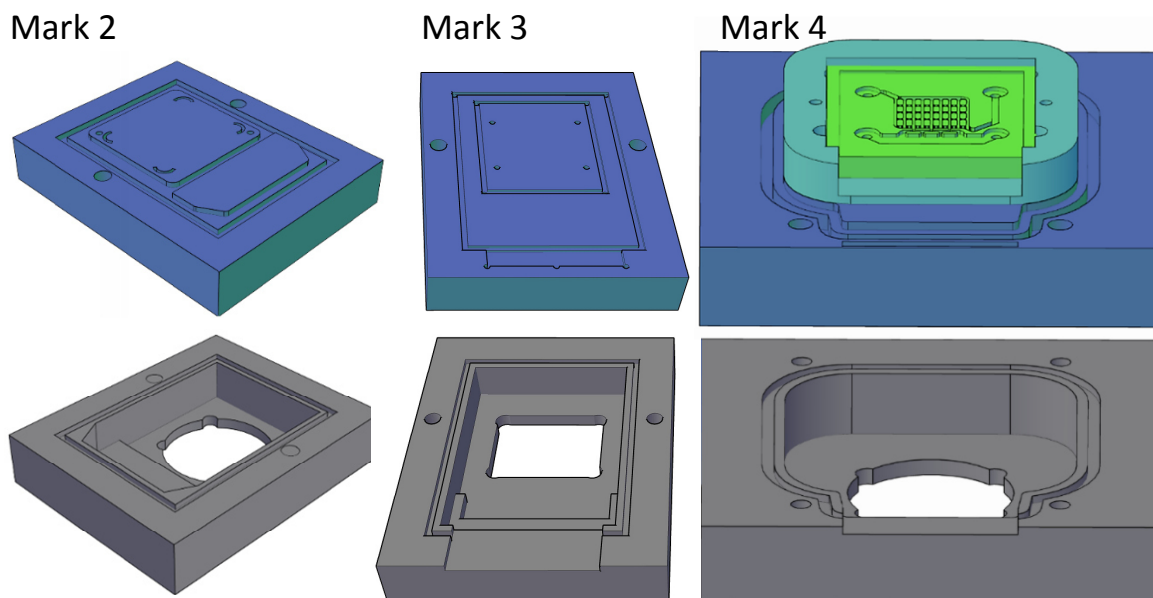


Abbildung 4-16: Verschiedene Versionen der Gehäuse für die GeSiM-Chips.

Blau Deckel, grau Unterteil der Systeme, Systemvariante Mark 2, Adaption für das GeSiM-System; Systemvariante Mark 3 für die Verwendung mit Flexplatine; Variante Mark 4 für die Verwendung mit 2D- und 3D-Systemen und getrenntem Fluidikträger (türkis) und PDMS-Fluidik (grün)

Die späteren Systeme **Mark 3** und **Mark 4** konnten aufgrund des einfacheren Aufbaus auch in Polycarbonat (PC) gefräst werden, wodurch die Systeme widerstandsfähiger wurden. So zeigte sich bei der längeren Handhabung der PMMA Systeme eine massive Ausbildung von Mikrorissen, Verfärbung des Materials und zum Teil sogar strukturelle Brüche. Die Ursache war die Anfälligkeit des Materials gegenüber den Reinigungsmitteln. Bei der Verwendung der 70%igen Ethanol-Lösung (in Aqua dest.) war es sehr ausgeprägt, wobei das Keton zur Vergällung das Hauptproblem zu sein schien. Die Mikrorisse bildeten sich vor allem an bearbeiteten Zonen, wahrscheinlich durch Spannungsrisse infolge der durch die Ethanolverdunstung hervorgerufenen Abkühlung. Weitere Probleme verursachten die Mikrorisse für die Mikrofluidik. Die durch die Mikrorisse hervorgerufene

raue Oberfläche in den Zuleitungsbereichen sowie die Undichtigkeiten an den Anschlussbereichen förderte das Auftreten von Blasen in der Mikrofluidik.

Die meisten der Probleme, sowie auch die fehlende Möglichkeit zur Dampfsterilisation konnten mit der Verwendung von PC reduziert bzw. beseitigt werden, weswegen die Systeme danach aus PC gefertigt wurden. Ein Nachteil war die weichere Oberfläche, sodass die Systeme schnell Kratzer aufwiesen.

Die Zellkultursysteme ab dem **Mark 2** waren für die Zellkulturexperimente im Brutschrank verwendbar und während ihrer Weiterentwicklung konnten erhebliche Fortschritte in der Benutzerfreundlichkeit gemacht werden. Sehr deutlich zeigte sich, dass die Auswahl des Polymers wesentlichen Einfluss auf die Nutzbarkeit hat. Wichtig besonders für die Nutzung durch Dritte sind die Reduktion der Komponenten und die Vereinfachung des Handlings. Zu dem Aspekt der Fluidikanbindung sei auf den Abschnitt 4.5 verwiesen. Die größten Schwächen der Systeme waren Ihre partielle Undichtigkeit bei höheren Drücken oder unzureichend fester Verschraubung, die Kompression der Fluidik bei zu starkem Anpressdruck und das Zerbrechen der Chips durch verkanten bzw. inhomogene Druckverteilung. Dies waren fertigungstechnisch zu berücksichtigende Aspekte, welche maßgeblich das Konzept des SLV-Systems beeinflussten.

4.3.2.2 Gießen der Mikrofluidik

Die vom Institut für Polymertechnologien e.V. (IPT) gelieferten Gussformen hatte eine Basishöhe von etwa 2,5 mm zu der dann noch eine 300 µm hohe Aussparung zur Justierung des Chips (quadratische Erhöhung) sowie die eigentliche Mikrofluidikstruktur kam (siehe

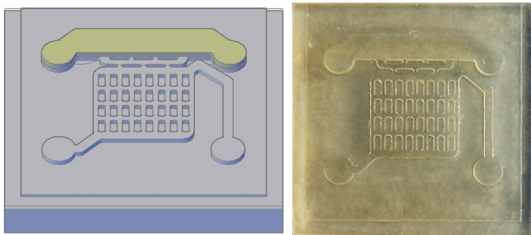


Abbildung 4-17: Darstellung der Gußform.

Links: CAD Design mit Erhöhung zur Führung des Sensorchips, Rechts: Stereolithographisch gefertigte Gußform

Abbildung 4-17). Diese hohe Dicke war notwendig, weil das relativ weiche Material sonst nicht vom Arbeitstisch abgelöst werden konnte. Dies erschwerte die Nutzung der von GeSiM gelieferten Komponenten für den Mikrofluidikguss. Die Unebenheit der Unterseite war zusätzlich problematisch, weil diese glatt geschliffen werden musste, wodurch die Basishöhe verändert wurde. Für die Eigenentwicklungen (Mark 2, Mark 3)

musste die Fluidik anders gegossen werden. Bedingt durch die Ungenauigkeit des Fräsbohrplotters variierten die Systeme in der Tiefe. Dazu kam die Notwendigkeit einen möglichst gleichmäßigen und reproduzierbaren Anpressdruck zu erzeugen.

Das Neudesign der Systeme, sodass sie den Stempel aufnehmen konnten, neutralisierte die Fertigungstoleranzen da die Höhe des PDMS über der Fluidik diese Abweichungen ausglich. Dies aber bedeutete, dass die Deckel und die Unterteile nicht frei getauscht werden konnten. Für das Gießen der Fluidik wurde der Stempel in das System gelegt und dieses wie beschrieben ausgegossen. Nach Entfernen des Stempels wurde der freie Platz durch eine klare PMMA bzw. PC Platte von 3 mm ersetzt. Da die Platte

ca. 500 μm höher war als der Stempel ohne die Fluidik und Justierausparung, wurde der PDMS-Block (siehe Abbildung 4-16 grüne Struktur) 500 μm dicker als benötigt. Wurden die beiden Teile miteinander verschraubt bis sie auflagen wurde der gesamte PDMS-Block um maximal 500 μm Höhe komprimiert, wodurch der benötigte Anpressdruck erzeugt wurde.

In der Handhabung wurde ein Teil des Anpressdruckes von der Dichtung abgefangen. Die Abdichtung des Systems wurde grundsätzlich unter dem Mikroskop kontrolliert und die Schrauben nur so fest angezogen, dass die Auflageflächen des PDMS aufgrund des Anpressens auf dem Chip, über die gesamte Fläche klar wurden. Aufgrund des dennoch teils starken Anpressdruckes rissen einige Systeme oder es wurden die Gewinde schnell abgenutzt. Gründe für auftretende Undichtigkeiten waren neben den Produktionsabweichungen, der Verschleiß der Systeme oder Kapillareffekte welche das Medium in den Zwischenraum zwischen Chip und PDMS zogen. Durch das ausschließliche Aufliegen des PDMS waren die Systeme auch nicht sehr druckstabil. Obwohl sie in der normalen Handhabung dicht waren, konnte selbst das Hochstellen des Mediumreservoirs bereits Undichtigkeiten herbeiführen. Die Kapillareffekte sind mit Sicherheit auch auf die Mikrostruktur der Gussformen zurück zu führen, welche eine geringe aber erkennbare Grundrauigkeit aufwiesen.

Diese Probleme sollten durch die Fertigung sehr glatter Gussformen, durch eine Verklebung des PDMS mit dem Chip oder dem Verbreitern der Dichtungsflächen gelöst werden. Ansätze die für die SLV Systeme umgesetzt wurden.

4.3.2.3 Fertigung der SLV-Systeme

Die Systeme konnten aufgrund der einfachen und relativ großen Strukturen in Polycarbonat (PC) gefräst werden (Abbildung 4-18). Mit 8 mm Dicke erreichten die Systeme die maximale Fertigungstiefe für den Fräsbohrplotter. Der Torso, also das Element welches mit der PDMS-Fluidik auf den Chip geklebt wird, wurde von oben mit Fräsern verschiedener Größen, von 1 mm (Bohrungen), 1,5 mm (Ausparungen) bis 2 mm (zum Heraustrennen) gefräst. Die kleineren Löcher, welche nicht für die Verschraubung vorgesehen sind (z. B. im Kreis oder am Rand), dienen als Luftauslässe für das Gießen des PDMS und einer besseren Verbindung zwischen PDMS und Torso. Die Tiefe des zentralen Ausschnittes zur Aufnahme des Deckels betrug 6,5 mm bis zur unteren Dichtfläche. Der untere breite Steg (Bereich mit radial angeordneten Löchern) sollte mindestens eine Stärke von 1,5 mm besitzen um die Kräfte durch das Andrücken des Deckels aufzunehmen. Bei ausschließlicher Verwendung von PDMS als Dichtungsmaterial würden die Kräfte beim Festziehen des Deckels den Chip sonst herausdrücken oder zerbrechen. Die experimentellen Arbeiten zeigten, dass die Dicke von 1,5 mm für PC ausreichend war, aber bei fest angezogenen Deckeln eine leichte Ausbeulung der Unterseite entstehen konnte, welche möglicherweise an den schmalen Stellen des Systems zu Undichtigkeiten führte. Die Auflage an dieser Position war aufgrund der schmalen Dichtungsfläche somit die größte Schwachstelle.

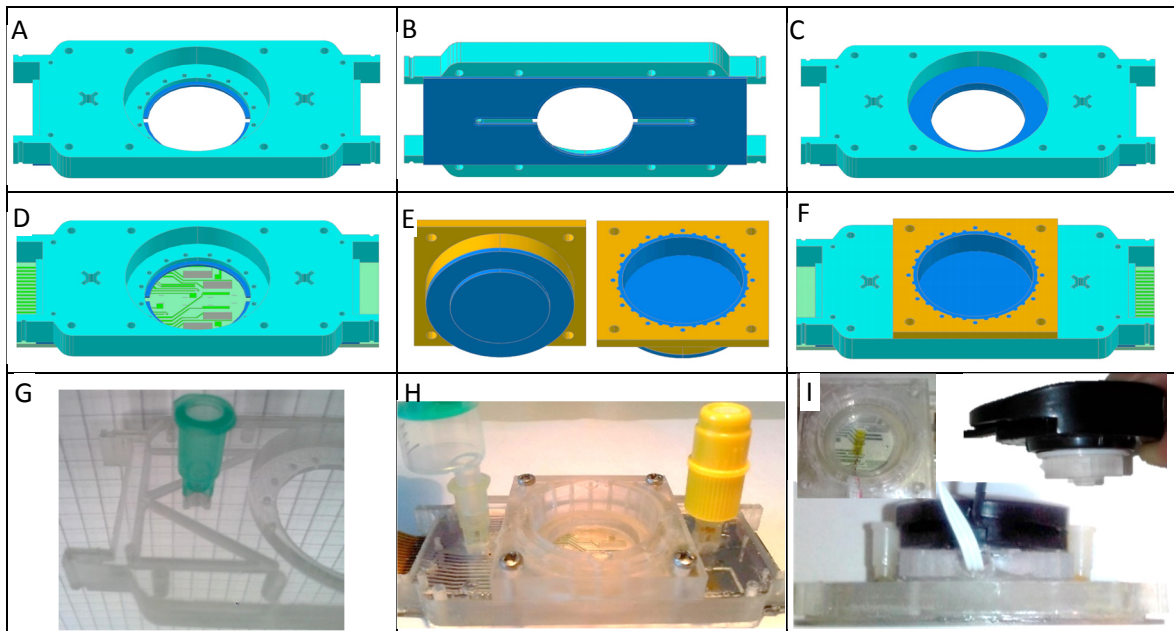


Abbildung 4-18: Darstellung der Zellkultursysteme für die Stimulation (SLV-System).

Türkis: PC-Torso; blau: PDMS Strukturen, grün: Chip mit Strukturen. Orange: Deckel aus PC. A: Torso mit unterliegender PDMS-Fluidik; B: Unteransicht von A; C: Draufsicht mit PDMS-Dichtung; D: vollständiges System (dargestellt ohne Dichtung); E: Ansichten des Deckels; F: zusammengesetztes System; G: Gefrästes System mit nachträglich gefräster Haltestruktur und fixiertem Luer-Verbinder (Kanülenanschluss); H: Vollständig zusammengesetztes System mit Chip, Spritze und Kanülen-Injektionskappe auf den Lueranschlüssen sowie Flexplatine (linke Seite) für die elektrische Anbindung; I: System mit in Deckel integriertem Dehnungsmesstreifen (Nahansicht, links oben) und mechanischem Aktuator (Nahansicht mit Verlängerungsstück, rechts oben).

Die Anschlüsse für die Fluidikversorgung wurden mit kreuzförmigen Aussparungen versehen, in die mit leichtem Druck die Vorderseite der Lueranschlüsse von 1,1 bzw. 0,9 mm Kanülen (Außendurchmesser) eingesetzt werden konnten. Die Kanülen wurden vorher auf 1 mm gekürzt und die der Plastikteil mit Klebstoff versehen.

Die kreuzförmigen Aussparungen waren eine Konsequenz aus den Versuchen mit den GeSiM-Systemen. Die vorherigen Experimente hatten gezeigt, dass Spritzenkanülen in vielfacher Hinsicht die einfachste und handhabbarste Lösung waren. Da die einzelnen Kanülen aber sehr leicht herausgerissen oder gedreht werden konnten, war eine bessere Fixierung notwendig. Durch die kreuzförmige Aussparung wurde die Kanüle gegen Verdrehung fixiert. Dadurch mussten Luer- und Luer-Lock-Verbindungen nicht durch Ziehen gelöst werden, sondern die Gegenstücke konnten gedreht werden, bis sie sich lösten. Weiterhin ließen sich sowohl Luer als auch Luer-Lock-Verbinder problemlos anschließen und die Drucktests zeigten keine Leckagen an den Verbindungen. Die aufgrund der Blasenbildungsneigung problematischen Toträume der Luer-Verbinder konnten durch Ausgießen mit PDMS minimiert werden (Abschnitt 3.7.3).

Der große Abstand der Anschlüsse zum Kulturbereich war bedingt durch den Platzbedarf des Deckels und des vorgesehenen Aktuators. Eine weitere Verschiebung zu den Rändern könnte realisiert werden, wobei der Abstand zum Rand und damit die Dichtflächen weiter reduziert werden müssten. Der Abstand war für die Arbeiten ausreichend, so konnte ein Großteil des Systems mikroskopiert werden, selbst wenn auf einem der Zugänge eine Spritze steckte. Dies ist im Zuge der kontaminationsfreien Handhabung ein wichtiger Aspekt.

Die Deckel wurden zu Anfang aus 6 mm PMMA gefertigt. Ihre Dicke musste aber auf 8 mm erhöht werden, da sie sonst beim Festschrauben verbogen oder an den Bohrungen sogar brachen. Die Deckel-Torso-Verbindungen waren aufgrund der großen Dichtfläche auch bei leichter Verschraubung schon dicht; wahrscheinlich weil beide Seiten aus PDMS bestanden. Das Konzept des austauschbaren Deckels war somit sehr erfolgreich, da auch immer noch die Möglichkeit zur Modifikation der Fluidik bestand, bzw. aufgrund der Größe auch ein Halter für Ko-Kultur-Einsätze verwendet werden kann.

4.3.2.4 Gießen der Mikrofluidik für die SLV-Systeme

Für den Guss der Mikrofluidik des Torsos war neben der Form für die Unterseite ein Oberteil notwendig, welches die Öffnung für den austauschbaren Deckel verschloss.

Wegen der schlechten Bearbeitbarkeit des Teflon wurde die Form für die Unterseite aus PMMA gefertigt, wobei die Struktur 500 μm tiefer war als notwendig. In diese Vertiefung wurde eine ausgefräste Folie aus 500 μm PMMA eingeklebt, welche dieselbe Kontur hatte wie die zu erzeugende PDMS-Fluidik. Das war notwendig, weil die Erfahrungen mit den vorherigen Systemen gezeigt hatten, dass die Unebenheiten der Frässpuren zu Undichtigkeiten an der Chip-PDMS Grenzfläche führen können. Die ebene Oberfläche der Folie sollte zu einer sehr gleichmäßigen PDMS Oberfläche führen.

Dies funktionierte auch grundsätzlich wobei die Folie aber aufgrund von Spannungen an den Kanten leicht hoch gebogen war. Dadurch entstanden Höhenunterschiede im PDMS, die zu Leckagen führen konnten. Die Oberfläche war in einzelnen Fällen so glatt, dass alleine durch das Auflegen des Torsos auf den Chip die Fluidik dicht war. Die Adhäsion des PDMS zur Folie während des Gießens führte aber zum Abreißen bzw. Herausbrechen der Folie bei der Trennung des Torsos von der Form. Um dieses Problem zu lösen, bedarf es einer verbesserten Technik zur Fertigung der Abformwerkzeuge (siehe Bonk *et al.* [248]).

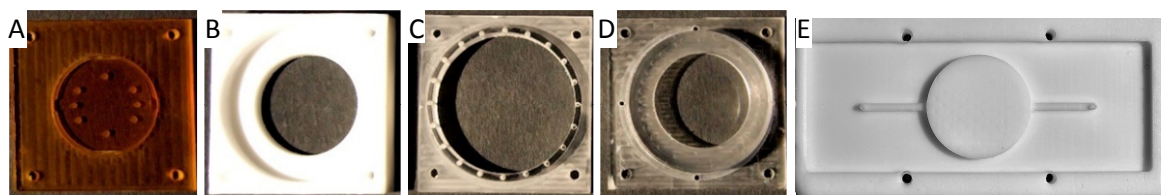


Abbildung 4-19: Formwerkzeuge für den Guss der Mikrofluidik.

A: Abschlussstück mit Negativ der Fluidik im Kulturbereich (oranges PMMA), B: Unterteil aus Teflon für den Guss des Deckels, C: Halteelement aus PC; D: Oberteil aus PMMA zur Definierung der Oberseite der Deckels, E: Form aus Teflon für die Fluidik des Torsos mit Löchern zur Fixierung des Torsos;

Zum Gießen der Fluidik im Deckel wurde der Torso auf die Form gelegt und mit Schrauben fixiert (Abbildung 4-19 E). Die Öffnung für die Deckel wurde von oben mit einem runden, der Unterseite des Deckels entsprechendem Abschlussstück verschlossen (nicht gezeigt). Aufgrund der einfachen Struktur konnte dieses Element aus Teflon gefertigt werden, was die Abtrennung nach Aushärten des PDMS erleichterte. Der zentrale Zylinder war 2 mm länger als das Gegenstück eines fertig gegossenen Deckels (Abbildung 4-18 E, blauer Teil). Lag das Abschlussstück auf der unteren Gussform entstand ein Zwischenraum, in welchen das PDMS durch die Löcher im Torso aufstieg und diesen ausfüllte. Dies bildete

den unteren Teil der Dichtung auf welcher später die Deckel auflagen (Abbildung 4-18 C, blauer Teil). Nach dem Aushärten des PDMS wurde die Form vom System gelöst, abgezogen und von unten das Abschlussstück herausgedrückt. Hier zeigte sich, dass trotz des Haftvermittlers auf dem PC das PDMS an den Randbereichen nicht sehr gut hielt. Es wurde versucht dies durch mehr Bohrungen zu kompensieren. In denen konnte das PDMS aufsteigen und somit eine bessere Verbindung zum Deckel etablieren. Zur weiteren Verbesserung der Verbindung wurde auf der Unterseite der zuletzt gefertigten Torsi eine 1 mm x 1mm tiefe Haltestruktur gefräst, in welche das PDMS aufsteigen konnte (K-förmige Struktur in Abbildung 4-18 G.). Dies erwies sich als sehr guter Ansatz, da das PDMS in diese Struktur floss und durch die Form ein weiterer Dichtbereich an der Grenzfläche PC zu PDMS entstand.

Für das „Ankleben“ auf dem Chip wurde ein Tropfen PDMS mit einem Messspatel auf der Unterseite des fertig gegossenen und mit Kanülen bestückten Systems verteilt. Überschüssiges PDMS auf der Fläche oder in den Kanälen wurde mit Druckluft entfernt. Das System wurde manuell auf dem Chip justiert und mit Klammern fixiert und das PDMS dann bei 80 °C für 1 h auspolymerisiert.

Die Fertigung der Formen für den Deckel stellte eine komplexere Herausforderung dar, weil die Einhaltung der Frästiefen wichtig und die Höheneinstellung eines des größten

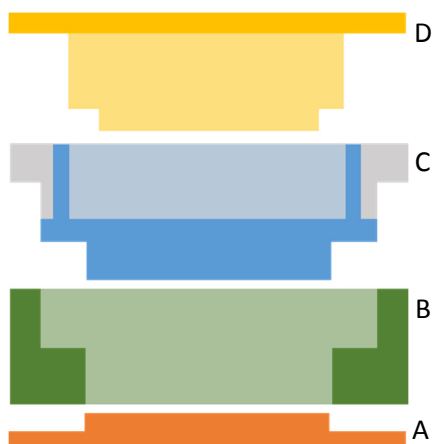


Abbildung 4-20: Schematische Darstellung der Gussteile aus Abbildung 4-19.

Gelb: Oberteil, Grün: Unterteil, Orange: die Fluidik definierendes Abschlussstück; Grau: PC-Deckel; Blau: PDMS, Buchstaben entsprechen Abbildung 4-19.

Probleme bei Verwendung des Fräsbohrplotters ist. Es mussten für die Deckel drei Gussteile gefertigt werden, deren schematischer Aufbau in Abbildung 4-20 dargestellt ist:

1. Das **Oberteil**, welches auf der Oberseite die Aussparung für die Aktuatoren frei hielt und die Dicke des PDMS über dem Kulturbereich, durch die Länge der in den Deckel ragenden Struktur (Abstandshalter) definierte;

2. das **Unterteil** für die Aufnahme des Deckels zur Formung der Dichtung und des zentralen Zylinders aus PDMS;

3. das abschließende **Bodenstück**, welches die Höhe und die Form der Mikrofluidik definierte.

Die beiden ersten Gussteile wurden nach Fertigstellung nicht weiter variiert. Das **Oberteil** wurde aus 12 mm dicken PMMA gefräst, das **Unterteil** aus 8 mm dickem Teflon. Aufgrund des von innen (unbearbeitet) nach außen stufenweise zunehmenden Materialabtrages war es bei dem Oberteil möglich die übliche maximale Bearbeitungstiefe des Fräsbohrplotters von 8 mm zu überschreiten. Für das Oberteil war die Verwendung von Teflon nicht möglich, da für die Mikroskopierbarkeit sehr glatte Oberflächen benötigt wurden. Das abschließende Bodenstück wurde aus einer 2 mm PMMA Platte gefräst (Abbildung 4-19 A). Aus dem Bodenstück wurde eine radiale Erhebung von 500 µm Höhe

freigestellt, um die Unterseite des Unterteils abzudichten. Eine Erhöhung über diesen Wert entspricht dann direkt der Höhe der zu erzeugenden Fluidik. Für eine 250 μm hohe Fluidik musste die Höhe somit auf 750 μm , für eine 500 μm hohe Fluidik auf 1000 μm erhöht werden.

Beim Zusammensetzen eines Systems ohne innere Strukturen zeigte sich im Mikroskop, dass die Höhe abhängig von der Verschraubung und dem System variierte. Die Ungenauigkeit des Fräsbohrplotters erschwerte zudem die Erzeugung von Strukturen in der gewünschten Tiefe. Messmikroskopische Messungen (MM-40, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) der gegossenen Strukturen ergaben Strukturhöhen von ca. 320 μm . Da die Strukturen in den geschlossenen Systemen leicht gestaucht wurden, muss dies als maximale Höhe angesehen werden. Da die optischen Sensorspots (Höhe laut Hersteller ca. 200 μm) im geschlossenen System keine Verformungen des PDMS erzeugten, ist eine Minimalhöhe von >200 μm wahrscheinlich.

Die Fertigung der Mikrofluidik war trotz der technischen Einschränkungen möglich. Die Strukturen ließen sich gut abbilden und die Tiefenschwankungen lagen im niedrigen zweistelligen μm -Bereich. Die Trennung von zuführender Fluidik im Torso und der durch den Deckel definierten Fluidik im Kulturbereich, erwies sich als gut realisierbares Konzept. Das Abdichten der Systeme durch Verkleben der Chips mit der Fluidik war effektiver als das Abdichten durch Druck wie es in den GeSiM-Systemen zur Anwendung kam.

Die zum Teil geringe Adhäsion am PMMA wird auf fertigungsbedingte Parameter (Trennmittel, Charge) zurückgeführt, da alle Systeme vor dem Gießen mit Ethanol und Destwasser gereinigt wurden. Auch Sauerstoffplasmabehandlung zeigte bei den problematischen Einheiten keinen Effekt, weshalb nachträgliche Verunreinigungen (z. B. Hautfett, Reinigungsmittel) ausgeschlossen werden können. Die Güte der Verbindung zwischen Chip und PDMS variierte ebenfalls erheblich. Die Schwachstelle an den, dem Kulturbereich nächstliegenden Rändern konnte durch Verstärkung des Steges unterhalb der Dichtung beseitigt werden.

Die größten Schwachstellen waren die Flächen der Chips um die Einlässe. Gründe hierfür waren neben den Unebenheiten der Form wahrscheinlich die ungleichmäßige Druckverteilung während des Gießens. Diese machte sich durch baumartige Muster im PDMS bemerkbar. Eine Erhöhung der aufgetragenen PDMS Menge war nicht möglich, weil das PDMS bei Erhitzen sehr flüssig wurde, dadurch in die Kanäle lief und diese verschloss. Nach einer erfolgreichen Verbindung waren die Systeme gut zu handhaben und behielten über mehrere Experimente (und Reinigungen) ihre Dichtigkeit. Bei Systemen die undicht wurden, konnte zudem eine Bodenplatte über die zusätzlichen Bohrungen im Torso zum Anpressen des Chips genutzt werden. Aufgrund der Größenabweichungen der Chips, die breiter waren als ursprünglich veranschlagt, konnten einige Schrauben nicht an dem jeweiligen Chip vorbei geführt werden, weshalb dieser Ansatz nur vereinzelt nutzbar war.

Ein weiteres bereits bei den GeSiM-Systemen angesprochenes Problem war die entstehende Spannung in den Chips durch die Verschraubung mit der Folge von Brüchen.

Das Fehlen einer adäquaten Fertigungsmethode, zur zeitnahen Herstellung von Formen mit hoher Oberflächengüte, stellte das größte Hindernis für die Herstellung von Fluidiksystemen dar. So sind viele der beobachteten Probleme durch bessere und genauere Abformwerkzeuge lösbar. Die Bearbeitungsspuren durch das Fräsen konnten nur eingeschränkt durch Nachpolieren entfernt werden. Deswegen war es wichtig Substrate mit glatten Oberflächen zu nutzen. Aufgrund der einfachen Designs waren die Bearbeitungsspuren am Rand der Fluidik oder den Strukturen vernachlässigbar, sie können aber trotzdem zur Blasenbildung beigetragen haben. Versuche die Formen für den Torso aus dünnen Folien zu fertigen, welche auf eine unbearbeitete glatte PMMA Platte aufgeklebt wurden, waren wenig erfolgreich. Die Klebstoffe führten zum Aufquellen des Materials oder waren schlecht zu handhaben. Zum Abschluss durchgeführte Versuche zur Fertigung von Abformwerkzeugen mithilfe des UKP-Lasers zeigten erste Erfolge und könnten ein sinnvoller Ansatz für die zukünftige Werkzeugfertigung sein (Anhang A5). Dies konnte aber in dieser Arbeit nicht mehr weiter verfolgt werden.

4.4 Elektrische Anbindung

4.4.1 Kontaktierung der Chips

Für die Anbindung der Sensorchips gab es zwei realisierbare Möglichkeiten. Die erste Variante besteht in der Nutzung von Kontaktstiften, die wie beim GeSiM-System auf den Chip aufsetzen und so die Verbindung zwischen Auswerteelektronik und den Chips herstellen. Diese Variante wurde aufgrund schlechter Erfahrungen mit den Neurochips des Lehrstuhls für Biophysik, sowie im Hinblick auf die Weiterentwicklung zum gestapelten 3D-System verworfen. Die Korrosion in der feuchten Umgebung des Brutschrankes, problematischer Schutz vor Verunreinigung, schlechter Schutz gegen auslaufendes Medium und die wiederholte korrekte Justierung sind wesentliche Nachteile dieses Konzeptes. Im Zuge der Entwicklung wurde dennoch für das SLV-System ein entsprechender Adapter entworfen, gebaut und getestet. Die Kontaktstiftvariante ist somit grundsätzlich ebenfalls nutzbar.

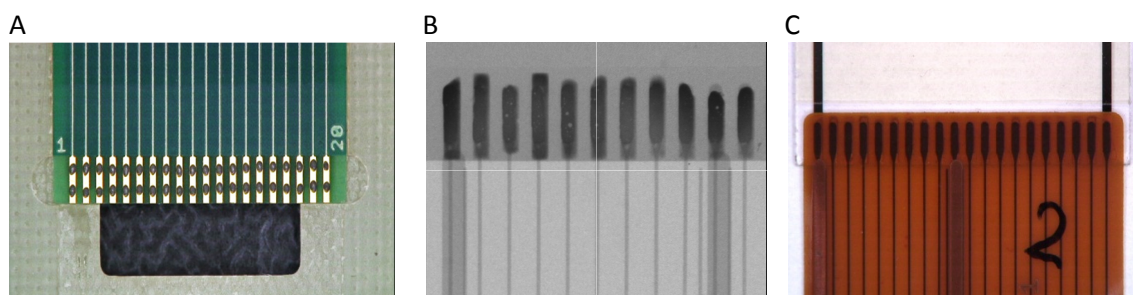


Abbildung 4-21: Kontaktbereich der Flexplatine zum Sensorchip.

In A ist beispielhaft ein Testchip (entwickelt von Dr. Carsten Taurat) in die Vorrichtung zur Kontaktierung und Verlotung eingelegt. B und C zeigen eine Röntgenaufnahme und das Lichtbild einer FPC-Kontaktstelle zum Glaschip. Kontaktierungen und Bilder wurden von der Firma EPSa GmbH angefertigt.

Die zweite Variante ist die Verlotung mit einer flexiblen Leiterplatte (Flexplatine) aus Kaptonfolie (Abbildung 4-21). Obwohl es die teurere Variante ist wurde sie favorisiert. Nach dem Verlöten der Kontaktstellen können diese versiegelt werden, sodass die Luftfeuchtigkeit oder austretendes Medium keine Probleme verursachen können. Die

Stecker, welche auf der Platine aufgelötet wurden, stellten dann eine sicherere und reproduzierbarere Steckverbindung zur Elektronik her.

Im experimentellen Betrieb zeigte sich, dass die Platinen den Ansprüchen genügten. Die Stabilität der Verbindungen gegen Zugkräfte war sehr hoch, die Flexplatinen konnten autoklaviert werden und beeinträchtigten die Handhabung nur unwesentlich. Nachteilig war, dass die Verbindung bzw. die Versiegelung nach einiger Nutzungszeit aufbrach, wodurch es zu Kurzschlüssen bzw. Störungen kommen konnte. Auch Leiterbahnbrüchen durch die Handhabung bzw. Alterung der Platinen traten auf. Die Flexplatinen störten nur beim Gießen der SLV Systeme wesentlich. Es wäre wünschenswert gewesen sie abnehmen zu können, auch um die Möglichkeit zur Nachbespülung der pH-Sensoren zu erhalten. Trotz dieser Einschränkung stellten die Flexplatinen die beste verfügbare Alternative dar.

4.4.2 Anordnung der Chip-Verbindungen

Die im Zuge des Fluxel-Projektes, für die V2R-Chips gewählte Anordnung der Sensorik wurde durchgehend verwendet. Für die V2R-Chips wurde von Dipl. Ing. Andreas Wenzel ein Multiplexerkonzept zur Anbindung an das Bionas-Messsystem entwickelt und gefertigt. Dieses System sollte auch für die V2-Chips und SLV Chips genutzt werden, weswegen die Anordnung soweit wie möglich übernommen wurde (Abbildung 4-22).

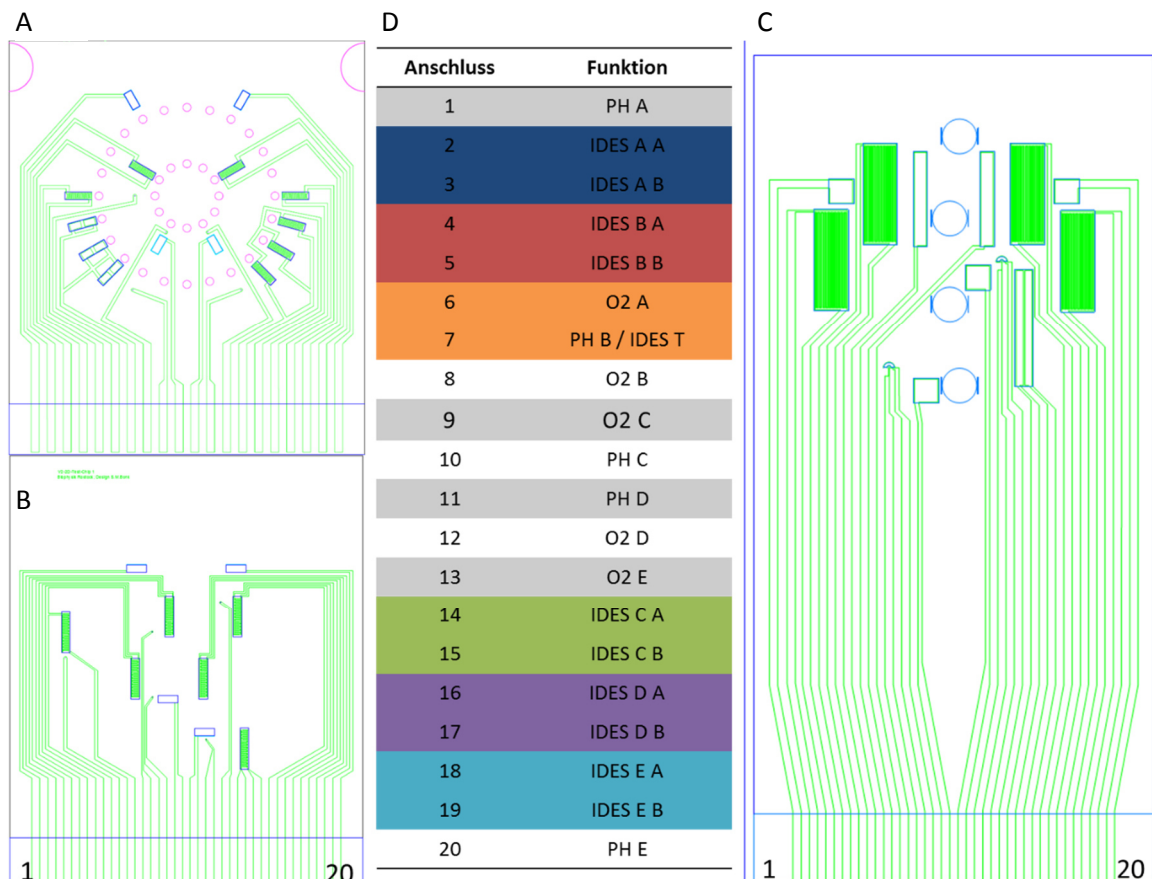


Abbildung 4-22: Anschlusszuordnung der verschiedenen Chipvarianten.

Die verschiedenen Chipvarianten für V2R-Chip (A), V2-Chip (B) und SLV-Chip (C) und entsprechende Zuordnung der Flexplatinenanschlüsse (D) Nummerierung der Kontaktierung von links nach rechts aufsteigend. In der Anschlussliste Grün und Orange markierte Bereiche sind optionale IDES-Anschlüsse verwendet für Teststrukturen oder Arrays.

Dadurch ergaben sich die entsprechenden Anschlussmuster, wobei sich die Anschlüsse 19 und 20 aufgrund Leiterbahnverlegung auf der Flexplatine vertauschten.

Der Aufbau des Boards und die Notwendigkeit es über das BIONAS-Messgerät mit Strom zu versorgen und anzusteuern, sowie der fehlende Support nach der Insolvenz der Bionas GmbH führten zur Abkehr von diesem System.

4.4.3 MUX-Anschlussplatinen

Um Zeitverzögerungen bei Lieferung und Anpassung der Software zu vermeiden, wurde statt des geplanten 8-fach MUX, der 60-Kanal-MUX von Sciospec verwendet (Abbildung 4-23 A). Für diesen existierte eine funktionierende Softwarelösung und er war vergleichsweise günstig.

Die hohe Anzahl an Ausgängen erhöhte die Flexibilität und ermöglichte die Weiterentwicklung des Systems. Es musste aber eine Adapterplatine geschaffen werden um den Anschluss der Chips zu ermöglichen. Infolge der Anzahl der Kanäle, der durch die PCB-Software (Target 3001 discover) auf 2-Lagen limitierten Layeranzahl und dem Wunsch das System nachträglich noch für andere Anwendungen nutzbar zu machen wurde die Anschlussplatine auf zwei Boards aufgeteilt (Abbildung 4-23 B,C).

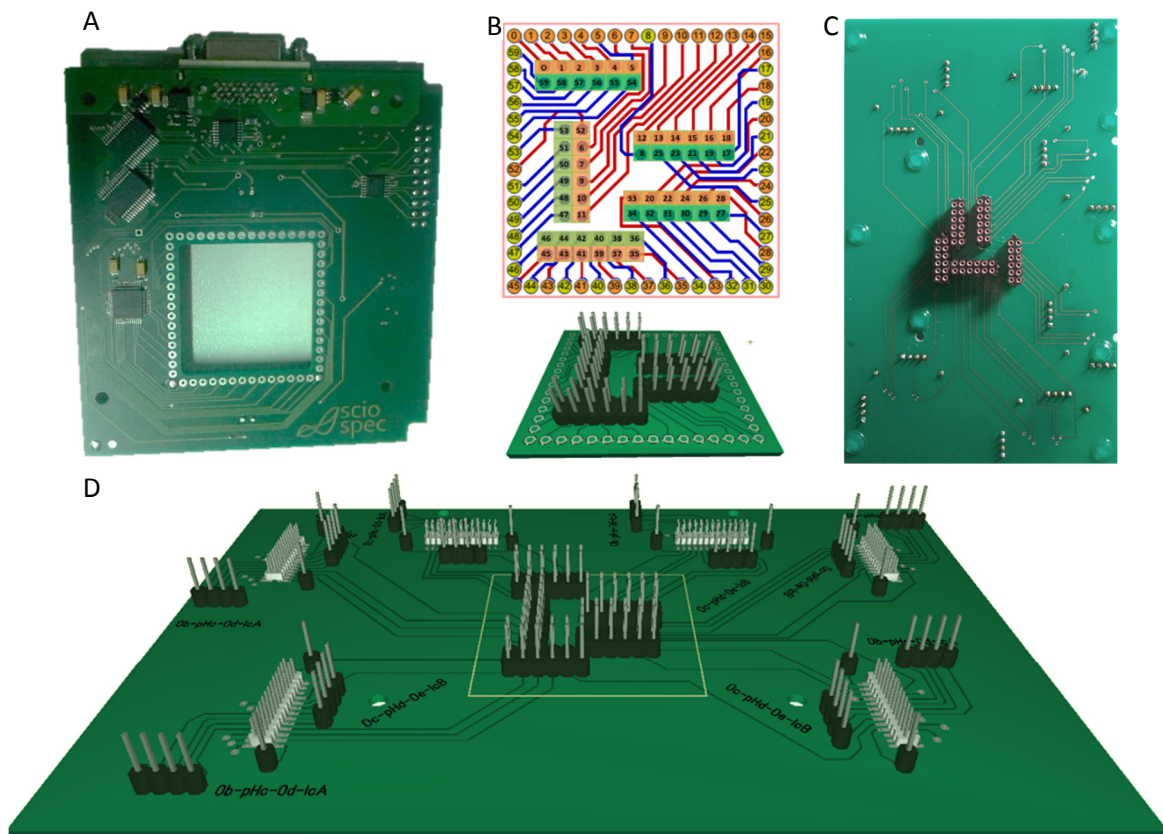


Abbildung 4-23 Adapterplatinen für ScioSpec-Messsystem

A: Multiplexer-Platine von ScioSpec, B: 3D-Darstellung der Übergangsplatine mit Belegung, C: Photo der Unterseite der Adapterplatine, D: 3D-Darstellung der Adapterplatine mit Pinleisten für die Chips (grau) und den Anschlusspins für das Palm-Sens MUX (mit Beschriftungen). Zentrale Buchsen sind aus Softwaregründen als Pins dargestellt.

Die erste Platine (Abbildung 4-23 B) diente dem Transfer der metrisch verteilten Anordnung der für MEA-Chips angeordneten Pin-Anschlüsse auf das übliche 2,54 mm Format (1 Zoll). Dadurch mussten die Pins weiter nach innen gelegt werden. Sie wurden zusätzlich vorgruppiert. Es wurde darauf geachtet, die Zuleitungen gegeneinander geschalteter Pins soweit wie möglich zu verteilen, um kapazitive Effekte oder Kurzschlüsse durch die Feuchtigkeit im Brutschrank zu verhindern. Das zweite Board (Abbildung 4-23 D) war als Verteilerplatine ausgelegt und konnte auf das fest angelötete Transferboard aufgesetzt werden. Es verteilte die Anschlüsse auf 6 Anschlussreihen, an welche die Flexplatinen angeschlossen wurden. Zusätzlich befanden sich auf der Platine weitere Pins über welche die pH und Sauerstoffelektroden der Chips an ein externes Messgerät (PalmSens-MUX) angeschlossen werden konnten (näheres siehe Anhang A6).

Bei dem notwendigen Verlöten der Übergangsplatine, kam es zu vereinzelt Ausfällen von Leitungen durch das Ablösen von Pads. So konnten 4 Sensoren nicht adäquat angesprochen werden. Die Kontrolle mit einer Testplatine welche die Sensoren simuliert, zeigte aber, dass die anderen Verbindungen nahezu identische Kurven liefern wie der direkte Anschluss an das Gerät. Die Platinen beeinträchtigten die Spektren somit nur unwesentlich.

4.4.4 Softwaregestützte Auswertung

Die Messungen mit dem Sciospec-Messgerät erfolgten im Advanced Mode, wobei jeder Sensor der Reihe nach gemessen wurde. Es wurden 40 Werte in logarithmischer Aufteilung über einen Frequenzbereich von 100 kHz bis 1 Mhz alle 6 h gemessen. Die Software speicherte je eine Datei pro Sensor in einem Ordner pro Messung. Die erzeugten Datensätze wurden dann über ein selbstgeschriebenes Auswerteskript verarbeitet (siehe Anhang A9). Das geschriebene Skript konnte zwar die Kurven und die Differenzen berechnen, die Auswertung lieferte aber fluktuierende Werte. Gründe waren die Designbedingten niedrigen Frequenzen der CPK-Werte und eine Vielzahl weiterer Einflussfaktoren. So sind die Anzahl an Chips, die Störanfälligkeit der Messung durch Pumpaktivität, die Brutschrankheizung, das Handling oder Luftblasen im System als mögliche Fehlerquellen zu nennen.

Selbst die Kultur kann durch partielle Ablösungen oder Kontaminationen unerwartete Signale erzeugen. Zudem sind die Systeme über mehrere Tage nur bedingt mikroskopisch kontrollierbar, da es die Kultur schädigt, es schwierig ist immer die gleichen Positionen zu beobachten und Kontaminationen zu Anfang nicht erkennbar sind.

Für automatische Messungen ist eine Vereinfachung des elektronischen Aufbaus, die Vereinheitlichung der Ansteuerung der Messsysteme und der Pumpen (Synchronisation) notwendig um die Fehlerquellen zu reduzieren. Eine bessere Nutzeroberfläche bzw. Softwarelösung welche eine kontinuierliche Auswertung ermöglicht um „life“-Daten der Kultur zu erhalten sind notwendig um es zu einem ZMS auch für mikroskopisch unzugängliche Systeme weiter zu entwickeln.

4.5 Fluidische Anbindung

4.5.1 Anschluss der Pumpen

Für die Mediumversorgung und die Bereitstellung eines zyklischen Messregimes mit regelmäßigem Mediaustausch und dazwischen liegenden Phasen ohne Mediumversorgung, sollten Peristaltikpumpen, wie sie auch im Bionas System verwendet wurden, genutzt werden. Dieser Pumpentyp ist durch Austausch von Schläuchen an verschiedene Strömungsvolumina anpassbar. Die Komponenten stehen nicht in direktem Kontakt mit dem Medium und sie können kontinuierlich, relativ pulsationsfrei arbeiten. Hierfür wurden Ismatec Peristaltikpumpen (IPC-N, Ismatec®, Wertheim-Mondfeld, DE) verwendet, welche mit 9 Rollen einen sehr kontinuierlichen Mediumstrom haben sollten und bis zu 4 Schläuche aufnehmen konnten.

An die ersten Systeme (GeSiM-Oberteil und darauf basierende Systemen) konnten nur Teflonschläuche angeschlossen werden, sodass entweder Teflonschläuche verwendet, oder die flexiblen Schläuche kurz vor den Systemen mit diesen verbunden werden mussten. Zudem waren die Pumpenschläuche sehr kurz, sodass eine Verlängerung oftmals notwendig war. Diese Verbindungen, erzeugt durch Überstülpen der flexiblen Schläuche oder durch die Nutzung von gekürzten Kanülen, zeigten sich anfällig für die Blasenbildung. Das Abdrücken der Pumpenschläuche durch die Pumpe könnte zudem einen Gaseintrag verursachen. Auch war der Mediumstrom nicht so pulsationsarm wie ursprünglich angenommen (Abbildung 4-24).

Infolge der Experimente und Überlegungen wurde der Aufbau geändert. Die Pumpe, welche sich zu Anfang im Vorlauf befand wurde hinter die Systeme versetzt. Es ließen sich dadurch einige der Probleme im Handling als auch in der Blasenbildung beheben. Um das System nicht einem Unterdruck auszusetzen, wodurch Blasen hätten entstehen können, musste das Mediumreservoir erhöht aufgestellt werden. Dabei konnte bei Undichtigkeiten das System überlaufen oder das Reservoir leerlaufen. Die Vorteile dieser Anordnung waren: ein erheblich reduzierter Blaseneintrag durch die Pumpe, einfacheres Handling beim Befüllen und eine unproblematische Länge der Schläuche bis zur Pumpe.

Ein weiterer Vorteil war eine Reduktion der pumpeninduzierten Pulsation. Bei späteren Messungen mit Strömungssensoren zeigte sich, dass die Pumpen eine hohe Pulsation aufwiesen (Abbildung 4-24). Besonders bei geringen Geschwindigkeiten kam es während

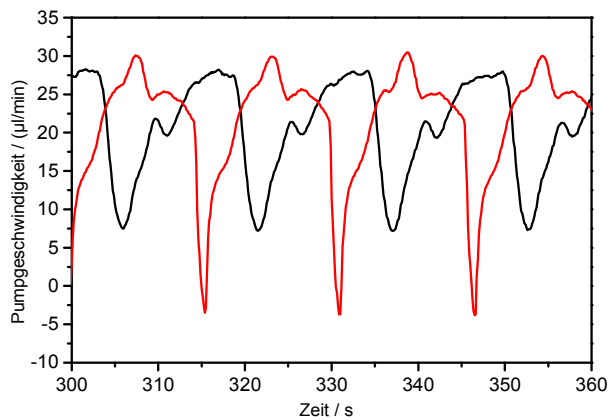


Abbildung 4-24: Gemessene reale Strömungsgeschwindigkeit.

Pumpeneinstellung von 16 µl/min, Pumpenschläuche 0.51 mm ID, gemessen mit GeSiM-Flusssensoren (A020-014) vor (schwarze Linie) und nach der Pumpe (rote Linie)

des Pumpens sogar zu invertierten Strömungen beim Freigeben des Schlauches durch die Pumpenwalze. Es muss davon ausgegangen werden, dass dies einen erheblichen Effekt auf den Mediaustausch sowie die Blasenbildung hatte, da dies lokale Druckspitzen zur Folge haben müsste. So schwammen kleine Blasen bei geringen Geschwindigkeiten oft nicht kontinuierlich, sondern „zitterten“ durch das System, was in Randbereichen zum faktischen Stillstand führte.

An dieser Stelle muss festgestellt werden, dass der Wechsel auf einen anderen Pumpentyp dringend empfohlen ist. Weiterhin besteht der Bedarf die Effekte des pulsierenden Mediumstromes auf die Zellen näher zu untersuchen.

4.5.2 Stimulation

Die Stimulation mit den Resonanzlautsprechern erwies sich als realisierbar. Die Kräfte reichten aus, um die Deckel durchzubiegen. Die Dehnung des Deckels entsprach, basierend auf dem eingegossenen Dehnungsmessstreifen (DMS, siehe Abbildung 4-18 I) bis zu 150 µ-strain (µm/m). In den Systemen ergaben sich dadurch Pulse mit maximalen Strömungsgeschwindigkeiten von 30 µl/min Abbildung 4-25. Die gemessenen Strömungsgeschwindigkeiten nahmen mit zunehmender Frequenz und gleichbleibenden µ-strain-Werten stark ab.

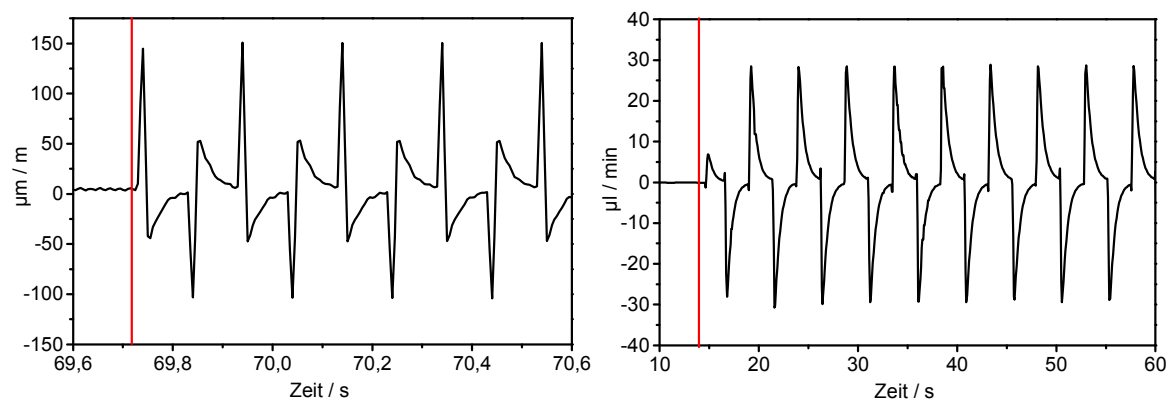


Abbildung 4-25: Dehnung im Deckel des Systems und durch Stimulation hervorgerufene Strömungspulse. A: Messungen des in den Deckel eingegossenen DMS (Abbildung 4-18 I) bei 5 Hz Stimulation mit Rechtecksignal, Werte sind im Bereich von 0,1 bis 20 Hz unabhängig von der Frequenz, B: bei 0,1 Hz im Zufluss mit GeSiM-Flusssensor gemessene Strömungsgeschwindigkeiten, gegenüberliegender Anschluss war verschlossen.

Angesichts von bis zu 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ während des Mediumwechsels sind die gemessenen 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ keine sehr hohen Strömungsgeschwindigkeiten, allerdings zeigte sich bei mikroskopischer Beobachtungen eine Bewegung der Zellen, was für eine direkte Wirkung des Pulses auf die Zellen spricht. Dies erklärt auch die häufige Ablösung der Zellen in Systemen mit mechanischer Stimulation. Hinzu kommt, dass die Pulsation der Pumpe, besonders bei langsamem Betrieb, ebenfalls Strömungsänderungen von ca. 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ induzieren kann. Diese beiden Faktoren stellen den Nutzen einer Stimulation, besonders aber die Trennung von Stimulation und Versorgung bei kontinuierlichem Betrieb in einem ZMS mit geringem Kulturvolumen in Frage.

Als Konsequenz wurde das System, auch wenn es die Stimulation ermöglicht, nicht in diesem Modus betrieben. Die Abnahme der beobachteten Strömungspeaks mit zunehmenden Frequenzen lässt sich auf die Trägheit des thermisch arbeitenden Sensors sowie durch Dämpfung im System, z.B. durch kompressible Gasblasen, flexible Ränder etc. zurückführen. Angesichts publizierter Stimuli von bis zu mehreren tausend $\mu\text{m}/\text{m}$ stellt sich ebenfalls die Frage nach der Vergleichbarkeit und nach sinnvollen bzw. realistischen Werten für die Modellsysteme.

Aufgrund der strömungsdämpfenden Eigenschaften, infolge größerer Weglängen und der direkteren Wirkung der Stimulation auf die Zellen, könnte die Nutzung von geeigneten 3D-Scaffolds (Gel, poröse Struktur) eine Trennung von Versorgungs- und Stimulations-Effekt erwirken. In diesen Systemen könnte die diffusionslimitierte Versorgung und die Versorgung durch die Perfusion besser voneinander unterschieden werden. Auch würden größere Volumina und Systemgrößen die Pumppulse glätten, sodass die Pulsation der Pumpe als Stimulus unterdrückt werden dürfte. Um derartige Systeme wirksam zu stimulieren, müssten allerdings stärkere Aktuatoren mit größerem Hub verwendet werden.

Zwar verdeutlichen die Beobachtungen wie stark sich die Stimulation auf die Fluidströmungen auswirkt, aber ohne dauerhaft adhärente Zellen ist eine Vergleichbarkeit mit stimulationsfreien Messungen nicht gegeben. Weil die Pumpe immer zusätzlich als mechanischer Stimulator fungiert, ist ohne pulsationsfreie Versorgung die Trennung von Versorgungs- und Stimulations-Effekt nicht möglich.

Weiterhin sind die Strömungen durch die Pulsation sehr stark. Das stützt die Theorie, dass die wachstumsfördernden Effekte der mechanischen Stimulation primär auf die, durch die induzierten Strömungen, verbesserte Versorgungssituation zurückzuführen sind.

4.5.3 Fluidische Anbindung der GeSiM-Varianten

Die Anbindung der Zellkultursysteme an die Pumpen bzw. die Befüllung der Systeme benötigt neue Lösungen statt der üblichen Provisorien. In den meisten Fällen werden Pumpenschläuche (Tygon®, Silicon, Latex), bzw. flexible Schläuche über gekürzte Spritzenkanülen gezogen, welche die Verbindung zu den jeweiligen Mikrofluidiken herstellen (siehe Abschnitt 2.4.3.2). Der Vorteil liegt in der Einfachheit, guten Handlungseigenschaften und sehr geringen Totvolumina in den Kanülen (Abbildung 4-26 A). Als nachteilig erwiesen sich die problematische Verbindung zu den Systemen, die Verbindung mit Schläuchen aus festeren Materialien (Teflon®) und die Probleme bei der Befüllung. Durch das relativ häufige Abziehen der Schläuche für das Herausnehmen und Kontrollieren der Systeme lockerten sich die eingeklebten Kanülen und die Verbindungen wurden undicht. Die Verwendung von festen Teflonschläuchen ist kompliziert, da sie aufwendig zu fixieren sind. Dennoch wurden sie bevorzugt, da sie gasdicht, autoklavierbar und sehr widerstandsfähig sind.

Das zuerst vom GeSiM-System übernommene Anschlussystem mit ¼-28“ Schrauben wurde ersetzt, weil es aufwendig in der Fertigung war und relativ viel Platz beanspruchte. Zwar bot es, beispielsweise über verfügbare Luer-Adapter, eine große Breite an möglichen Anbindungen, diese wiesen aber sehr hohe Totvolumina auf (Abbildung 4-26 B). In diesen sammelte sich Luft oder es verblieb Medium zurück. Dies störte die Zelleinsaat, den Austausch von Medium oder führte zum Eintrag von Blasen.

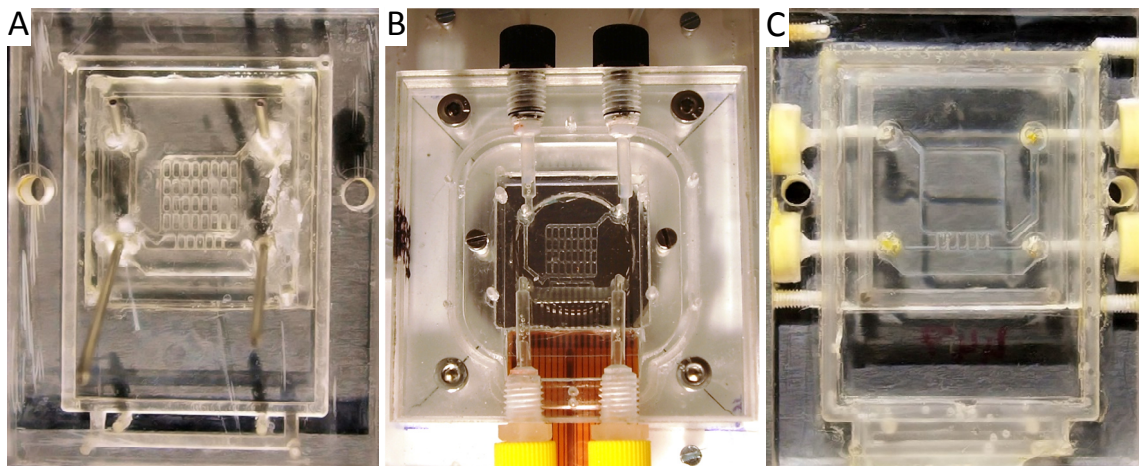


Abbildung 4-26: Komponenten der GeSiM-Zellkultursysteme.

A: System (MARK 3) mit eingeklebten Kanülen unterschiedlicher Länge; B: System (MARK 4) mit seitlich angebrachten ¼-28“ Schraubanschlüssen und über kommerzieller Verbinder (schwarz) angeschlossenen Teflonschläuchen bzw. via Adapter für ¼-28“ zu Luer-Lock, aufgesetzten Kanülen-Injektionskappen (gelb); C: System (MARK 3) mit seitlich angebrachten Latexmembranen (gelb) für Kanüleninjektion.

Eine weitere Herausforderung bei der fluidischen Anbindung bestand in der Notwendigkeit die Systeme aus dem Brutschrank zu nehmen um sie unter dem Mikroskop zu kontrollieren, in der Sterilbank mit Zellen zu besiedeln oder einen manuellen Mediaaustausch durchführen zu können. Dies bedeutete, daß die Systeme offen waren wenn die Schläuche abgezogen wurden, was die Kontaminationsgefahr erhöhte. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurden die Systeme selbstversiegelnd gestaltet. Die Anbindungspunkte wurden auf die Seiten verlegt und die aus Kanülen-Injektionskappen

entnommenen Latexmembranen eingesetzt (Abbildung 4-26 C). Die Kanülen wurden dann in die Kappen eingeführt, ein Ablösen des Schlauches war nicht mehr notwendig. Weiterhin erleichterte dieses Konzept den manuellen Medien austausch oder die Besiedelung, da nun mit Spritzen gearbeitet werden konnte. Um Medium für einen Medien austausch durchspülen zu können, wurde auf einer Seite eine mit Medium gefüllte Spritze sowie in den gewünschten Ausgang eine Kanüle eingestochen. Die Möglichkeit durch leichtes Eindrücken der Membranen einen Mediumpuls zu erzeugen, war außerdem vorteilhaft bei der Entfernung kleinerer Blasen.

4.5.4 SLV-Systeme

Beim SLV-System lagen die Anschlüsse nicht mehr im Sichtbereich des Zellkulturbereiches (wie bei den frühen GeSiM-Versionen), wodurch die Größe der Anschlusselemente weitgehend unproblematisch war. Damit kamen nahezu alle verwendbaren Luer- oder Luer-Lock-Elemente für das System wieder in Frage (Abbildung 4-18 H). Die für die GeSiM-Systeme verwendete Variante mit Membranen aus den Injektionskappen wurde, aufgrund der geringen nutzbaren Tiefe bei Anbringung von oben und der neu gefundenen Möglichkeit zur Reduktion der Toträume in Luer Verbindungen (Abschnitt 3.7.3), nicht mehr genutzt. Um einen Luer-Anschluss zu integrieren, wurden gekürzte Kanülen mit dem weiblichen Lueranschluss in extra gefräste kreuzförmige Aussparungen eingeklebt. Die ersten Versuche mit biokompatiblen Klebstoff (NUSIL®) führten zu Undichtigkeiten. Die Verwendung eines 2-Komponentenklebers (Patex-Kraftmix, Henkel AG&Co.KGaA, Düsseldorf, Deutschland) beseitigte diese Probleme. Über die kreuzförmige Aufnahme konnten die Anschlüsse Rotationskräfte aufnehmen, wodurch auch Luer-Lock-Verbindungen möglich wurden (Abbildung 4-18 G,H). Dies erleichterte das Herstellen bzw. das Lösen von Verbindungen, da die Anschlusselemente nur gedreht werden mussten, statt sie direkt abzuziehen. Dadurch reduzierten sich die Zugkräfte auf die Kanüle erheblich.

Die Alternative zu Luer wären teure proprietäre Sonderformate oder das Einkleben einer Kanüle (ohne Luer-Anschluss) gewesen. Der eigentliche Nachteil der Luer-Verbindungen war das hohe Totvolumen. Dies förderte die Blasenbildung bzw. das Injizieren von Blasen und konnte zu Unterbrechungen zwischen Sensoren und externer Referenzelektrode führen.

Zur Reduktion dieses Totvolumens wurde eine einfache Möglichkeit gefunden. Die Schläuche (Teflon/Silicon) wurden in einen männlichen Luer-Adapter eingeführt, welcher in einem weiblichen Gegenstück steckte. Durch diesen wurde der Schlauch mit einer durchgeführten Kanüle geschlossen und der Leerraum mit PDMS gefüllt. Durch das auspolymerisierte PDMS wurde ein Pfropf gebildet der genau das Totvolumen ausfüllte, während das Schlauchende direkt auf der Kanüle im Anschluss zu liegen kam (Abbildung 3-2). Zudem wurde durch die konische Form die Luft beim Festziehen der Verbindung herausgedrückt. Der Schlauch wird durch das feste PDMS fixiert und abgedichtet. Zusätzlich war das Element bei Verwendung von Teflonschläuchen vollständig autoklavierbar.

4.5.5 Diskussion der Anschlusskonzepte

Die Festlegung auf ein Anschlusskonzept ist direkt abhängig von der Auslegung und dem Design der Systeme. Bei Systemen, die ein häufiges Öffnen der Verbindungen bedürfen, muss die Auslegung diesem Umstand Rechnung tragen.

Dies ist eine wesentliche Einschränkung für die Verwendung von Kanülen mit aufgezogenen Schläuchen. Eine Variante zur Umgehung dieser Limitierung bestand ursprünglich im 4-Anschlussdesign der GeSiM-Systeme, wodurch die Verbindungen zum Mediumreservoir und zur Pumpe für die Injektion von Zellen oder das Abziehen von Luftblasen nicht unterbrochen werden mussten. Bei Verwendung ausreichend großer Kanülen (0,9 mm bis 1,1 mm) konnten die dünneren Kanülen der Spritzen in diese eingeführt werden und somit auch manuell gearbeitet werden. Besser in der Handhabung und Sicherheit waren die selbstversiegelnden Systeme, besonders weil sie nach Abziehen der Kanülen keinen weiteren Verschluss benötigten und ohne Kontaminationsgefahr bewegt werden konnten.

Die konventionellen Luer-Lock-Anschlüsse der SLV-Systeme waren wiederum aufgrund ihrer Flexibilität und der leichten Integration in die Torsi, die bessere Alternative für diese Systeme. Zumal über die Luer-Lock-Verbinder auch die Injektionskappen aufgesetzt und somit die Vorteile des selbstversiegelnden Konzeptes genutzt werden konnten. Da diese Kappen bzw. auch die Luer-Anschlüsse aufrecht standen, konnte durch Einstechen mit geringer Tiefe angesammelte Luft abgezogen bzw. ihr Eintrag in das System unterdrückt werden. Bei Anschluss der Verbinder mit eingegossenen Schläuchen war der Lufteintrag praktisch kein Problem mehr, da die Luftblasen zur Seite herausgedrückt wurden. Unabhängig von den Anschlusskonzepten muss in Zukunft aber eine pulsationsärmere Pumpentechnik verwendet werden, da diese einen Einfluss auf den Blaseneintrag und bei schwacher Adhäsion der Zellen auch auf die Ablösung der Zelllayer hat.

4.6 Sensorcharakterisierung

4.6.1 Sauerstoffsensoren

4.6.1.1 V1-Chip

Die Sauerstoffsensoren der Chips wurden zuerst mit Zyklovoltammetrie vermessen, um die Einflüsse der Mediumkomponenten auf die Elektrode zu untersuchen und den Sensor zu charakterisieren. Die Sensoren mussten mit Ethanol gereinigt werden um Reste des Photoresists zu entfernen. Danach zeigten sie zykvoltammetrische Kurvenverläufe wie sie für Clark-Elektroden beschrieben wurden [255].

Die ersten Messungen erfolgten in PBS. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in Bechergläsern durchgeführt, um ein schnelles Spülen bzw. einen vollständigen Austausch der Lösung zu gewährleisten. Die Messparameter orientierten sich an den in der

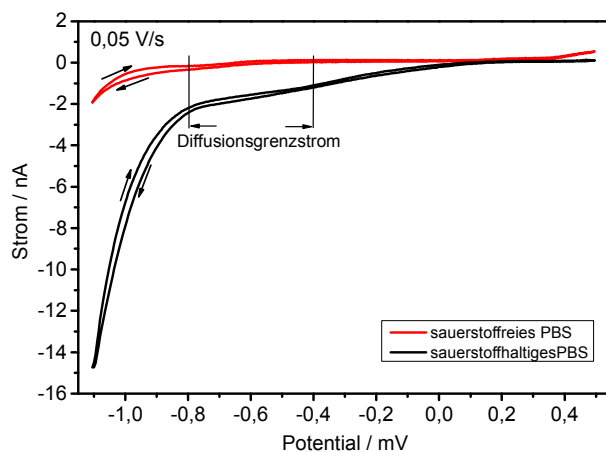


Abbildung 4-27: Zyklovoltammogramme eines Sauerstoffsensors.

In PBS mit 0,05 V/s Scangeschwindigkeit luftgesättigtem, sauerstoffhaltigem PBS (schwarze Linie) und mit 1% Na_2SO_3 hergestellten sauerstofffreiem PBS (rote Linie).

dieser Peak erst ab -1200 mV. Bei Verwendung sauerstofffreier Lösung, welche durch Zugabe von 1 % Natriumsulfit (Na_2SO_3) hergestellt wurde, tritt auf der Anodenseite, durch die Oxidation des Natriumsulfits hervorgerufen, ab ca. 300 mV vs. Ag/AgCl ein massiver Oxidationspeak auf. Aufgrund dessen wurde der Messbereich auf -900 mV bis $+400$ mV eingeschränkt, um innerhalb des Messbereiches zu bleiben und die Oxidation des Natriumsulfites zu vermeiden.

Die Messungen in Medium mit 10 % FBS wurden mit den neuen Parametern durchgeführt. Es wurden verschiedene Scangeschwindigkeiten verwendet, um einen Einfluss der Scangeschwindigkeit auf die Sensitivität gegenüber möglichen Störfaktoren auszuschließen. Wie die Messungen zeigten, lag das Plateau des Diffusionsgrenzstromes zwischen -400 mV und -800 mV gegenüber der Referenzelektrode. Die Erhöhung der Scangeschwindigkeit führte zu einer stärkeren Separation der Kurven von vorlaufender (in Richtung positiver Potentiale) und rücklaufender (in Richtung negativer Potentiale) Scanrichtung. Es zeigten sich darüber hinaus keine Peaks, die auf das Vorhandensein von Stoffen hinwiesen, welche die Messung stören.

Literatur beschriebenen Werten. Gemessen wurde im Bereich von -1100 mV bis $+500$ mV vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode mit 50 mV/s Scangeschwindigkeit und 10 mV Auflösung in einer 3-Elektrodenkonfiguration (3-EK). Unterhalb von -800 mV kommt es besonders in sauerstoffhaltiger Lösung zur Ausbildung eines sehr hohen Stromes, welcher durch die beginnende Wasserstoffreduktion hervorgerufen wird. Bei sauerstofffreier Lösung bildet sich

4.6.1.2 V2-Chip

Die Sauerstoffsensoren auf den Chips der 2. Generation wurden auf einen Durchmesser von 25 μm vergrößert, um höhere Ströme zu liefern. Sie zeigten dieselbe Charakteristik wie die Sensoren der 1. Generation, wobei die Peakseparation bei höheren Scangeschwindigkeiten geringer ausgeprägt war. Dies schien auch mit einer geringfügigen Verschiebung der Zyklovoltammogramme in Richtung positiverer Potentiale einher zu gehen. Eine verbesserte Diffusion an der Elektrode aufgrund eines größeren Oberflächen-Kantenverhältnis könnte die Ursache sein. Auch die geringere Stromdichte könnte eine Erklärung sein, wobei diese wiederum ebenfalls auf die größere Fläche zurück zu führen ist.

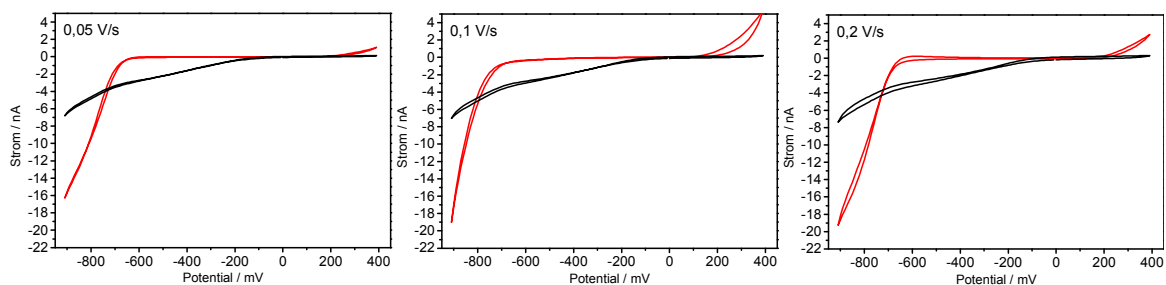


Abbildung 4-28: Zyklovoltammogramme mit zunehmender Scanrate in Medium mit FBS.

v.l.n.r. Zyklovoltammogramme mit zunehmender Scanrate, jeweils in luftgesättigtem Medium (schwarz) und sauerstofffreiem Medium (rot), jeweils gemessen im Bereich von -900 mV bis +400 mV.

Da diese Sensoren keine Gegenelektrode mehr aufwiesen, wurde für die Messungen in 3-Elektrodenkonfiguration (3-EK) jeweils eine Elektrode des nächstgelegenen IDES als Gegenelektrode verwendet, wobei die Referenzelektrode so nah wie möglich positioniert wurde. Die Messungen in 3-EK dienen der Vergleichbarkeit der Messungen mit den Sensoren der 1. Generation. Nachfolgend wurden die Messungen aber in 2-Elektrodenkonfiguration (2-EK) durchgeführt weil sich diese Konfiguration als vorteilhafter erwies. Hauptvorteil war die höhere Widerstandsfähigkeit gegen Schäden durch Unterbrechungen des Stromkreises aufgrund von Blasenbildung. Der direkte Vergleich zwischen den Messungen in den beiden Elektrodenkonfigurationen zeigte keine relevanten Unterschiede in den Formen der Zyklovoltammogramme.

Bei Verwendung desselben Sensors lagen die Zyklovoltammogramme meist übereinander. Abweichungen gab es bei Werten kleiner als -700 mV bzw. größer als +300 mV. Messungen in 3-EK zeigten etwas früher die Ausbildung der in 4.6.1.1 bereits genannten Peaks. Die untere Grenze des Diffusionspeakstromes des 25 μm Sensors lag mit ca. -700 mV bei geringeren Werten als die für V1-Sensoren gefundene untere Grenze von -800 mV vs. Ag/AgCl. Dies bedeutete, dass das Plateau des Diffusionsgrenzstromes für den 25 μm Sensor um +100 mV zu positiveren Werten verschoben ist (Abbildung 4-29 A), die obere Plateaugrenze lag bei ca. -400 mV vs. Ag/AgCl. Die Verschiebung der unteren Grenze ist für 2-EK und die 3-EK gegeben, wobei die 3-EK spätestens bei ca. -700 mV beginnt den unteren Peak auszubilden, während dieser bei der 2-EK erst bei -725 mV auftritt.

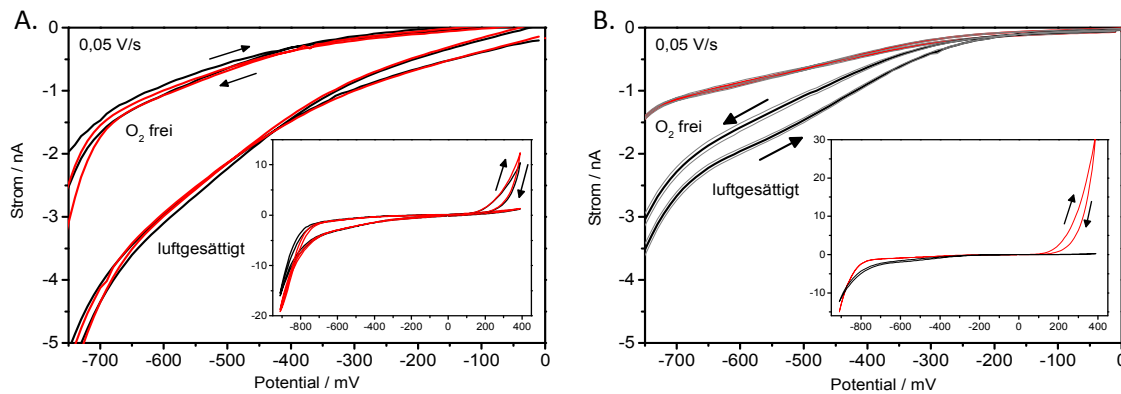


Abbildung 4-29: Exemplarische Messung in Medium mit 10 % FBS bei 0,05 V/s.

A: Vergleich 2-EK (rot) vs. 3-EK (schwarz) in Luft gesättigtem Medium und sauerstofffreiem Medium (1 % Na_2SO_3) bei Raumtemperatur. Sensitivität berechnet als Differenz des Stromsignals von sauerstofffreier und sauerstoffhaltiger Lösung, berechnet aus den Mittelwerten des Vor- und Rücklaufes. 2-EK: $2,31 \text{ nA} \pm 0,1 \text{ nA}$, 3-EK: $2,21 \text{ nA} \pm 0,3 \text{ nA}$; B: Messungen mit V2-Chips im GeSiM-System nach der Zellkultur bei 37°C im Brutschrank Mittelwerte von 4 Sensoren (20 Zyklen) mit Standardabweichung (graue Linien) in Luft gesättigtem Medium und sauerstofffreiem Medium (2 % Na_2SO_3). Berechnete Sensitivität: $1,04 \text{ nA} \pm 0,1 \text{ nA}$

Um diesem Problem zu begegnen, wurde die Sensitivität bei -650 mV bestimmt. Die Sensitivität ($\Delta \text{nA} / \Delta \text{cO}_2$) wurde als Differenz der Stromantwort (nA) im Verhältnis zur Konzentrationsänderung des Sauerstoffes (100 % vs. 0 %) definiert und ergab bei -650 mV und Raumtemperatur für die dargestellten Messungen in 3-Elektrodenkonfiguration etwa $2,21 \text{ nA} \pm 0,3 \text{ nA}$ sowie für die 2-Elektrodenkonfiguration $2,31 \text{ nA} \pm 0,1 \text{ nA}$. Die Sensitivitätsangaben basierend auf der Zyklovoltammetrie wurden aus den Stromdifferenzen von sauerstoffhaltiger und sauerstofffreier Messung berechnet. Es wurden die Mittelwerte der vorlaufenden und der rücklaufenden Reaktion verwendet um die Peakseparation zu kompensieren.

Für beide Elektrodenkonfigurationen als auch für die verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten konnte keine Ausbildung von Peaks gefunden werden, welche auf einen störenden Einfluss des Mediums oder des FBS hinwiesen. Es wurde auch keine pH-Abhängigkeit des Messstromes im pH-Bereich von pH 7 bis pH 8 gefunden.

Die Messungen in den Systemen erfolgte bei 37°C und zeigten geringere Werte als die Messungen bei 20°C was durch die erhöhte Temperatur und die damit verbundene verringerte Löslichkeit von Sauerstoff zu erklären ist. Die Sensoren wurden deshalb bei 37°C in Zweipunktmessung kalibriert, um Minimal- und Maximalwert zu erhalten. Messungen nach der Zellkultur und Herauspülen der Zellen mit Medium zeigten verringerte Messwerte (Abbildung 4-29, $-1,04 \text{ nA} \pm 0,07 \text{ nA}$). Trotz Verwendung von 2 % Na_2SO_3 für das sauerstofffreie Medium war eine vollständige Entfernung des Sauerstoffs nicht möglich.

4.6.1.3 Amperometrie mit V1-Chip und V2-Chip

Aufgrund der in den Zyklovoltammogrammen für die V2-Chips gefundenen Grenzstromplateaus zwischen -400 mV bis -700 mV , wurden die amperometrischen Messungen statt mit oft üblichen -700 mV vs. Ag/AgCl , bei einem Potential von -650 mV vs. Ag/AgCl durchgeführt.

Die Messungen zeigten einen zu Anfang sehr hohen Strom, der sich innerhalb der ersten Sekunden stabilisierte und in einen nahezu konstanten Strom überging. Die Messungen wurden über verschiedene Zeiträume in Medium mit FBS durchgeführt. Die Kurven lagen bei Wiederholungen der Messungen mit demselben Sensor mit mind. 1 min Pause annähernd übereinander. Die Elektronik des Bionas war auf einen gepulsten Messmodus eingestellt, welcher in einem festgelegten Zeittakt die Sensoren aktivierte und 4 Sekunden nach Aktivierung den gemessenen Strom detektierte. Für die amperometrischen Messungen mit V1-Chip wurde dieser Wert für die Bestimmung der Sensitivität ($\Delta nA/\Delta cO_2$) des Sensors verwendet [252]. Im Zuge der Entwicklung wurde das Bionas-System vollständig durch die Palm-Sens-Systeme ersetzt. Das Zeitfenster für die Sensoren wurde für die V2-Chips auf 5 s erhöht, um den höheren Strömen und den daraus resultierenden verlangsamten Einstellzeiten Rechnung zu tragen. Der V1-Sensor zeigte bei -700 mV vs. Ag/AgCl nach 4 s eine Sensitivität von $-1,28 \text{ nA} \pm 0,05 \text{ nA}$. Der V2-Sensor, welcher nur bei -650 mV vs. Ag/AgCl betrieben wurde, zeigte nach 5 s eine Sensitivität von $-3,23 \text{ nA} \pm 0,09 \text{ nA}$. Dafür erreichte der $10 \mu\text{m}$ Sensor (V1) 90 % seines Endwertes in unter 2 s in sauerstoffhaltiger bzw. unter 1 s in sauerstofffreiem Medium.

Der V2-Sensor erreichte 90 % seines Endwertes in unter 20 s in sauerstoffhaltiger bzw. unter 3 s in sauerstofffreiem Medium. Die verlangsamte Einstellzeit war ein Grund für die Erhöhung der Zykluszeit von 4 s (V1) auf 5 s (V2) siehe Abbildung 4-30. Innerhalb dieser Zeit hatte der Sensor in sauerstofffreier Lösung seinen t_{90} -Wert erreicht wobei gleichzeitig ein möglichst hoher Wert für sauerstoffhaltige Lösungen erreicht wurde. Messungen über 1 Stunde zeigten zudem, dass die Werte auch bei Dauerbetrieb des Sensors in ruhender Lösung stabil waren.

Differenzen in der Stromantwort der amperometrischen Messungen zu den Werten der zykelvoltammetrischen Messungen, reduzierten aus den unterschiedlichen Messmodi und sind keine Effekte der Sensoren (Näheres siehe Anhang A7).

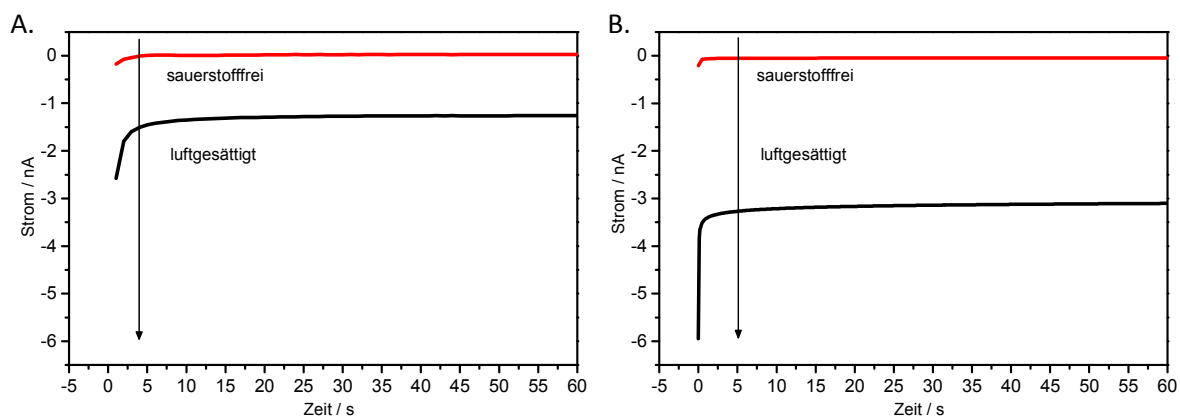


Abbildung 4-30: Amperometrische Messungen über 60 s.

In sauerstofffreiem Medium (1 % Na₂SO₃) und in luftgesättigtem Medium bei Raumtemperatur (ca. 20 °C).

A: Messungen mit O₂-Sensor (10 µm) von V1-Chip, B: Messungen mit O₂-Sensor (25 µm) von V2-Chip. Pfeile zeigen die Zeit (4 s/5s) bei der die Sensitivität bestimmt wurde.

4.6.1.4 Sauerstoffsensoren auf den SLV Chips

Aufgrund fertigungstechnischer Probleme, wie der zu hohen Eindringtiefe des Lasers, waren viele Sensoren nicht einsatzfähig oder zeigten stark voneinander abweichende

Zyklovoltammogramme. Da das Elektrodenmaterial (Platin), sowie die avisierte Größe identisch mit dem der Sensoren auf den V2-Chips waren, sollten die Werte ähnlich sein. Aufgrund des Fertigungsverfahrens variierten die Größen der Arbeitselektroden, wodurch auch die erreichbaren Maximalwerte variierten. Die in Abbildung 4-31 dargestellte Messung in 3-Elektrodenkonfiguration mit angeschlossener Gegenelektrode zeigt etwas höhere Ströme als die Sensoren der GeSiM-V2-Chips. Abgesehen von einem Kreuzen der vor- und rücklaufenden Flanke des Graphen für das luftgesättigte PBS im Bereich von -600 mV bis ca. -100 mV, zeigt die Messung zu den GeSiM-Chips vergleichbare Zyklovoltammogramme. Die aus den, in Abbildung 4-31 dargestellten, Zyklovoltammogrammen ermittelte Sensitivität, bei -650 mV vs. Ag/AgCl lag bei $-3,24 \text{ nA} \pm 0,49 \text{ nA}$. Der Sensor in der amperometrischen Messung, 5 s nach Aktivierung zeigte indessen eine Sensitivität von $-2,57 \text{ nA} \pm 0,88 \text{ nA}$. Beide Werte liegen unterhalb der Ströme die mit dem GeSiM-V2-Chips erreicht wurden. Dies deutet darauf hin, dass die effektive Fläche geringfügig kleiner war, als die der $25 \mu\text{m}$ Sensoren.

Die Messungen mit den funktionsfähigen Chips zeigten, dass das grundlegende Funktionsprinzip auch bei den selbstgefertigten Chips funktionierte. Durch die bei der Laserbearbeitung hervorgerufene Schädigung der Elektroden, wiesen diese hohe Abweichungen auf bzw. fielen sehr schnell aus. Deshalb verfügten nur wenige Chips über funktionsfähige Arbeitselektroden, weswegen für die Zellmessungen im Folgenden nur die optischen Sensoren verwendet wurden.

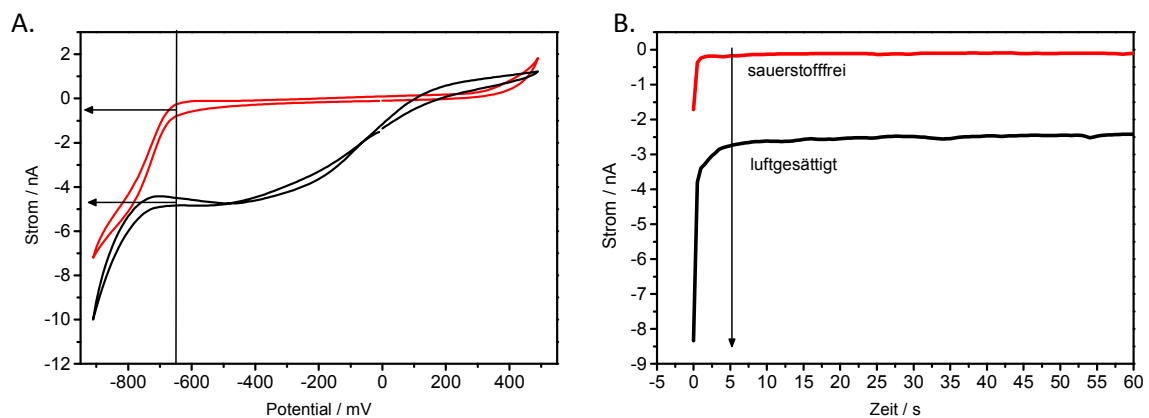


Abbildung 4-31: Exemplarische Messungen eines gelaserten Sensors.

Mittelwerte aus je 10 Zyklen in sauerstoffreiem PBS mit 1 % Natriumsulfit und luftgesättigtem PBS bei Raumtemperatur gemessen in einem Becherglas. Die Sensitivität (berechnet aus den Mittelwerten von Vor- und Rücklauf) liegt bei -650 mV vs. Ag/AgCl entspricht $-3,24 \text{ nA} \pm 0,49 \text{ nA}$. B.: Amperometrische Messung desselben Sensors (MW aus je 4 Messungen) über 60 s aufgetragen. Sensitivität ($\Delta \text{nA} / \Delta c_{\text{O}_2}$) bei $t=5\text{s}$ nach Messstart ist $-2,57 \text{ nA} \pm 0,88 \text{ nA}$

4.6.1.5 Vergleich der amperometrischen Sauerstoffsensoren

Die zykovoltammetrischen Messungen haben gezeigt, dass die Messung des Sauerstoffgehaltes im Medium mit membranfreien Sensoren möglich ist. Das Medium inkl. zugegebenen FBS zeigt keinen störenden Einfluss im verwendeten Messbereich.

Die Messungen mit dem V1-Sensor zeigten sehr geringe Stromwerte bei Raumtemperatur, welche im Mittel bei $-1,28 \text{ nA} \pm 0,05 \text{ nA}$ für luftgesättigtes Medium lagen. Dies war zu gering, da bei Verwendung in Medium mit 37°C dieser Wert, aufgrund der

geringeren Sauerstoffkonzentration bei höheren Temperaturen, noch weiter sinkt. Demgegenüber zeigte die 25 μm großen Sensoren für sauerstoffgesättigtes Medium bei Raumtemperatur einen Strom von $-3,23 \text{ nA} \pm 0,09 \text{ nA}$ bzw. von $-2,34 \text{ nA} \pm 0,03 \text{ nA}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank.

Weiterhin können die hohen Stromdichten bei den 10 μm Sensoren zu Problemen führen [256]. So nehmen nach McLaughlin et. al [257] die Stromdichten mit kleiner werdenden Elektroden, besonders unterhalb von 30 μm Durchmesser überproportional zu. Während die 10 μm Sensoren Stromdichten von $1,6 \times 10^{-2} \text{ nA}/\mu\text{m}^2$ haben, sind die Stromdichten der 25 μm Sensoren mit $6,6 \times 10^{-3} \text{ nA}/\mu\text{m}^2$ ähnlich hoch wie die des Bionas Systems mit $7,4 \times 10^{-3} \text{ nA}/\mu\text{m}^2$.

Die schnellere Einstellzeit des 10 μm Sensors liegt wahrscheinlich an der geringeren Zehrung sowie der größenbedingt zu erwartenden Mikroelektrodencharakteristik. Der größere Sensor hat eine höhere Eigenzehrung, weswegen sich die Zeit bis zur Einstellung eines Diffusions-Verbrauchsgleichgewicht erhöht. Dieser Nachteil lässt sich durch Variation des Messmodus kompensieren. Die Verlängerung der Aktivierungszeit bis Ablesung des Wertes dürfte potentielle Fehler aus diesem Verhalten reduzieren, während eine Variation der Pausenzeiten die Eigenzehrung verringert.

Bei der Charakterisierung aller Sauerstoffsensoren war das unzureichende Entfernen von Sauerstoff mit Na_2SO_3 zu berücksichtigen. Auch bei der testweisen Verwendung von 2 % Na_2SO_3 konnten oft noch Ströme um die 1 nA für theoretisch sauerstofffreie Lösungen gemessen werden. Potentielle Fehlerquellen sind somit, neben dem Fehler des Gerätes von ca. 0,2 nA, verbleibender Restsauerstoff sowie elektrochemische Nebenreaktionen. So zeigen Messungen, wie in Abbildung 4-29 dargestellt, immer noch sehr hohe Grundströme für sauerstofffreie Lösungen, was auf das Durchspülen von Blasen oder einen Sauerstoffeintrag über das PDMS oder die Fluidik (Schläuche, Verbinder) hindeutet.

4.6.1.6 Einfluss der PDL Beschichtung

Der Einfluss der PDL-Beschichtung konnte nicht eindeutig geklärt werden. In den zykelvoltammetrischen Messungen gab es nur geringe Abweichungen der Graphen, diese lagen zudem oft innerhalb der Streuung der Zyklen. In Bereichen unterhalb von -700 mV zeigten die beschichteten Sensoren oftmals sogar größere Ströme als die unbeschichteten (Abbildung 4-32). Dieser Effekt zeigte sich bei den amperometrischen Messungen ebenfalls. Bei einem Teil der Messungen wurde hingegen, sowohl im zykelvoltammetrischen als auch im amperometrischen Messmodus, eine Verringerung der Stromantwort beobachtet. Die Streuung der Messungen lässt keine Aussage über einen nachteiligen noch über einen vorteilhaften Effekt der Beschichtung zu.

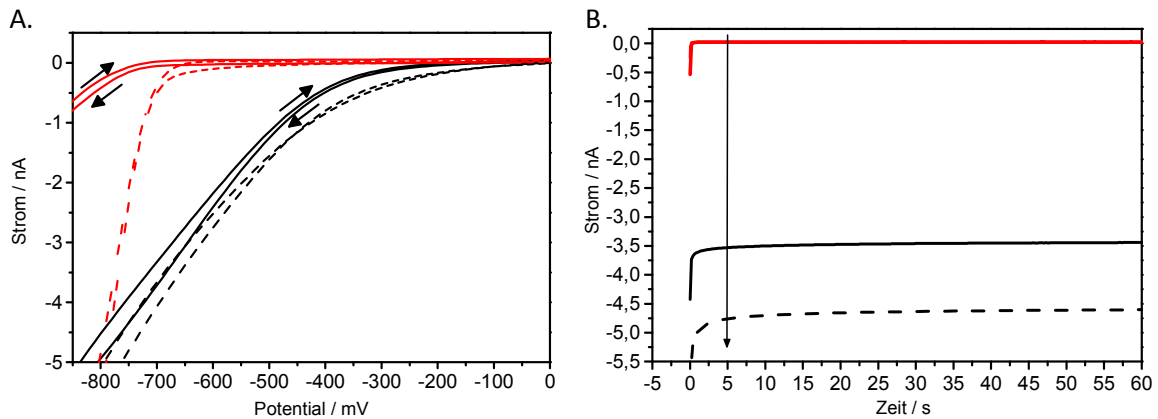


Abbildung 4-32: Exemplarische Messungen eines Sensors vor und nach PDL-Beschichtung.

A.: Mittelwerte zyklolvoltametrischer Messungen (0,05 V/s Scangeschwindigkeit von -900 mV bis +500 mV, $n=12$), B.: nachfolgende amperometrische Messungen (-650 mV vs. Ag/AgCl-Elektrode, $n=7$). Für sauerstoffhaltige (schwarze Linie) und sauerstofffreie PBS-Lösung (2 % Na_2SO_3 , rote Linien) bei Raumtemperatur. Messungen mit unbeschichteten Sensoren als durchgezogene Linien, Messungen nach PDL-Beschichtung als gestrichelte Linien. Der Chip war zuvor nicht benutzt worden, die Signalzunahme nach Beschichtung wurde auf allen gemessenen Sauerstoffsensoren festgestellt, die amperometrischen Messungen für sauerstoffreies PBS liegen übereinander. Die 5s nach Sensoraktivierung, amperometrisch bestimmten Sensitivitäten ($\Delta nA/\Delta cO_2$) betragen $-3,55 \pm 0,04$ nA (unbeschichtet) bzw. $-4,78 \pm 0,08$ nA (beschichtet).

Geht man davon aus, dass die Sensoren während der Messung durch Zellprodukte oder bei Verwendung von PDL einen Belag aus Biopolymeren haben müssten, so ist eigentlich von einer Abnahme der maximalen Stromantwort bzw. der Sensitivität auszugehen. Der Einfluss der Beschichtung ist daher durch eine Vielzahl von Faktoren erklärbar, nicht zuletzt der Zusammensetzung der PDL-Lösung (Batch, Lagerzustand) den Reinigungsprozeduren oder dem Alter des Chips. Eine Verbesserung der Stromantwort ist durch einen besseren Elektronenübergang infolge der Beschichtung oder durch das Ablösen von Verunreinigungen im Zuge der Beschichtung erklärbar. Bei Verwendung anderer Beschichtungen oder alternativer Beschichtungsprotokolle sollten die Sensoren gezielt auf den Einfluss dieser Beschichtungen getestet werden. Dies gilt aber grundsätzlich für alle Typen von amperometrischen Sensoren.

Hinzu kommt, dass im Zuge der Zellkultur auch die Ablösung der Beschichtung oder deren Ersatz durch extrazelluläre Matrix einen Einfluss auf das Messsignal haben kann. Da diese Einflüsse schwer zu kalkulieren sind, wurde auf die Beschichtung verzichtet. Hierfür gab es, neben dem potentiellen negativen Einfluss auf die Sauerstoffsensoren noch den Grund, dass die Beschichtung nicht notwendig war. Die Zelllinien zeigten auf Si_3N_4 als Oberflächenmaterial gute Wachstumsraten (siehe Abschnitt 4.7.3), zudem scheint die Nutzung von PDL teilweise negative Effekte auf das Zellwachstum zu haben [258].

4.6.1.7 Optische Sauerstoffmessung

Für die optischen Sensoren wurden keine weitergehenden Charakterisierungen vorgenommen, da es sich um kommerzielle Systeme handelte. Ihre Funktion ist abhängig vom Fluorophor, weswegen sie nach Reinigungsprozeduren neu kalibriert werden mussten. Ihre Charakteristik wird als linear angegeben. Die Kalibrierung konnte ebenfalls mit Zweipunktkalibration unter Verwendung von 1 % Natriumsulfit erfolgen.

4.6.2 pH-Sensoren der GeSiM Chips

4.6.2.1 Auswahl der Schichtdicken

Die Fertigung bei GeSiM erfolgte unter Nutzung eines PE-CVD Prozesses. Die verwendeten Schichtdicken wurden aufgrund der Literaturrecherche und praktischer Überlegungen ausgewählt. In der Literatur werden für ISFETs Schichtdicken von 20 nm bis ca. 100 nm angegeben [178,180]. Da häufiger Dicken von 20 nm und 60 nm verwendet wurden, wurden diese auch für unsere Sensoren vorgesehen. Zusätzlich sollte noch eine

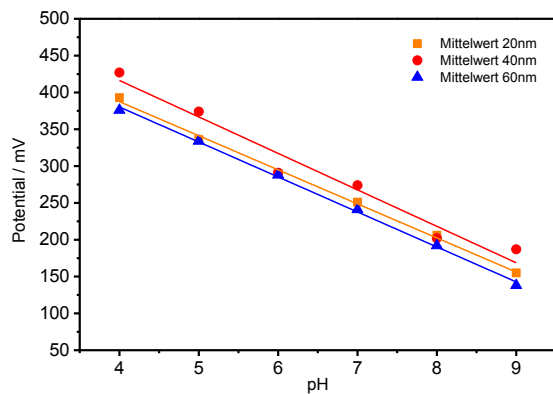


Abbildung 4-33: Kurven der pH-Sensitivitätsmessungen mit Schichtdicken von 20 nm, 40 nm und 60 nm.

Gemessen 120 s nach Pufferwechsel. MW der Messungen der 2 mm messenden Sensoren ($A \sim 3,14 \text{ mm}^2$), gemessen von pH 9 bis pH 4 und zurück (3 Chips je Schichtdicke, $n=6$). Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden berechnete Sensitivitäten betragen für 20nm: $-46,26 \pm 1,21 \text{ mV/pH}$, 40 nm: $-49,51 \pm 4,62 \text{ mV/pH}$ und 60 nm: $-47,51 \pm 0,95 \text{ mV/pH}$

Die Messungen zeigten im Mittel kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Schichtdicken (Abbildung 4-33) Die Standardabweichung der Messungen variierte, wobei die 40 nm Sensoren am schlechtesten abschnitten. Die Sensoren zeigten ermittelte Sensitivitäten von $-46,26 \pm 1,21 \text{ mV/pH}$ (20 nm), $-49,51 \pm 4,62 \text{ mV/pH}$ (40 nm) und $-47,51 \pm 0,95 \text{ mV/pH}$ (60 nm). Da keine Schichtdicke herausragende Eigenschaften zeigte wurden von GeSiM, Wafer mit je einer der 3 Schichtdicken gefertigt.

Die Schichtdicken auf den Sensoren der gefertigten Wafer waren durch verschiedene Farben optisch unterscheidbar. Die 20 nm Chips waren gelb, die 40 nm Chips rötlich und die Si_3N_4 Beschichtung der 60 nm Chips war bläulich (Abbildung 4-34).

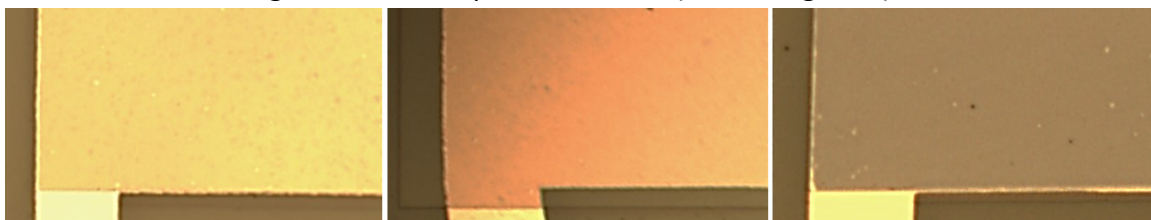


Abbildung 4-34: Optisch erkennbare Verfärbung der pH-Sensoren in Folge der unterschiedlichen Schichtdicken.

V.l.n.r. Gelb (20 nm), rot (40 nm), blau (60 nm).

Im Laufe der weiteren Messungen mit den Sensoren zeigte sich, dass die mit 40 nm Si_3N_4 beschichteten Sensoren eine höhere Streuung und eine geringere Sensitivität zeigten als die 20 nm und 60 nm Sensoren. Die Ursache konnte nicht näher bestimmt werden. Ein Fertigungsfehler kann nicht ausgeschlossen werden, aber das Problem trat später bei der

Charge Testsensoren auf, sodass eine andere Ursache wahrscheinlicher ist. Infolgedessen wurden nur noch Chips mit 20 nm Si₃N₄ und 60 nm Si₃N₄ gefertigt bzw. verwendet.

4.6.2.2 Bestimmung der Sensitivität

Nach Kontaktierung mit flexiblen Leiterplatten durch die Firma EPSa (EPSa Elektronik & Präzisionsbau Saalfeld GmbH, Deutschland) erfolgten die Messungen der Sensitivität der Chips zuerst in Bechergläsern bei Raumtemperatur. Die Chips wurden zwischen den Bechergläsern getauscht und zwischenzeitlich gespült (Aqua dest.). Die ersten gemessenen Werte nach dem Erhalt der Chips zeigten Sensitivitäten über -70 mV pro pH Dekade. Diese Werte stabilisierten sich nachdem die Chips über mehrere Tage in Aqua dest. gelagert wurden, um die sensitive Schicht quellen zu lassen.

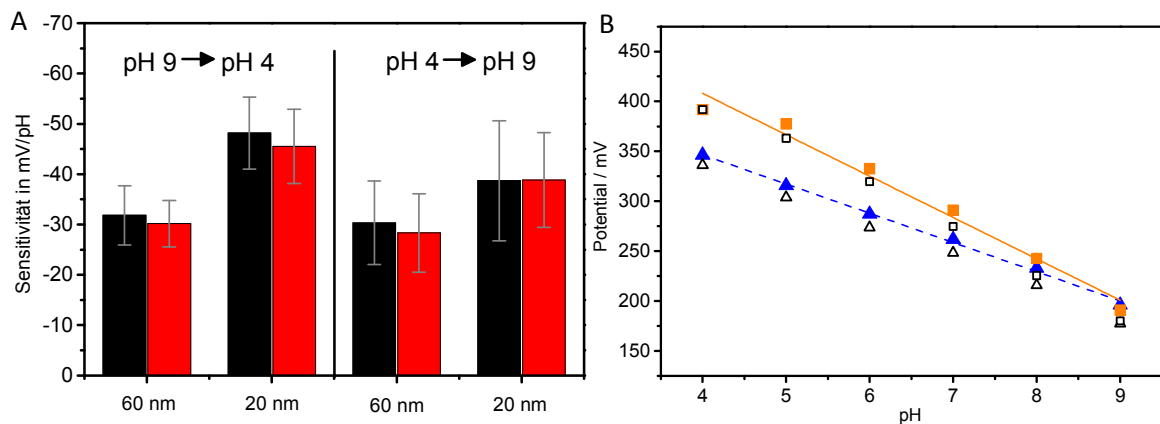


Abbildung 4-35: Darstellung der berechneten Sensitivitäten mehrerer Chips (N=3) in Abhängigkeit der Messrichtung.

A: die Werte bei 60 s (schwarze Balken) bzw. 600 s (rote Balken) nach Sensoraktivierung, wurden aufgetragen und aus ihnen die Sensitivität berechnet. **B:** Darstellung des MW der Potentiale bei definierten pH-Werten (N=6). Quadrate entsprechen 20 nm und Dreiecke 60 nm Sensoren. Gefüllt: Werte nach 60 s; Offen: Werte nach 600 s.

Danach betragen die berechneten Sensitivitäten nach 60 s Messzeit für die 20 nm Sensoren bei $-43,29 \pm 1,59$ mV/pH bzw. bei $-41,46 \pm 2,91$ mV/pH nach 600 s. Sie weisen damit höhere Sensitivitäten auf als die 60 nm Sensoren, die bei Verwendung des 60 s Zeitfensters eine Sensitivität von $-30,95 \pm 0,86$ mV/pH und nach 600 s eine Sensitivität von $-29,27 \pm 0,78$ mV/pH aufwiesen. Unter messtechnischen Aspekten muss hierbei darauf hingewiesen werden, dass die 60 nm Sensoren weniger anfällig gegenüber Störungen von außen waren.

Es zeigte sich eine ausgeprägte Abhängigkeit der gemessenen Sensitivität von der Richtung des pH-Wechsels. Bei Wechsel von niedrigen H⁺-Ionenkonzentrationen zu hohen H⁺-Ionenkonzentrationen (pH 9 → pH 4) war der Anstieg höher und die Standardabweichung in der Regel geringer als bei dem Wechsel von hohen zu niedrigen H⁺-Ionenkonzentrationen (pH 4 → pH 9). Dies war ein durchgehend auftretender Effekt, der durch Pausieren zwischen der letzten Messung in absteigender Richtung (pH 9 → pH 4) und vor Durchführung des Rücklaufes (pH 4 → pH 9) zwar verringert werden konnte aber immer auftrat. Dieser Effekt schwächte sich mit der Zeit ab, was auf eine Veränderung der sensitiven Schichten schließen lässt. Versuche den Effekt durch intensiveres Spülen mit Aqua dest. zu begegnen, waren nur bedingt erfolgreich. Messungen bei denen ganz auf das

Spülen verzichtet wurde, zeigten zum Teil ein besseres Hystereseverhalten. Der Effekt verringerte sich mit der Nutzungszeit der Sensoren erheblich. Infolge dieses Verhaltens wiesen die einzeln berechneten Sensitivitäten für Wechsel von pH 9 \rightarrow pH 4 bzw. von pH 4 \rightarrow pH 9, erhebliche Unterschiede auf. Für die in Abbildung 4-35 aufgetragenen Messungen wurden die Sensoren bis zu 600 s gemessen und die Werte bei 60 s (schwarze Balken) und bei 600 s (rote Balken) aufgetragen, um zu zeigen, dass der Effekt nicht einfach durch verlängerte Einstellzeiten verursacht wurde und dass die standardmäßig verwendeten 120 s Fenster ausreichend sind.

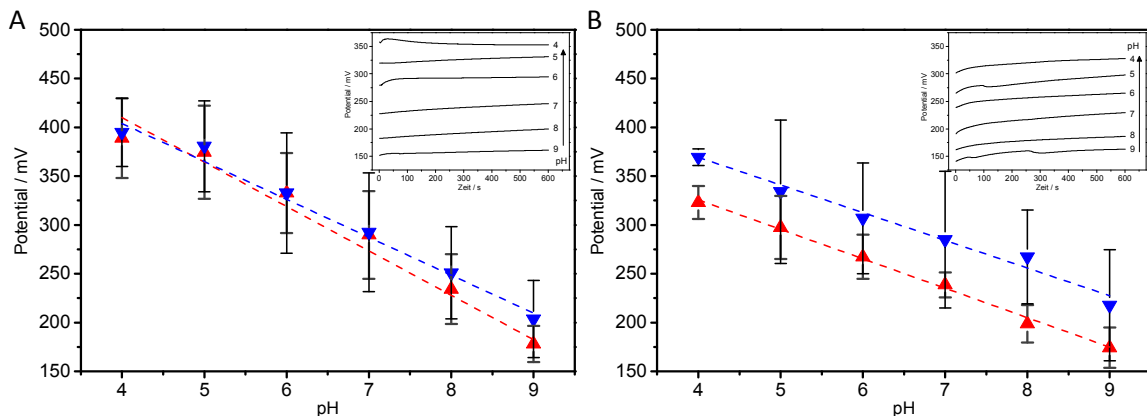


Abbildung 4-36: Darstellung der Mittelwerte der Potentiale mehrerer Sensoren.

Chips nach 600 s in Lösung in Abhängigkeit der Messrichtung. Von pH 4 \rightarrow pH 9 (blau, ∇) und von pH 9 \rightarrow pH 4 (rot, Δ) für **A**: 20 nm Sensoren mit Sensitivitäten von $-45,5 \pm 7,4$ mV/pH (Δ) bzw. $38,8 \pm 9,4$ mV/pH (∇) und **B**: 60 nm Sensoren mit Sensitivitäten von $30,0 \pm 4,6$ mV/pH (Δ) und $-28,3 \pm 7,8$ mV/pH (∇), Inserts: Exemplarische Kurven über 600 s für die Richtung von pH 9 nach pH 4.

Die in Abbildung 4-36 dargestellten Messungen verdeutlichen die Unterschiede. Besonders deutlich wird die Differenz zwischen aufsteigender Richtung (pH 4 \rightarrow pH 9) und absteigender Richtung (pH 9 \rightarrow pH 4) bei den 60 nm Sensoren. Die mittlere Sensitivität der Messungen berechnet aus allen Werten in beide Messrichtungen für 60 s, ergibt daher auch eine erhebliche Sensitivitätsdifferenz zugunsten der 20 nm Sensoren. Dies führt zu Sensitivitätsabweichungen zwischen 20 nm und 60 nm Schichten.

4.6.2.3 Wiederholgenauigkeit

Um die Stabilität der Sensoren und ihr Hystereseverhalten, also die richtungsabhängige Potentialverschiebung näher zu bestimmen, wurden zyklische Messungen durchgeführt. Die Messungen wurden in einem 5 min Intervall im Bereich von pH 6 und pH 8 durchgeführt. Es wurden dafür abwechselnd definierte Mengen an HCL bzw. NaOH Lösung zugegeben. Das Medium wurde nicht vollständig ausgetauscht, um die Verhältnisse in dem Zellkultursystem besser abzubilden. Eine konventionelle pH-Glaselektrode (InLab micro-pH Elektrode, Mettler-Toledo GmbH, Gießen) wurde als Referenzsystem verwendet. Während des in Abbildung 4-37 dargestellten Experimentes wurden die Sensorpotentiale kontinuierlich gemessen, wobei die Sensorpotentiale als auch die Messwerte der pH-Glaselektrode eine kontinuierliche pH-Verringerung zeigten.

Die Anstiege der linearen Fitfunktionen zur Bestimmung der Sensitivität lagen bei $-24,8 \pm 0,8$ mV/pH für die 20 nm und $-25,6 \pm 0,9$ mV/pH für die 60 nm pH-Sensoren. In diesem Experimentansatz über drei pH-Stufen wurde keine Hysterese beobachtet. Dies

entsprach den Erwartungen, da es sich mit dem Modell von Köhler und Landgraf deckt, welche ein ähnliches Verhalten bereits beschrieben haben [181].

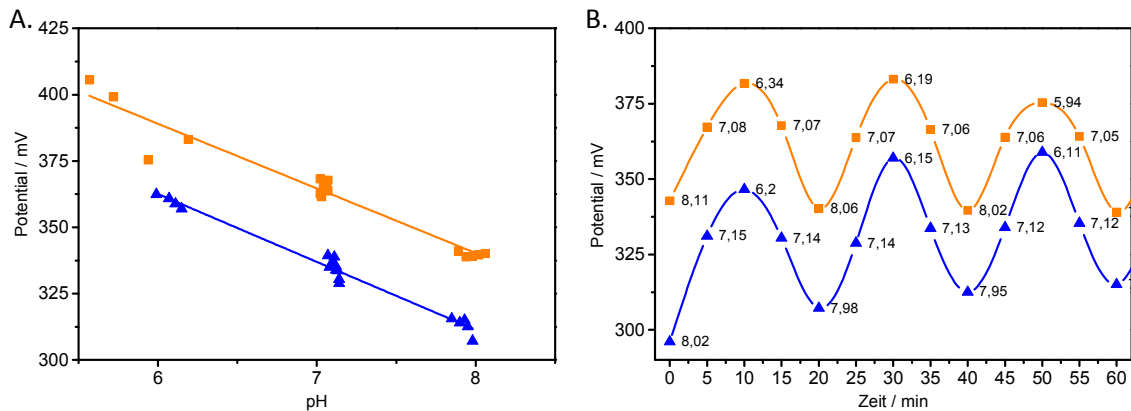


Abbildung 4-37: Darstellung der Potentiale bei sich wiederholenden Messungen.

20 nm Sensoren (orange Quadrate) und 60 nm Sensoren (blaue Dreiecke), A.: Potentiale gegen die mit der Referenzelektrode (Glass pH Elektrode) bestimmten pH-Werte. B.: Darstellung des Messverlaufes

Nachdem die Angleichung der Sensorsensitivitäten gezeigt hatte, dass der Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Schichtdicken in diesem Messmodus vernachlässigbar ist und ein erheblicher Teil der 20 nm Sensoren nur noch bedingt funktionierten, wurden nur noch 60 nm Sensoren genutzt bzw. nur noch Wafer mit dieser Schichtdicke bestellt. Die Ursache für den Ausfall der 20 nm Sensoren war die Auflösung der pH-sensitiven Schicht!

Die neuen Sensoren wurden gereinigt und vor Benutzung mind. 2 Tage in Aqua dest. gelagert. Die in Abbildung 4-38 dargestellte Messung mit 10 min Intervallen eines unbenutzten 60 nm Sensor, zeigt die hervorragende Sensitivität. Bei Bestimmung der Potentiale wie zuvor, 5 min nach der pH Änderung, zeigte sich eine Sensitivität von $-53,37 \pm 4,04$ mV/pH, während für die Potentiale 10 min nach der pH Änderung sogar $-55,11 \pm 3,87$ mV/pH berechnet wurden. Neben den hohen Potentialdifferenzen zeigen die steilen Flanken in Abbildung 4-38, dass die Sensoren sich sehr schnell auf pH-Änderungen einstellen können. Eine Hysterese ist bei diesen Messungen ebenfalls nicht erkennbar. Bei kürzeren Einstellzeiten (<120s) wurde dieser Effekt aber nachweisbar.

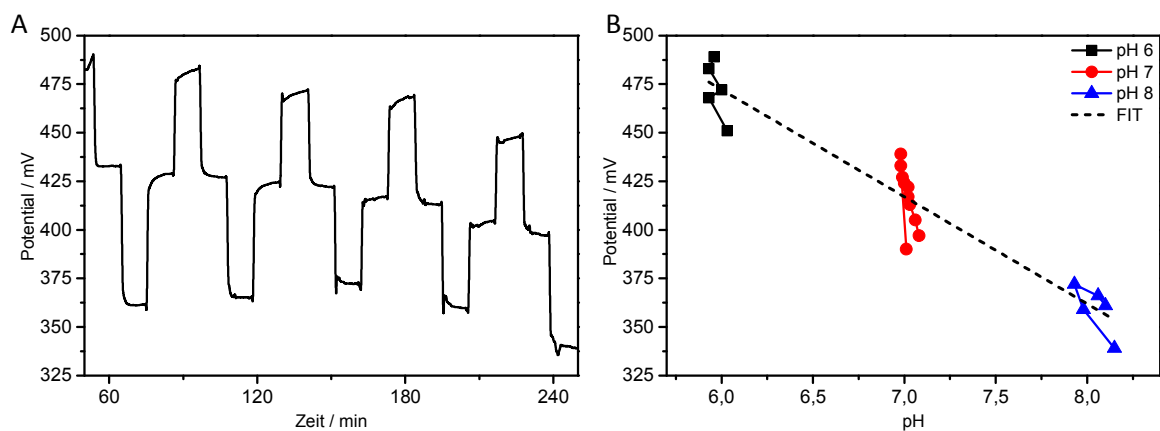


Abbildung 4-38: Wiederholte Messungen mit GeSiM-Chip im pH Bereich von pH 6 bis pH 8.

A: Verlauf der Messungen (Auflösung 0.5s, OCP), B: Darstellung der Potentiale gegen die pH-Referenzelektrode (Einstabmesskette). Lineare Fitfunktion (gestrichelte Linie) zur Bestimmung der Sensitivität ($-55,11 \pm 3,87$ mV/pH)

4.6.2.4 Langzeitstabilität

Messungen mit mehreren Sensoren von 60 nm Schichtdicke zeigten eine sehr gute Langzeitstabilität (siehe Tabelle 3). Die Messung erfolgte am 8-Kanal Multiplexer (MUX) von Presens, um die möglichen Einflüsse der Elektronik mit berücksichtigen zu können. Aufgrund Messungen die Dr. Carsten Tautorat durchgeführt hatte (siehe Diskussion Elektronik) wurden die Sensoren invertiert angeschlossen, wodurch sich das Vorzeichen änderte. Auch die pH-Glaselektrode, welche als Referenzsystem diente, wurde invertiert angeschlossen, um die Werte vergleichen zu können. Die Messung erfolgte in einem faradayschen Käfig für 60 h in pH Messpuffer mit pH 9. Es zeigte sich, dass die Sensoren eine Drift in derselben Größenordnung wie die pH-Glaselektrode hatten, wobei die Richtung variieren konnte. Auch zeigte sich, dass die Potentialdifferenzen zwischen den Sensoren eines Chips nicht auf unzureichende Equilibrierungszeiten, sondern auf fertigungstechnische Ursachen zurückzuführen sein dürften, da sich die die Werte angleichen (Tabelle 3).

Sensor	1	2	3	Referenz
Potential bei t=0 (pH 9)	-210 mV	-213 mV	-243 mV	93 mV
Potential bei t=60 h (pH 9)	-207 mV	-216 mV	-234 mV	89 mV
Differenz 60 h	+3 mV	-3mV	+9 mV	-4 mV
Berechnete Drift pro Stunde (Linearer Fit)	0,118 mV/h	-0,037 mV/h	0,151 mV/h	-0,059 mV/h
Standardfehler	±0,005 mV/h	±0,008 mV/h	±0,003 mV/h	±0,001 mV/h

Tabelle 3. Potentiale von 3 Sensoren und einer pH Glaselektrode in pH 9 Puffer für 60 h gemessen. Angeschlossen via Multiplexer im 10 Minutentakt gemessen vs. Ag/AgCl Referenzelektrode mit invertiertem Anschluss gemessen.

Die Wiederholungen der Messungen erfolgten über 6 Tage bei 3 verschiedenen pH-Werten (je pH Wert, 48 h) um zu überprüfen, ob die Driftgeschwindigkeit vom pH-Wert abhängt. Dafür wurde die Messungen wie oben beschrieben durchgeführt und das Medium stufenweise von pH 5 auf pH 9 in Schritten von 2 pH Stufen geändert und das Potential über 48 h aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass die Sensoren auch im Vergleich mit der pH-Glaselektrode bei unterschiedlichen pH-Werten und Anschluss am MUX stabil blieben.

4.6.2.5 Beschichtungseinfluss

Um den Einfluss der Beschichtung auf die Sensitivität und das Signalverhalten zu überprüfen, wurden die V2-Sensoren (GeSiM) mit und ohne PDL-Beschichtung gemessen. Die Messungen erfolgten in Standardlösungen im Becherglas ohne Spülen der Chips. Es konnte kein Einfluss auf die Sensitivität des Sensors festgestellt werden. Die Kurvenverläufe waren vergleichbar und die Sensoren erreichten nach 300 s mit $-44,07 \pm 2,81$ mV/pH (unbeschichtet) bzw. $-45,75 \pm 3,7$ mV/pH (beschichtet) vergleichbare Endwerte (Abbildung 4-39). Allerdings zeigten die Experimente, dass sich die Einstellzeit verlängerte. Dadurch kam es auch zu einer verstärkten Abweichung der Messwerte in Abhängigkeit von der Messrichtung (Hysterese). Kontrollmessungen mit bis zu 600 s zeigten sogar höhere Sensitivitäten für beschichtete Sensoren (unbeschichtet: $-44,6 \pm 2,4$ mV/pH, beschichtet: $-48,7 \pm 1,1$ mV/pH).

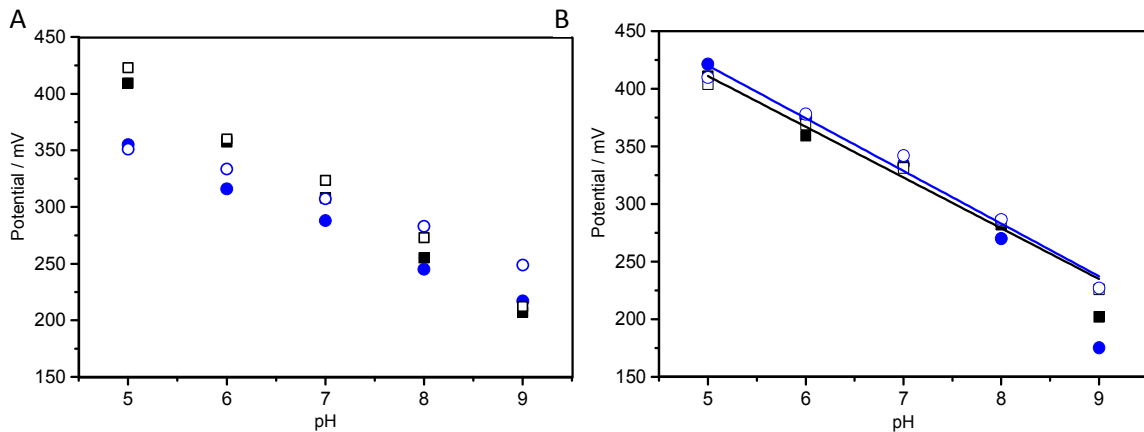


Abbildung 4-39: Beschichtungsmessungen mit 60 nm Sensor.

Unbeschichteter (Quadrate) und mit PDL beschichteter (Kreise) Chip, beginnend mit Wechsel von pH 9 nach pH 5 (gefüllte Symbole) und von pH 5 nach pH 9 (offene Symbole). A: Messungen 120 s nach Wechsel des Puffers, B: Messungen 300 s nach Pufferwechsel. Die Regressionsgeraden wurden aus den Werten für den Durchlauf von pH 5 nach pH 9 berechnet. Die Steigungen betragen $-45,75 \pm 3,7$ mV/pH für den beschichteten Sensor (blaue Linie) und $-44,07 \pm 2,81$ mV/pH für den unbeschichteten Sensor (schwarze Linie).

4.6.3 Sensoren der SLV-Chips mit gesputtertem Si_3N_4

4.6.3.1 Fertigungsabweichungen

Testversuche mit Si_3N_4 besputterten Elektroden hatten gezeigt, dass die so erzeugten pH-Sensoren ein vergleichbares pH-sensitives Verhalten besitzen, wie die von GeSiM mit PE-CVD hergestellten Sensoren. Damit ließen sich die auch die pH-Sensoren vollständig in Eigenfertigung in Rostock realisieren.

Die SLV-Chips wurden wie beschrieben mit pH-sensitiven Schichten besputtert. Die Färbung der sensitiven Layer variierte zwischen dem erwarteten Blauton und einem violetten Farbton. Der violette Farbton war nur bei den zum Rand nächstliegenden Sensoren anzutreffen. Auf dem Maskenträger befindliche Sonderöffnungen (siehe Abbildung 3-1) mit gleichmäßigem Abstand zum Rand hin, dienten der Überprüfung einer gleichmäßigen Beschichtung.

Sechs Chips wurden durch die Firma Epsa (EPSa Elektronik & Präzisionsbau Saalfeld GmbH, Deutschland) kontaktiert und nach einer Reinigung und 2-tägiger Lagerung in Aqua dest. auf Ihre Funktionsfähigkeit und Sensitivität getestet. Die Chips wurden dafür nacheinander in Standardpufferlösungen mit pH-Werten von pH 9, pH 7 und pH 5 gestellt und das Potential jedes Sensors für 600 s aufgezeichnet. Die Messung erfolgte aufgrund der Berücksichtigung der richtungsabhängigen Sensitivität nur von pH 9 in Richtung pH 5. Die aus diesen Werten (Abbildung 4-40) berechnete Sensitivität der Sensoren betrug bei Raumtemperatur $-53,8 \pm 1,8$ mV/pH, verglichen mit dem theoretischen Optimum von -59 mV/pH (20°C) ein guter Wert.

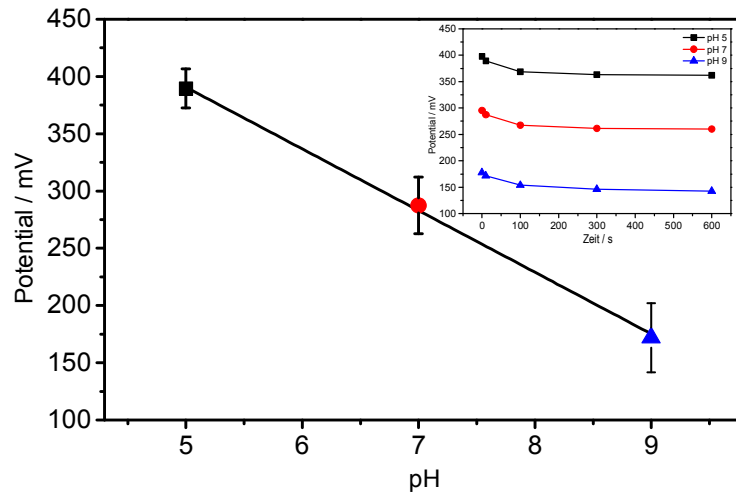


Abbildung 4-40: Messwerte der selbstgefertigten pH-Sensoren auf den Chips nach 10 s in Messlösung. Messung in Lösungen mit absteigendem pH-Werten von pH 9, pH 7 und pH 5. Inset: Darstellung der Potentiale bei ausgewählten Zeiten zur Verdeutlichung des Potentialverlaufes. Nach 600 s bei Raumtemperatur, über alle Sensoren gemittelte Potentiale: $171,8 \pm 30,3$ mV (pH 9), $287,3 \pm 24,7$ mV (pH 7) und $389,5 \pm 17,0$ mV (pH 5).

4.6.3.2 Wiederholgenauigkeit

Bei den Wiederholungsmessungen zeigten die selbst hergestellten Chips vergleichbare Ergebnisse wie die GeSiM-Chips. Die Sensoren wiesen allerdings geringere Sensitivitäten ($-45,83 \pm 1,17$ mV) auf als die konventionell hergestellten Chips. Bei den Experimenten zeigte sich zudem eine verzögerte Einstellzeit, was der Hauptgrund für die festgestellte geringere Sensitivität sein kann. Eine Sensordrift war in diesen Experimenten hingegen nicht erkennbar. Die Erhöhung der Einstellzeiten zur besseren Bestimmung der Sensitivität wäre möglich, würde aber die Vergleichbarkeit mit den Messungen der GeSiM-V2-Chips reduzieren. Die bereits beschriebene, beobachtete Korrelation zwischen besserer Stabilität und langsamerer Einstellzeit scheint sich hier durch eine, im Vergleich zu den GeSiM-Chips, höhere Wiederholgenauigkeit bei verlangsamer Einstellzeit zu manifestieren.

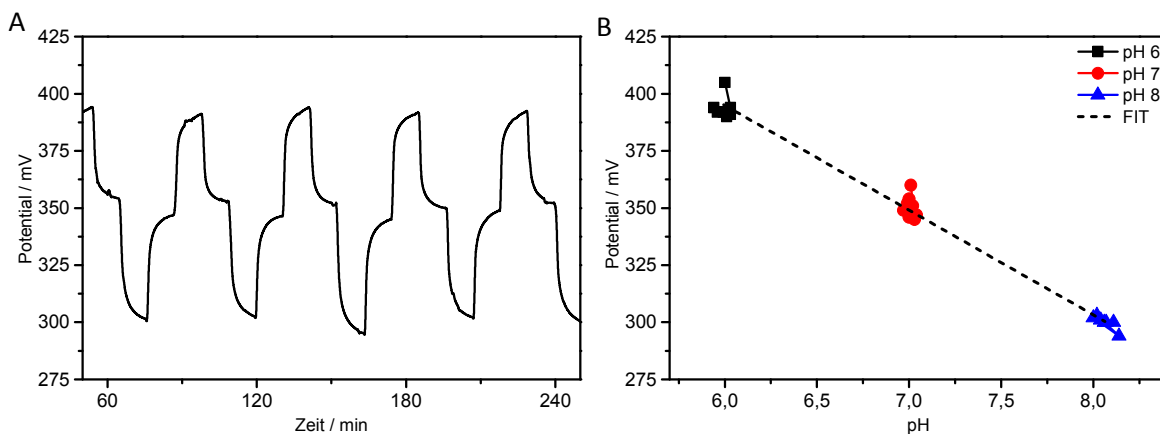


Abbildung 4-41: Wiederholte Messungen mit SLV-Chip im pH Bereich von pH 6 bis pH 8. A: Verlauf der Messungen (Auflösung 0.5s, OCP, 600 s Einstellzeit), B: Darstellung der Potentials gegen die pH-Referenzelektrode (Einstabmesskette). Lineare Fitfunktion (gestrichelte Linie) zur Bestimmung der Sensitivität ($-45,83 \pm 1,17$ mV/pH)

4.6.3.3 Einfluss der Elektronik, Multiplexing und Störungsanfälligkeit

Neben der Charakteristik der Sensorschichten an sich, muss auch der Einfluss der Elektronik auf die Messungen berücksichtigt werden. Es zeigte sich bei den Messungen mit

dem Bionas-System, dass die Elektronik die Sensoren stark belastet. Da sich die Elektronik auf das durch den Sensor gelieferte Potential einstellen musste, konnte die Einstellung erheblich verzögert werden, bzw. litt die Stabilität darunter. Für das Bionas-System wurde ein entsprechender Multiplexer mit vorgeschaltetem Impedanzwandler am Lehrstuhl für Biophysik gefertigt. Dieser war nicht mit den PalmSens-Messgeräten kompatibel.

Mit den PalmSens-Messgeräten wurden die Messungen störungsunempfindlicher wenn ein invertiertes Anschlussschema, mit der Referenzelektrode an dem Arbeitselektrodenanschluss und dem Sensor an dem Referenzelektrodenanschluss verwendet wurde. Zwar invertierten sich damit die Vorzeichen, was nachträglich korrigiert werden musste, aber der Betrag der Potentialänderungen blieb nahezu gleich.

Bei Verwendung des 8-Kanal MUX für die PalmSens Geräte zeigte sich zudem eine erhebliche Verzögerung der Einstellzeiten der Sensoren. Dies wird wahrscheinlich durch die zwischengeschaltete Elektronik und die damit verbundenen Kapazitäten, die bei einer Potentialänderung erst umgeladen werden müssen, hervorgerufen. Hier muss für die Optimierungen der zukünftigen Messungen versucht werden die Belastung der Sensoren durch den Einbau eines Impedanzwandlers zu reduzieren. Dieser würde den hochohmigen Sensor vor der Belastung durch die Elektronik bewahren.

4.6.4 Zusammenfassung pH-Sensoren

Die Verwendung von Si_3N_4 als sensitiver Schicht in potentiometrischen Sensoren ist möglich. Die Sensoren zeigen hohe Sensitivitäten und gute Wiederholgenauigkeiten. Die Hysterese, welche beobachtet werden konnte, ist nach Redlin [187] proportional zur Größe der pH-Wertänderung. Eine nähere Beschreibung des Phänomens, mit dem Verweis auf die Richtungsabhängigkeit der Einstellzeiten findet sich in der Arbeit von Köhler und Landgraf [181]. Diese erklären das Verhalten mit der Theorie der vergrabenen OH^- und NH_2 -Gruppen, welche die Gleichgewichtseinstellung zwischen Wasserstoffionenkonzentration und reaktiven Gruppen an der Oberfläche der sensitiven Schicht verzögern.

Da aber in Zellkultur keine pH-Shifts über mehrere pH-Stufen in kurzen Zeiträumen auftreten bzw. diese durch entsprechende Auswahl des Puffers reduziert werden können, ist dies unter dem Aspekt der Überwachung der Zellkultur unproblematisch. Für die unmittelbare Messung der pH-Wertänderung (z. B. bei Wirkstofftests), vergleichbar dem BIONAS® 2500-System, ist der Effekt aufgrund der geringen Änderungen und einem Messzyklus von ca. 5 min (wie im BIONAS® 2500-System verwendet) zu berücksichtigen.

Die für die Sensoren gezeigte Stabilität und die geringe Drift (siehe Tabelle 3) erhöhen die Reproduzierbarkeit bzw. die Verwendbarkeit der Sensoren für die Dauerüberwachung von Zellkulturen. Allerdings zeigen die Sensoren mit zunehmender Gebrauchsdauer sowohl abnehmende Maximalpotentiale, als auch abnehmende Sensitivitäten.

Dieser Effekt wurde zuerst auf die Einflüsse der Zellen zurückgeführt, da er bei Sensoren auffiel die in der Zellkultur verwendet wurden. Später zeigte sich dies aber auch bei Sensoren die über längere Zeiten in PBS bzw. Medium gelagert worden waren, bzw.

häufig ohne Zellen gemessen wurden. Tatsächlich liegt dem Effekt die Auflösung der Si_3N_4 -Isolatorschicht zugrunde. So änderte sich die Farbgebung der sensitiven Schicht von blau (60 nm) über rot (40 nm) bis zu Sensoren die gar keine erkennbare Passivierung mehr besaßen. Dass dieser Effekt kein einfacher Alterungsprozess ist, lässt sich an Sensoren erkennen, welche zum Teil durch PDMS abgedeckt waren. Die Auflösung der Schichten wurde auch von Redlin in seiner Dissertation beschrieben, wobei er für Si_3N_4 Auflösungswerte von $0,17 \pm 0,02$ nm/h bei 76°C angab [187]. Eine 60 nm Schicht wäre bei diesen Werten nach ca. 352 h (ca. 14 d) aufgebraucht worden. Sensoren die in Kultur verwendet wurden, zeigten nach ca. 4 Wochen Nutzungszeit, bei 37°C instabile Signale. Bei optischer Kontrolle, zeigten die Sensoren zudem eine sehr helle Färbung der sensitiven Schicht. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nach dieser Zeit die funktionale Schichtdicke unterschritten wird.

Eine potentielle Möglichkeit zur Regeneration für die selbstgefertigten Chips wäre das Neubesputtern der Chips mithilfe der Sputtermaske. Dafür müssten sie aber von der Mikrofluidik und möglicherweise auch von der Flex-Platine abgetrennt werden, weswegen dies nicht mehr untersucht wurde. Eine weitere Erklärung für die abnehmende Sensitivität liefert das Site-Binding Modell und die in Abschnitt 2.3.2.2 erläuterte Abhängigkeit der Sensitivität vom Mengenverhältnis der Silanolgruppen zu den Aminogruppen [195]. Dieses Verhältnis könnte sich durch chemische Reaktionen während der Nutzung der Sensoren geändert haben, beispielsweise durch die Auflösungsreaktionen der Schicht aber auch durch Zell-, bzw. Enzymaktivität.

Die Ergebnisse der Beschichtungsmessungen entsprachen den Erwartungen. Der Einfluss auf die Einstellzeit lässt sich durch die veränderte Oberflächenladung (positive Grundladung) des PDL erklären, welche die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Sensoroberflächenladung und H^+ -Ionenkonzentration im Medium verzögert. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass die hohe Anzahl an Aminogruppen des PDL einen puffernden Effekt besitzen, wodurch sich der pH-Wert an der Chipoberfläche geringfügig von dem im Volumen unterscheidet. Eine Diffusionslimitierung durch die PDL-Schicht kann ebenfalls ein Grund für die verzögerte Einstellzeit sein. Für die Messungen in Kultur ist der Effekt unproblematisch, da die Messzeiträume wesentlich über den Einstellzeiten liegen. Dennoch sollte wenn möglich auf Beschichtungen verzichtet werden, da auch die Ablösung des PDL während der Kultur eine potentielle Fehlerquelle ist.

Viele der untersuchten Eigenschaften der pH-Sensoren stimmen mit den Eigenschaften von Si_3N_4 -ISFETS überein. Somit ist die Nutzung in Form potentiometrischer Sensoren ebenfalls möglich, wobei die Einschränkungen in Bezug auf Sensitivität und Stabilität dieselben sind, wie für die auf Si_3N_4 basierenden ISFETs.

4.6.5 Interdigitierende Elektrodenstrukturen (IDES)

4.6.5.1 Messungen mit V1-Chips

Für die Versuche mit den GeSiM-V1-Chips und den zwei verschiedenen IDES Typen mit 30 μm bzw. 50 μm Fingerabstand, wurden die Zellen zuerst in offenen Trögen kultiviert, um die Charakterisierungsexperimente durchzuführen [259]. Die Zellen wurden über 11 Tage kultiviert. Durch die Zellproliferation änderten sich die $-\Delta C$ Spektren von beiden IDES Geometrien und die berechneten Peakmaxima korrelierten weitgehend mit der Zellzahl auf den Sensoren. Die grafische Darstellung der C_{PK} -Werte über die Proliferationszeit zeigt einen sigmoidalen Verlauf, welcher mit der Verhulst-Pearl Gleichung (3.2) gefittet werden konnte (Abbildung 4-43B) [260]. Auffällig war ein häufiger Einbruch des C_{PK} -Wertes an Tag 2. Ein möglicher Grund ist die Kontraktion der Zellen am Ende der Lag-Phase vor dem Übergang in die exponentielle Wachstumsphase. Die Werte an Tag 2 wurden daher bei Anwendung der Fit-Funktion nicht berücksichtigt. Die nachfolgenden Änderungen der C_{PK} -Werte, waren auf die Änderung der Zellzahl infolge der Proliferation zurück zu führen. Unterschiede zwischen den IDES-Geometrien waren nicht erkennbar, bis auf eine leicht höhere Streuung der Werte der 30 μm IDES (Abbildung 4-43).

Davon abgesehen waren die Ergebnisse der 30 μm und der 50 μm IDES sehr ähnlich in Hinblick auf die Sensitivität, die Form der $-\Delta C$ -Spektren und der daraus abgeleiteten Darstellung der C_{PK} -Werte über die Zeit. Ein Vergleich der durchschnittlichen C_{PK} -Werte nach 11 Tagen in Kultur zeigen geringfügig, aber dennoch signifikant (Mann-Whitney rank-sum test; $P < 0.05$), höhere Werte für die 50 μm IDES ($13,89 \pm 1,31$ nF) gegenüber den 30 μm IDES ($13,29 \pm 1,67$ nF) für die konfluenten Zelllagen. Es wurde überprüft, ob die Verteilung der Zellen auf dem Chip ein Grund für die Differenz sein könnte. So liegt einer der 30 μm IDES abseits der anderen Sensoren (Abbildung 4-1 unten rechts), welche symmetrisch angeordnet sind. Nach der Zelleinsaat im Zentrum des Chips, zeigte dieser Sensor deswegen einen langsameren Signalanstieg. Nach 4 Tagen in Kultur, hatten die C_{PK} -Werte zu den Werten der anderen 30 μm Sensoren aufgeschlossen.

Es ist wahrscheinlich, dass die Variation zwischen den 30 μm und den 50 μm IDES nicht durch elektrische Feldeffekte verursacht wird, da die Messzeiten relativ kurz waren (ca. 5 min pro IDES pro Tag) und die Feldstärke nur ca. 5/3 höher war als bei den 50 μm Sensoren. Um diesen Effekt grundlegend ausschließen zu können, benötigt man Experimente mit stärker divergierenden Geometrien oder höhere Messspannungen.

Ein weiterer Grund der auch durch mikroskopische Beobachtung gestützt wird, ist eine schlechtere Zelladhäsion über den IDES (Abbildung 4-42). Obwohl bei den Versuchen PDL als Beschichtung verwendet wurde, könnte dies auf dem Glas, welches zwischen den Fingern frei liegt bzw. auf den IDES Fingern (Platin), schlechter halten als auf dem Si_3N_4 der Passivierung.

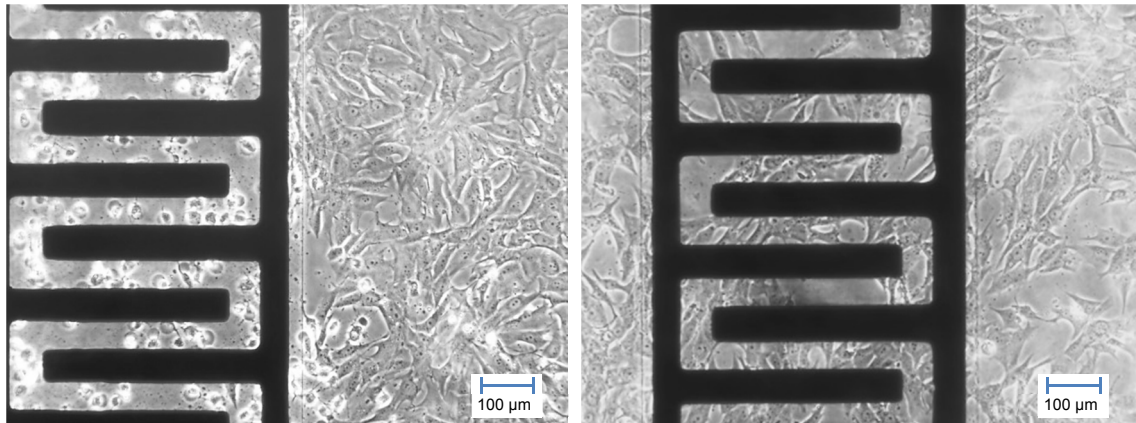


Abbildung 4-42: IDES Messungen im Fluidiksystemen (4A-OB).

Darstellung von zwei verschiedenen IDES mit PDL Beschichtung und Bewuchs nach 1 Tag in Kultur. Links: erheblich reduzierte Zellzahl, Rechts: gleichmäßiger Bewuchs

Für die Dateninterpretation durch Formel (3.2) wurden die C_{PK} -Werte jedes Chips für die vier 30 μm IDEs und die vier 50 μm IDEs gemittelt und gegen die Tage in Kultur aufgetragen. Die Werte jedes Chips wurden mit der Formel (3.2) gefittet, um die spezifischen Parameter (Verdopplungszeit, C_{PK}^{min} , C_{PK}^{max}) für jeden Chip und jede IDES Geometrie zu bestimmen (Kurven in Abbildung 4-43 B). Danach wurden die so erhaltenen Parameter der einzelnen Chips und IDES Geometrien gemittelt (Tabelle 4, Spalten B). Dieser Ansatz der Datenaufbereitung wurde mit dem üblichen Ansatz, dem Poolen aller Werte der 30 μm und der 50 μm Chips vor dem Fitten, verglichen (Tabelle 4, Spalten A).

	30- μm IDES				50- μm IDES			
	A		B		A		B	
C_{PK}^{min} [nF]	1.14	± 1.60	0.94	± 0.65	0.93	± 1.09	0.61	± 0.51
C_{PK}^{max} [nF]	13.69	± 3.43	13.29	± 1.67	14.77	± 2.03	13.89	± 1.31
T [d]	1.21	± 0.47	0.97	± 0.19	1.00	± 0.28	0.69	± 0.18

Tabelle 4. Mit Formel (3.2) gefittete Parameter der gepoolten Daten der verschiedenen IDES Typen.

Für beide IDES Strukturen führte das Poolen aller Chips zu verlängerten Verdopplungszeiten und höheren Standardabweichungen, als wenn die Mittelwerte der Parameter der einzelnen Chips gebildet wurden. Der Grund liegt in der Variation der individuellen C_{PK} -Werte. Während einige IDES einen schnellen C_{PK} Anstieg nach Zelleinsaat zeigten hatten andere eine längere Lag-Phase. Bezugnehmend auf Formel (3.2) kann man das als Shift auf der Abszisse interpretieren bzw. als unterschiedliche Startzeiten für die Zellproliferation interpretieren. Solche Daten zu poolen, führt dann zu verzerrten Werten und der mittlere Anstieg für die C_{PK} -Werte scheint dann im Verhältnis zu den individuellen C_{PK} -Anstiegen reduziert.

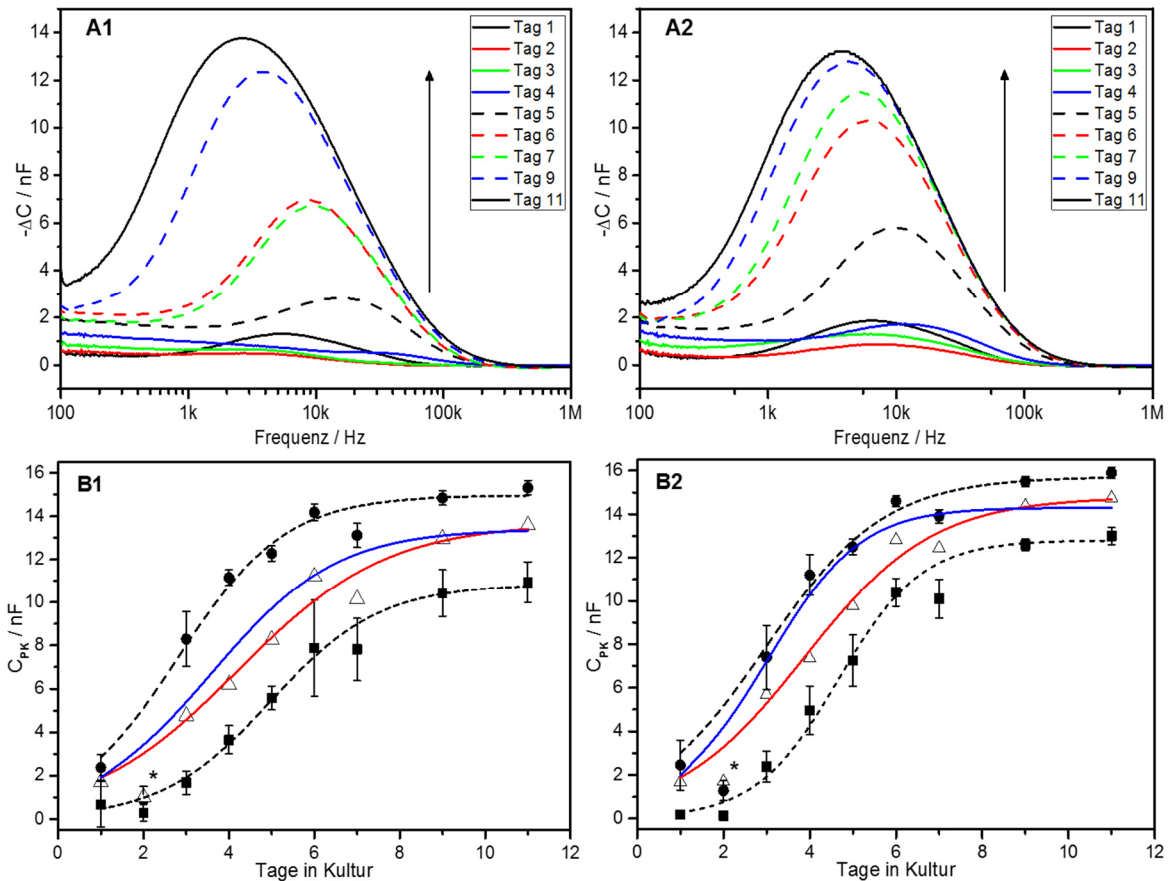


Abbildung 4-43: Änderung der Kapazitätsdifferenz ($-\Delta C$) und C_{PK} -Werte der Messungen über 11 Tage in Kultur.

(A1,A2) Typische Kapazitätsdifferenzen zwischen zellfreier Referenz und den Kapazitäten während der Zellkultur (A1) 30 μm IDES, (A2) 50 μm IDES. (B1, B2) Die C_{PK} -Werte (d.h. die $-\Delta C$ Maximalwerte, siehe Text) der Spektren von 5 Chips mit vier 30 μm und vier 50 μm IDES. Gemittelt für die 30 μm IDES (B1) und die 50 μm IDES (B1). Zum Vergleich sind die Kurven (gestrichelte Linien) für die höchsten (Kreise) und niedrigsten C_{PK} -Mittelwerte (Quadrate) aufgetragen, um die Grenzen der beobachteten Zellproliferation darzustellen. Zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Parameterbestimmung basierend auf der Verhulst-Pearl Funktion wurden getestet. Die Parameter von Spalte A aus Tabelle 4 erhält man, wenn die Daten aller Chips für ein IDES Design gepoolt werden (rote Linie). Die Daten in Spalte B der Tabelle 4 entsprechen den Mittelwerten, der pro Chip, separat gefitteten Werte (blaue Linie). Die Daten von Tag 2 wurden für die Fits nicht berücksichtigt.

Der Grund für die Variabilität der C_{PK} -Kurven ist wahrscheinlich hervorgerufen durch die relativ schmalen Flächen auf den IDES im Verhältnis zu der gesamten Chipfläche. Ihre Belegung durch Zellen ist abhängig von Ihrer Position innerhalb der Mikrofluidik. Durch die zufällige Verteilung während der Zellaussaat führt dies zu großen Anfangsvariationen der Zellzahl auf den verschiedenen IDES und somit zu unterschiedlichen Signalen. Dies führt zu drei Szenarien für die Zellproliferation:

1. Im Idealfall verteilen sich die Zellen normalverteilt mit wenigen Zellen auf jedem IDES, sodass ihr Wachstum auf allen IDES zu einem idealen Verhulst-Pearl Verhalten mit T als der realen Zellteilungsrate führt.
2. Nach Einsaat finden sich besonders viele Zellen auf dem IDES, wodurch der Anfangswert wie oben beschrieben verzerrt wird und der IDES nahezu maximal bedeckt ist. Dies würde zu einem stark reduzierten Anstieg führen da die Zellen in die stationäre Phase übergehen.

3. Im dritten Fall würden nach der Aussaat keine Zellen auf dem IDEs adhären. Die Zellen würden jenseits des IDEs bis zur Konfluenz wachsen und den IDEs als sich bewegende Zellfront überwachsen. Die C_{PK} -Daten des IDEs entsprächen dann einer sehr langen Lag-Phase mit einer sehr schnellen Wachstumsphase bis zur Konfluenz, wobei T wesentlich kürzer wäre als die reale Zellteilungsrate.

Am besten ließe sich das Problem der Bestimmung der korrekten Zellteilungsraten mit sehr großflächigen IDEs bestimmen. Idealerweise müsste ein einzelner IDEs die gesamte Oberfläche des Chips abdecken. Andererseits ermöglichen verteilte IDEs die Beschreibung des Wachstumsverhaltens bzw. der Verteilung der Zellen auf den Chipoberflächen.

Darüber hinaus beeinflussen verschiedene zellphysiologische Parameter die beobachteten C_{PK} -Daten. Nach Zellaussaat sind die größten Effekte hervorgerufen aus der Anzahl an Zellen, welche auf den IDEs adhären sowie ihrer Größe und Form. Die folgende Verteilung und Proliferation ist dann durch Oberflächeneigenschaften, wie z. B. Beschichtungen (hier die PDL Schicht) und durch die Fähigkeit der Zellen native Adhäsionsmoleküle zu sekretieren, beeinflusst. Solche Moleküle konditionieren das Medium und verbessern die Zelladhäsion, erhöhen die Proliferationsrate und möglicherweise auch die Werte für die Endplateaus. Die Endplateaus scheinen mit den Anstiegen der C_{PK} -Werte (Abbildung 4-43 B) zu korrelieren, wobei aber der Einfluss der PDL Schichtdicken auf die Anstiege noch zu klären ist.

4.6.5.2 Messung in Systemen mit V2-Chips

Die mit den V2-Chips in den Mikrofluidiksystemen (4A-S, Abbildung 4-10) durchgeführten IDEs-Messungen zeigten bei kontinuierlichem Bewuchs ähnliche Ergebnisse wie die Messungen in den Trögen. Allerdings war die Realisierung über längere Zeiträume problematisch. So schwankten die Zellzahlen bzw. die Bedeckung der IDEs erheblich. Die längste Kultur mit Zellzahlmessung mit den IDEs in dem System mit Blöcken (4A-S) lief über 8 Tage. Bei den meisten Experimenten brachen die Werte spätestens nach Tag 4 in Kultur ein. Die mikroskopische Kontrolle lieferte auch den Nachweis, dass sich die Zellen über der Struktur abgelöst hatten. Die Messungen im Speicher verliefen am besten, was einen sehr eindeutigen Hinweis auf den Einfluss der Fluidik liefert, da dies die einzige großflächige Wachstumszone darstellte. Ein häufig beobachtetes Phänomen war die wellenartige Zunahme der Werte, was möglicherweise durch morphologische Veränderung der Zellen vor Zellteilungen hervorgerufen wird. Eine Ursache für das schlechte Wachstum, bzw. das Ablösen der Zellen in den Systemen könnte der Mediumstrom während des Mediumwechsels sein. Die Blasenbildung bzw. ihre Bewegung durch das System könnte ebenfalls einen Einfluss gehabt haben. Die Scherkräfte sowie die Unterversorgung durch Verstopfung von Kanälen führen dann zur Ablösung der Zellen. Die Ablösung konfluenter Zellverbände ist durch eine geringere Adhäsion der Zellen an den Randbereichen des PDMS erklärbar. Da die Zellen bei Konfluenz einen zusammenhängenden Zellrasen bilden, führt die Ablösung am Rand durch Strömung oder Durchspülen von Blasen, zur Ablösung des gesamten Zellrasens. Ohne Beschichtung trat dieser Effekt in geringerem Maße auf. Dies kann aber mit der verringerten Proliferationsrate bzw. einem dadurch weniger dichten

Zellrasen erklärt werden. Die Zellen wuchsen langsamer, formten weniger dichte Zellrasen und bildeten dadurch schwächere Zell-Zell-Kontakte aus, sodass bei Abriss an den Kanten nur Teile der Zellrasen abgelöst wurden.

Zudem ist wahrscheinlich, dass die Zellen aufgrund der schlechteren Initialadhäsion, vermehrt eigene Adhäsionsmoleküle exprimieren und dadurch eine bessere Haftung an der Oberfläche hatten. Bei den Systemen mit Blöcken (2A, bzw. 4A-S, Abbildung 4-10) konnte deswegen kein Verhulst-Pearl entsprechendes Wachstumsverhalten gefunden werden. Zur näheren Betrachtung, bezüglich Wachstums der Zellen auf verschiedenen Oberflächen, sei auf Abschnitt 4.7.3 verwiesen. Bei mikroskopischen Betrachtungen zeigten die Zelllayer die häufigsten Ablösungen an den Kontaktzonen zwischen PDMS und Glas, weshalb die verringerte Adhäsion wahrscheinlich die Hauptursache für die großflächige Ablösung der Zellrasen ist.

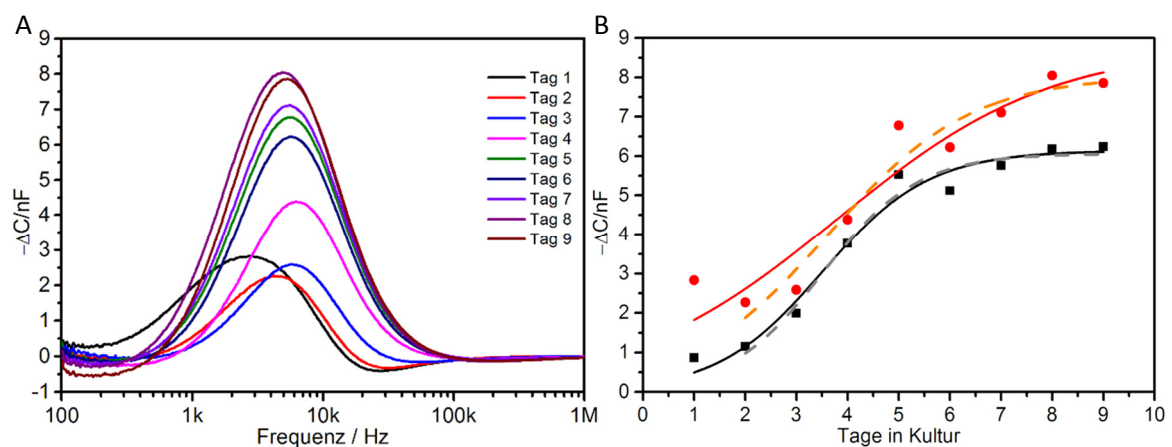


Abbildung 4-44: Ideale Messung in Kultursystem (4A-Sg) mit V2-Chip ohne Beschichtung.

A: Kapazitätsdifferenzen zu Tag 0 ohne Zellen. **B:** Aus **A** entnommene Werte für die Berechnung der Proliferation. Der standardmäßig verwendete 10 kHz-Wert (Quadrate) mit dazugehöriger Fitdarstellung (schwarze Linie) sowie die Maximalwerte (C_{PK} -Werte) (Kreise) mit dazugehörigem Fit (rote Linie). Fitdarstellung ohne Berücksichtigung von Tag 1 als hellere gestrichelte Linien. Der Tag 1 aufgenommen 4h nach Aussaat.

Bei Versuchen in den blockfreien Systemen (4A-Sg) wurden Kurven und C_{PK} -Werte mit vergleichbarer Charakteristik wie mit den V1-Chips gemessen (Abbildung 4-44). Eine Verschiebung der Peakmaxima wurde ebenfalls beobachtet, wobei die Auftragung der Differenzwerte bei 10 kHz, der üblicherweise verwendeten Arbeitsfrequenz [31,133,203,225,261] ebenfalls vergleichbare Werte erbrachte wie die C_{PK} -Werte (Abbildung 4-44 B). Die für die dargestellten Kurven berechneten Verdoppelungszeiten (T), betragen $0,72 \pm 0,12$ Tage für 10 kHz Messung bzw. $1,45 \pm 0,45$ Tage für die C_{PK} -Werte. Bei Nichtberücksichtigung von Tag 1 glichen sich die Werte an und betragen $0,64 \pm 0,12$ Tage respektive $0,96 \pm 0,24$ Tage. Dies korreliert mit den vom DSMZ angegebenen Zellteilungsrate für MC3T3 von 1-2 Tagen, was zeigt, dass dieses Verfahren für die Bestimmung des Zellwachstums verwendet werden kann.

Viele Messungen wiesen erhebliche Abweichungen von den Kurven in Abbildung 4-44 auf. Bei der Verwendung von Beschichtungen fand oft ein auch mit der Zeit zunehmender Einbruch der Kapazität zwischen 100 Hz und 1 kHz statt. Dieser trat gar nicht bzw. in erheblich geringerer Ausprägung auf, wenn keine Beschichtungen verwendet wurden.

Messungen ohne Beschichtung zeigten mit den V2-Chips maximale C_{PK} Werte von etwa 8 nF. Auch bei längeren Kulturzeiten überschritten die C_{PK} Werte diesen Wert nicht, sondern begannen um den Maximalwert zu schwanken. Bei Versuchen mit Beschichtung konnten auch für die V2-Chips höhere Werte beobachtet werden. Wahrscheinlich erreichen Zellen auf beschichteten Chips eine bessere Isolationsschicht auf den IDEs und somit höhere kapazitive Änderungen. Der unmittelbare Effekt der Beschichtung wird durch den Abzug der Leermessung von den Messungen mit Zellen kompensiert, weshalb für die Einbrüche <1kHz nachträgliche Veränderungen der Sensoroberfläche z.B. Anlagerungen oder Auflösung der Beschichtung die Ursache sein müssen.

Kapazitätsänderungen im Bereich zwischen 100 Hz und 1 kHz ohne Beschichtung, könnte auf Änderungen der Grenzfläche zwischen Elektrode und Medium (Ladungsänderung, Anlagerung, Ablösung etc.) zurück zu führen sein. Weitere Störquellen in den Messungen sind Mikrobblasen in der Nähe oder über den IDEs sowie Beeinträchtigungen der Doppelschicht durch Erschütterungen, Temperaturschwankungen oder Veränderung der PDMS Strukturen (Kontraktion) infolge des Handlings der Systeme. Nach Dr. Marko Stubbe, vom Lehrstuhl für Biophysik, kann die Einstellung bzw. Stabilisierung der Impedanz des Systems nach Erschütterung bis zu einer halben Stunde betragen (persönliche Kommunikation, siehe auch [262]). Dies erschwert wiederum eine Nutzung in einem stimulierten System. Die Auflösung von Oxidschichten, welche infolge der Reinigung entstanden sind und wie sie für Platinelektroden beschrieben wurden [26], wäre ebenfalls ein Grund für die Kapazitätsänderungen. Eine abschließende Beurteilung ist aufgrund der Komplexität und der vielen Parameter die in die Messung einfließen schwierig. Eine Punktmessung, statt der Messung eines Spektrums dürfte den Anforderungen für die Zellkultur (Messung der Zellzahlzunahme über die Zeit) wesentlich besser dienen und die Ausblendung der störenden Einflüsse ermöglichen.

4.6.5.3 Messungen mit den SLV-Chips

Die Messungen mit den SLV-Chips lieferten, bei gleichem Messmodus wie bei den V2-Chips, stark abweichende Ergebnisse. Ein Unterschied waren die C_{PK} -Werte, welche um 2 kHz lagen. Die Messungen zeigten zudem Einbrüche der $-\Delta C$ -Werte bei Frequenzen unterhalb von 1 kHz (Abbildung 4-45). Dies bedeutet, dass die Kapazitäten mit fortlaufender Dauer der Kultur unterhalb von 1 kHz zunahm. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits zuvor bei den V2-Chips beobachtet. Bei den SLV-Chips trat er besonders ausgeprägt auf. Es muss für diese somit ein fertigungstechnisches Problem in Betracht gezogen werden. Die höhere Rauigkeit dürfte ein Störfaktor sein, welcher durch die größere Fläche der IDEs verstärkt wird. Zudem könnten die Reste der Si_3N_4 -Passivierung, die während der Laserablation auf oder um die Platinstrukturen verblieben sind, einen Einfluss auf die Doppelschicht haben und somit die Ergebnisse beeinträchtigen. Die Abweichung der Signalformen und der Peak-Verteilung zu den V2-Chips war unerwartet. Entsprechend der Literatur [205,206] waren Unterschiede im Spektrum nur für unterschiedliche Zelltypen, nicht für unterschiedliche IDEs mit gleichen Fingerabständen, erwartet worden.

Ein Kontaktierungsproblem kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da dieses bei Wiederholungsmessungen oder nach Reinigung bzw. Umstecken der Kontakte nicht reproduzierbar gewesen wäre.

Die wellenartigen bzw. schwankenden Signalzunahmen über die Tage, auch bei Messungen ohne Beschichtungen, sind indes auf morphologische Änderungen während der Zellteilung (Abkugeln vor Teilung), partielle Ablösung oder die Verteilung der Zellen zurück zu führen. Daher liegt die Ursache hierfür nicht in der Sensorik.

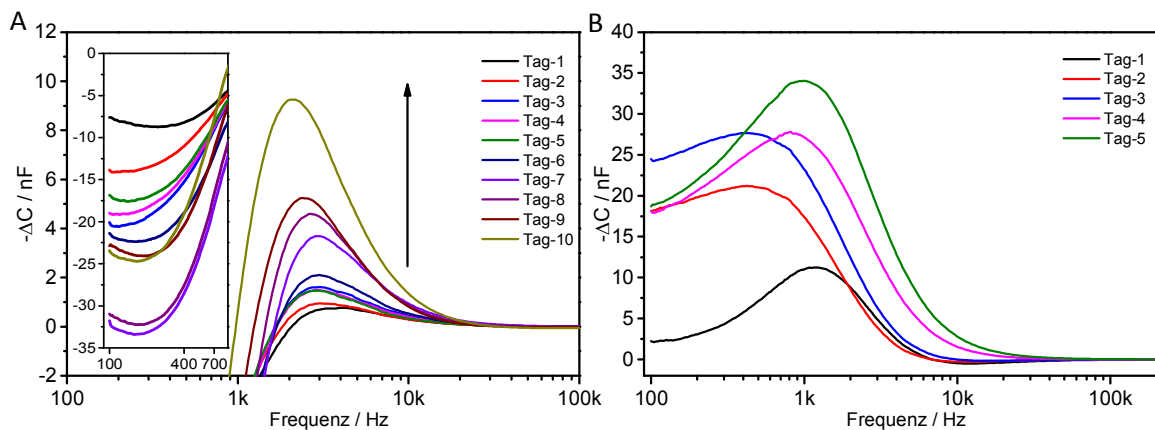


Abbildung 4-45: IDES Messungen mit den SLV-Chips im Stimulationssystem.

A: Messungen mit PDL-beschichteten Chips zum Vergleich mit vorherigen Chipgenerationen. Kultur bis zu 10 Tagen, Tag 1 entspricht erster Messung 4 h nach Aussaat. Inset: Bereich unterhalb von 1 kHz. **B:** Messung ohne Beschichtung über 5 Tage.

Die Sensoren funktionieren und sind vergleichbar zu denen der GeSiM-Chips, mit Ausnahme des Arbeitspunktes (Bereich der größten Signaländerung) der sich im Bereich zwischen 2 kHz und 3 kHz befindet. Bei der Entwicklung zukünftiger Chipsysteme muss dies für das Design berücksichtigt werden. Während eine Vergrößerung, zur besseren Flächenausnutzung sinnvoll erscheint, muss der geometrische Parameter, definiert durch die Kammerkonstante, vergleichbar mit dem kommerzieller Chips sein. Die Kammerkonstante wird in der Literatur kaum berücksichtigt, hat aber einen wesentlichen Einfluss auf den Messbereich des Systems [211,263]. Sie berechnet sich für planare IDES aus der IDES-Fläche, welche durch den mit π multipliziertem Abstand der IDES-Finger geteilt wird ($A/(d\pi)$, Persönliche Kommunikation M. Stubbe, Paper in Vorbereitung). Mit zunehmender Kammerkonstante sinkt der Frequenzbereich der sich ändernden Maximalwerte (C_{PK}). Für die V1-Chips beträgt die Kammerkonstante 1,18 mm, für die V2-Chips 2,10 mm und für die SLV-Chips 19,54 mm. Wie bereits bei den V2-Chips beschrieben, würde also eine Designänderung hin zu größeren Abständen den Arbeitspunkt zu höheren Frequenzen verschieben. Ein Signalabfall, wie er in Abbildung 4-45 A sehr deutlich auftritt, könnte sich auf das Messsignal nur noch gering auswirken.

In Zukunft könnten zur Bestimmung der Proliferation auch die Differenz bei einer festen Frequenz statt der Peakmaxima verwendet werden. Die Vergleichbarkeit beider Messvarianten konnte mit den V2-Systemen (Abbildung 4-44) gezeigt werden. Bei den SLV-Chips war dies wegen der Nähe zu dem durch die Doppelschicht beeinflussten Messbereich (<1kHz) und die dadurch verursachten Störungen nicht möglich. Aufgrund dessen unterlagen aber auch die Auswertungen der Peakmaxima hohen Schwankungen.

4.6.6 Referenzelektroden

Die als Referenzelektroden verwendeten Durchflusselektroden funktionierten weitestgehend problemlos. Sie sind dennoch als potentielle Fehlerquelle bei der

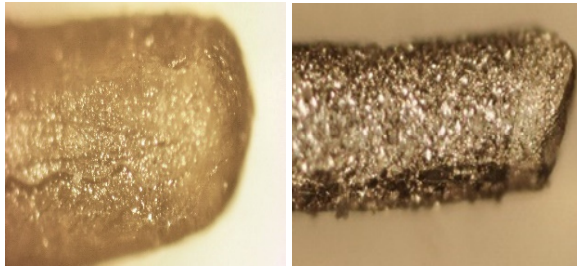


Abbildung 4-46: Aufnahme einer Referenzelektrode.
links neu; rechts nach >4 Wochen in Nutzung

Bewertung des Systems zu betrachten. Bei längerer Benutzung zeigten die Elektroden eine erhebliche Veränderung, welche sich im Verlust der grauen Silberchlorid-Schicht und der Ausbildung einer silberweißen Außenschicht zeigte. Da der Elektrolyt (3M KCl) regelmäßig erneuert wurde, ist die Ursache ungeklärt. Derart gealterte

Elektroden zeigten gegenüber frischen Ag/AgCl-Elektroden ein abweichendes und instabiles Potential, sodass sie nicht weiter verwendet wurden. Somit kann die Alterung der Ag/AgCl-Elektroden eine Ursache für abweichende Messergebnisse gewesen sein. Eine Erklärung für diesen Alterungsprozess könnte die in Abschnitt 2.3.1.1, Formel (2.3) angegebene Reaktion liefern. Ob diese Reaktion, trotz 3M KCl-Lösung, abläuft ist unklar. Möglicherweise ist es eine parallel ablaufende Reaktion oder die Silberchloridschicht löst sich mit der Zeit von alleine auf. Ein Einfluss durch die verwendete Elektronik (z.B. MUX) kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Sofern diese bei abgeschalteten Elektroden einen inversen Stromfluss zulässt, könnte dies die Reduktion zu Silber und somit die Auflösung der Silberchlorid-Schicht ermöglichen. Ein Reaktionsweg der entsprechend Formel (2.2) aufgrund der Stromrichtung der Messung eigentlich nicht ablaufen dürfte.

Eine weitere Fehlerquelle, bei Verwendung dieser Elektroden, ist die durch Ausbildung größerer Blasen in der Fluidik unterbrochene elektrische Verbindung zwischen Sensoren und Referenzelektrode. Die Integration einer Referenzelektrode im System wäre eine potentielle Lösungsmöglichkeit. Dies würde das System allerdings komplexer gestalten und andere Probleme hervorrufen [173,174].

4.7 Optimierung der Zellkulturparameter

4.7.1 Gründe für die Erhöhung des pH-Wertes

Weil das Absinken des Zellkulturmediums unter die physiologische Marke von pH 7.4 im Körper negative Effekte zeigt [7,130–132] und die Kalzifikation auch *in vitro* beeinflusst [117] ist die Begrenzung der Ansäuerung notwendig gewesen. Weil das Carbonatpuffersystem in geschlossenen Systemen nicht verwendet werden kann [9–12], wurde die Erhöhung des pH-Wertes des Kulturmediums als mögliche Option zur Optimierung der Zellkulturparameter untersucht. Nachdem ein Experiment zur Grobabschätzung des Effektes bei einem maximalen pH-Wert von pH 8 sogar höhere Proliferationsraten zeigte, wurden die Experimente in einem Bereich zwischen pH 7 und pH 8 durchgeführt.

4.7.2 Bestimmung der pH-Wert-Abhängigkeit des Zellwachstums

Sowohl der ATP-Lite® als auch der WST-Assay zeigten für MC3T3-E1 und MG63 Zellen bei höheren pH-Werten bessere Ergebnisse. So stieg die ATP-Konzentration, welche als Indikator für die Zellaktivität fungiert, mit steigendem pH-Wert bei beiden Zelltypen kontinuierlich an (siehe Abbildung 4-47). Der Effekt war bei den MG63-Zellen besonders ausgeprägt, wobei sich die Tendenz ebenfalls beim WST-Assay zeigte. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe Han *et al.* die für MG63-Zellen gegenüber MC3T3-E1-Zellen eine wesentlich höhere Sensitivität (Letalität) auf Ansäuerung feststellte [118]. Der WST-Assay, der zuerst wiederholt in denselben Wells durchgeführt wurde, hatte auf die MC3T3-E1-Zellen einen negativen Effekt. Bei den späteren Experimenten wurden die Wells nur einmal verwendet, was zu besseren Ergebnissen führte.

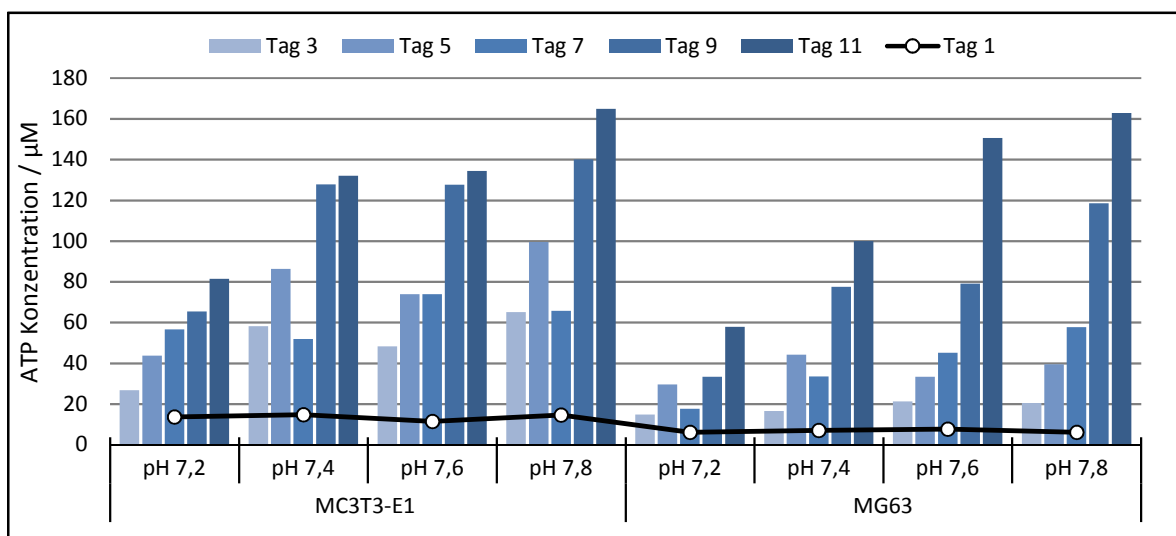


Abbildung 4-47: Vergleich des pH abhängigen Wachstums von MC3T3-E1 und MG63 Zellen.

Mit ATP-Lite Assay jeden zweiten Tag bestimmte ATP Konzentration (MW von 4 Messwerten einer Kultur); über 11 Tage in Kultur. ATP-Konzentration entsprechend Protokoll aus zugehörigen Standardkurven bestimmt; Tag 1: erste Messung einen Tag nach Aussaat (20.000 Z/Well)

Nachdem beide Assays vergleichbare Ergebnisse zeigten, wurden nachfolgende Experimente nur noch mit dem WST-Assay durchgeführt, da er kostengünstiger und einfacher durchzuführen war. Des Weiteren wurde sich auf die MC3T3-E1 Zelllinie als Modellsystem beschränkt. Der pH-Bereich wurde nach unten ausgeweitet, um die Tendenz zu bestätigen und parallel Zellen in AMEM unter Standardbedingungen kultiviert (Abbildung 4-48), um den direkten Vergleich zur Standardkulturmedium zu erhalten. Wie zu erwarten sank die Proliferation bei niedrigen pH-Werten weiter. Zudem schienen die Zellen den Stress durch die Aussaat bei höheren pH-Werten besser zu verkraften. Das Standardkulturmedium mit pH 7,4 (AMEM) zeigte etwas höhere Werte als das carbonatfreie Medium (AMEM-CF). Neben der höheren Pufferkapazität, dürfte der Hauptgrund der temporären Erhöhung des pH Wertes (bis ca. pH 8) außerhalb des Brutschrankes (Medienwechsel, Mikroskopische Kontrolle, pH-Kontrolle) zu finden sein. Das Medium erreicht den Ziel-pH-Wert (pH 7,4) erst nach ca. 1-2 h im Brutschrank, wodurch die Zellen einen Teil der Zeit einem höheren pH-Werten ausgesetzt waren.

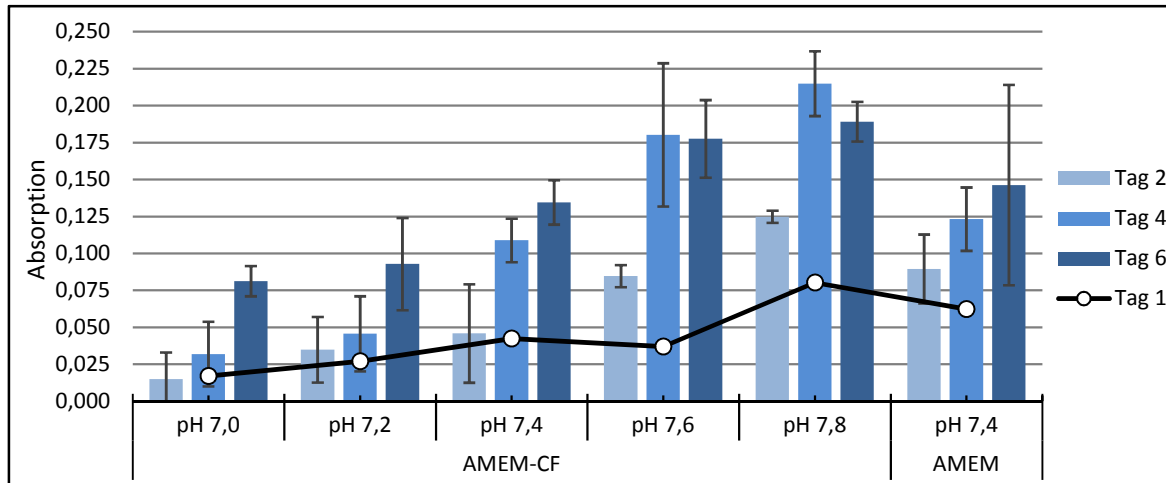


Abbildung 4-48: WST-Messungen mit MC3T3-E1 Zellen in Medium (AMEM-CF) mit verschiedenen pH-Werten.

Kultur über 7 Tage im Vergleich zum Standardkulturmedium mit NaHCO_3 (AMEM.); Absorptionswerte entsprechen Messwellenlänge (450 nm) abzüglich Referenzwellenlänge (620 nm) jeweils korrigiert um Blanks, Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung über 8 Messwerten (je 4 Proben aus 2 Ansätzen); Tag 1: Wert einen Tag nach Aussaat (20.000 Z/Well)

4.7.2.1 pH-Effekt in Anwesenheit von Kalzium und β -Glycerophosphat

Die MC3T3-E1-Zellen zeigten eine geringfügig höhere Proliferation in den angereicherten Medien. Wie in Abbildung 4-49 zu erkennen ist, war der Effekt schwächer als der Einfluss durch die pH-Differenz. Bei verschiedenen Versuchen schwankte der Einfluss des Kalzium und des β -Glycerophosphat erheblich, zudem konnten auch keine Kalzifikation beobachtet werden sodass auf die Verwendung der Zusätze verzichtet wurde.

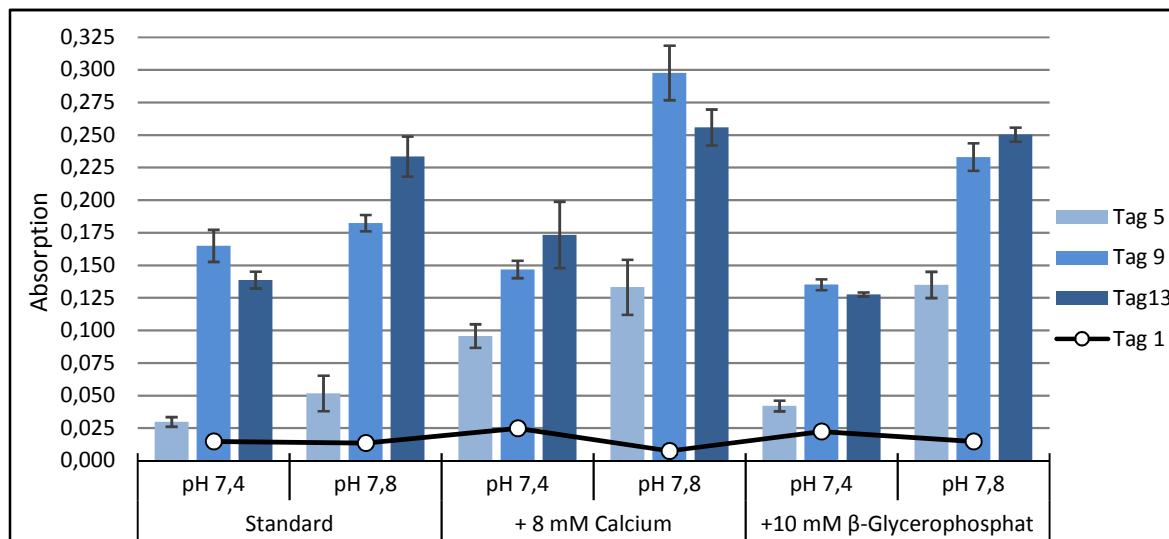


Abbildung 4-49: MC3T3-E1 Proliferation bei pH 7,4 und pH 7,8 mit verschiedenen Zusätzen.

Absorptionswerte entsprechend Messwellenlänge (450 nm) abzüglich Referenzwellenlänge (620 nm) jeweils korrigiert um Blanks, Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung über 8 Messwerten (je 4 Proben aus 2 Ansätzen); Tag 1: Wert einen Tag nach Aussaat (20.000 Z/Well)

4.7.2.2 Diskussion pH-Werte und Medienzusammensetzung

Das Konzept den pH-Wert zu erhöhen, ist unter dem Aspekt der Optimierung der Zellkulturparameter hinsichtlich der Proliferation als sehr effektiv zu bewerten. Die Messwerte bei pH 7,8 lagen nach mehr als 10 Tagen in Kultur um 20% bis zu 100% über den Werten bei pH 7,4.

Nach Robert F. Schmidt „... ist nur eine Säurebelastung bis $\text{pH} \geq 6,8$, eine Basenbelastung bis $\leq \text{pH} 7,8$ [mit dem Leben vereinbar]“ Diese Aussage impliziert zudem, dass auch *in vivo* eine größere Abweichung vom physiologischen Normalzustand toleriert werden kann. Für die Knochenzellforschung *in vitro* ist dies in jedem Fall eine Option die weitere Betrachtungen verdient. Vor allem weil sich der positive Effekt des höheren pH-Wertes auch bei den Kalzifikationsraten zeigen müsste. Neben der höheren Zellzahl, infolge besserer Proliferation, müssten höhere pH-Werte aufgrund der geringeren Löslichkeit von Kalziumphosphaten zu niedrigeren Kalzium-Resorptionsraten führen [124]. Aufgrund des positiven Effektes einer Alkalose auf das Knochenwachstum [8,124] ist auch eine Anwendung *in vivo* durchaus im Bereich des Möglichen.

Die Erhöhung des pH-Wertes in der Zellkultur ist vor allem wichtig, um das Absinken des pH-Wertes während Zellkultur zu kompensieren, wenn konventionelle Puffersysteme versagen. Für Systeme, in denen Carbonatpuffer nicht oder nur eingeschränkt nutzbar sind, stellt die Erhöhung eine einfache Möglichkeit dar, die Überlebensfähigkeit der Zellen zu erhöhen. Hier sind besonders geschlossene Mikrofluidiksysteme und 3D-Scaffolds zu nennen, bei denen die CO_2 -Diffusion durch lange Diffusionsstrecken oder Abschluss der Systeme stark limitiert ist. Dies könnte ein wesentlicher Grund für das Absterben von Zellen in solchen Systemen sein. Gerade in Mikrofluidiksystemen kommt das Problem der Blasenbildung hinzu, die sich durch das Ausgasen des CO_2 verschärfen kann.

Trotz dieser Zusammenhänge wurden nur drei Publikationen gefunden, welche den Einfluss des pH-Wertes auf Knochenzellen behandeln [13,121,122] und deren experimentelle Ansätze mit denen in dieser Arbeit vergleichbar sind. In den Veröffentlichungen wurden die Zellen allerdings nicht dauerhaft in Medien mit erhöhtem pH-Wert kultiviert. Der Fokus liegt bei den Publikationen auf intrazellulären Reaktionen und nicht auf der Proliferation, wie bei unseren Versuchen. Die geringe Anzahl an Publikationen mit Betrachtung des pH-Wertes in der Knochenzellkultur zeigt zudem, dass der Funktionsweise des NaHCO_2 -Puffersystems in der Zellkultur, sowie den Unterschieden zum biologischen Äquivalent im Blutkreislauf zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt wird.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen weiterhin, dass die Vergleichbarkeit vieler Experimente mit angereicherten Medien in Frage gestellt wird, weil die Erhöhung des pH-Wertes signifikant positivere Effekte zeigte, als die Zugabe von Kalzium bzw. β -Glycerophosphat (Abbildung 4-49). Sowohl für die Vergleichbarkeit von Experimenten untereinander, als auch für die Vergleichbarkeit von *in vivo* zu *in vitro* Experimenten ist die Berücksichtigung und somit auch die genaue Kontrolle des pH-Wertes sehr wichtig.

4.7.3 Einfluss der Oberfläche

In den Systemen traten oftmals Ablösungserscheinungen auf. Weiterhin waren keine Kenntnisse über den Einfluss der verwendeten Materialien auf das Wachstumsverhalten der Zellen vorhanden bzw. waren diese nicht direkt übertragbar. Daher wurde überprüft, ob die verwendeten Materialien für das Wachstum der Zellen problematisch waren und ob der Verzicht auf die Beschichtungen möglich ist. Es wurde ein spezielles Wellsystem für diese Experimente verwendet, bei denen die Wells von dem Mikroskopobjektträger gelöst werden konnten. Polycarbonatplatten (PC) dienten als Positivkontrolle, um die Standardzellkulturgefäße zu repräsentieren. Alle anderen Materialien wurden im Zellkultursystem verwendet. Gelatine wurde aufgrund ihrer potentiellen Verwendung als 3D-Scaffold getestet.

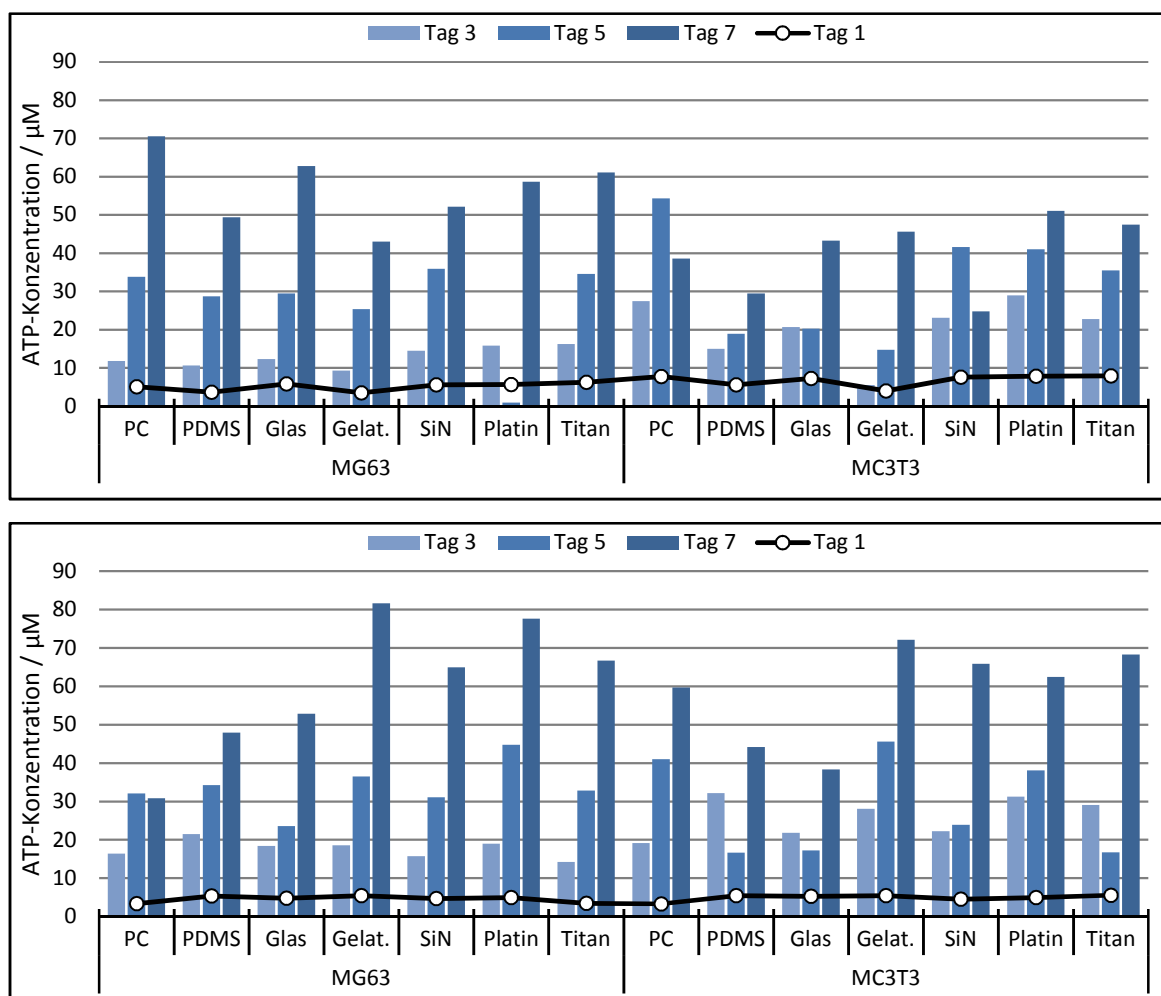


Abbildung 4-50: Darstellung der ATP-Konzentration von Zellen auf verschiedenen Substraten.

Messwerte in Doppelbestimmung, kultiviert auf Polycarbonat (PC) Trägern oder auf Glasträgern (Glas). Für PDMS oder Gelatine (Gelat.) wurden die Wells der Glasobjektträger mit 100 µl der Substrate beschichtet, für Si₃N₄ (SiN), Platin und Titan mit 100 nm des jeweiligen Substrates besputtert. **Oben:** Kultur direkt auf den Substraten, **Unten:** mit PDL-Laminin Beschichtung.

Die Experimente zeigten vergleichbare Werte für alle Oberflächen (Abbildung 4-50, oben). Die Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Zelltypen waren relativ gering. Für die Besiedelung mit Zellen waren unter den unbeschichteten Oberflächen PDMS und Gelatine am wenigsten geeignet. Bei den beschichteten Oberflächen glichen sich die Werte an, wobei PDMS und Glas nach 7 Tagen die geringsten Werte zeigten. Interessant ist, dass der Effekt vor allem durch die Zelladhäsion bei Besiedelung hervorgerufen wurde. Bei Normierung der Werte auf den Anfangswert, zeigte besonders PDMS sehr hohe Zunahmen. Die höheren ATP-Endwerte für die MG63 Zelllinie können auf die Natur dieser Zelllinie (Krebszelllinie) zurückgeführt werden. Die schlechte Adhäsion auf PDMS war erwartet worden. Die schlechte Adhäsion auf Gelatine war hingegen überraschend, da dieses Material oft in der Zellkultur verwendet wird [264]. Es zeigte sich kein Material als grundsätzlich ungeeignet um in den Systemen, auch ohne Beschichtung, verwendet zu werden.

Die beschichteten Oberflächen führten zu erhöhten Endwerten nach 7 Tagen, was auf eine höhere Besiedlungsdichte hindeutet (Abbildung 4-50, unten). Vor allem schien die Beschichtung aber die Unterschiede bei der primären Adhäsion auszugleichen. Interessanter war hier der Umstand, dass PC zusammen mit Glas bei den Endwerten am schlechtesten abschnitt. Während die Endwerte zum Teil unter den Werten unbeschichteter Oberflächen lagen, waren die Werte von Titan, Platin, Si_3N_4 aber auch von Gelatine deutlich besser. Statt die Adhäsionsunterschiede auszugleichen, hatte die Beschichtung einen eher verstärkenden Effekt. Zudem ist auffällig dass die ATP-Konzentrationen über die meiste Zeit vergleichbar zu denen der unbeschichteten Oberflächen sind. Der Umstand der beobachteten geringeren Adhäsion über den IDES könnte somit erst durch die Beschichtungen hervorgerufen worden sein, da Platin ähnlich gute Ergebnisse zeigte wie Si_3N_4 . Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bezüglich der Adhäsion und der Proliferation erschienen ebenfalls recht gering.

Die Ergebnisse wurden durch die WST-Messungen (nicht gezeigt) gestützt, welche aber für die MG63-Zellen noch deutlich höhere Werte als für die MC3T3-E1-Zellen lieferten. Dies kann auch auf die im Allgemeinen höhere metabolische Aktivität von Krebszelllinien zurück zu führen sein. Auch bei den WST-Messungen lagen die meisten Materialien eng beieinander, wobei PDMS bei beiden Zelllinien am schlechtesten abschnitt. Die anderen Oberflächen zeigten keine relevanten Differenzen. Die Beschichtung mit PDL und Laminin hatte auch bei den WST-Messungen den stärksten Effekt bei Gelatine, gefolgt von Glas.

Die Ergebnisse stützten das Vorgehen auf die MC3T3-Zelllinie zu wechseln, die vor allem wegen ihrer Fähigkeit zur Kalzifikation favorisiert wurde. Auch konnte auf die Beschichtung der Chips in den Systemen verzichtet werden. Vor allem zeigten die Messungen, dass das alle Materialien biokompatibel sind und nur das PDMS hinsichtlich der Adhäsion als potenziell problematisch einzustufen ist. Das erklärt auch die vom Rand ausgehende Ablösung der Zellrasen in den Systemen (4.6.5.2).

4.8 Zellkultur in den Systemen

4.8.1 Zellkultur in den GeSiM-Systemen

Die Zellkultur in den Systemen von GeSiM stellte eine große Herausforderung dar. Die Komplexität des mikrofluidischen Designs förderte die Blasenbildung. Selbst in stationären Systemen vergrößerten sich die Blasen während der Kultur (Abbildung 4-51). Unter aktiver Versorgung beschleunigte sich dieser Effekt, verstärkt durch die von der Pumpe eingetragenen Blasen. Dies konnte zum Absterben großer Zellbereiche führen. Änderungen im Experimentaufbau reduzierten diese Probleme. Die effizientesten Änderungen waren:

- [1] Mediumwechsel auf carbonatfreies Medium DMEM-CF bzw. AMEM-CF
- [2] Höherstellen des Mediumvorrates und Nutzung der Pumpe im Nachlauf (siehe 4.5.1)
- [2] Wechsel auf Systeme des Typs 4A-S bzw. 4A-OB (siehe 4.3.1.1)

Die Verwendung carbonatfreier Medien war für die pH-Messungen notwendig und reduzierte die Entstehung von Blasen. Das Höherstellen des Medienbehälters und die Nutzung der Pumpe im Nachlauf zeigten sich als sehr effektiv, da dadurch weniger Blasen eingetragen wurden. Durch Versetzen der Pumpe hinter das System entfielen die Schlauchverbinder vor dem System und die Pumpenschläuche wurden umgangen. In diese könnten, durch die Pumparbeit oder Gasdurchlässigkeit, Blasen eingetragen worden sein.

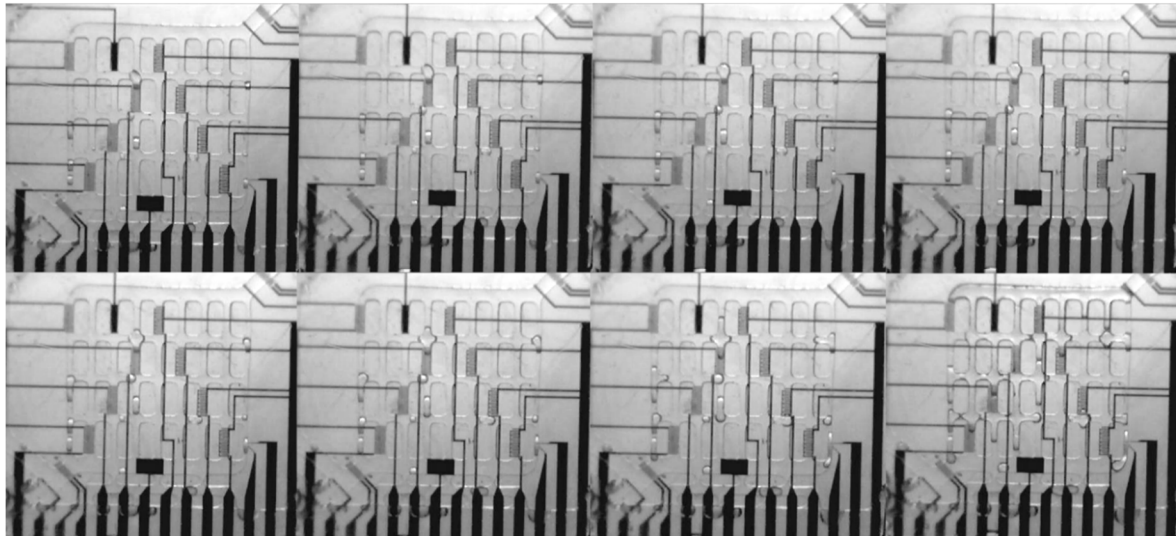


Abbildung 4-51: Aufnahmen des Systems mit kontinuierlicher Medienversorgung im Vorlauf (4 $\mu\text{l}/\text{min}$).
Aufgenommen im 30 s Takt dargestellt im Stundentakt (8h) von links nach rechts (V1-Chip, Mark-2, 4A-S).

Mit der Pumpe im Nachlauf konnten im System entstandene Blasen über andere Anschlüsse bzw. den Pumpenausgang abgezogen werden. Auch konnte der Pumpenschlauch abgezogen und das System mit Mediumbehälter unter die Sterilbank genommen werden, wofür sonst das Ausklinken der Pumpenschläuche notwendig geworden wäre. Durch das erhöht aufgestellte Medium wurde der Rückfluss verhindert. Beim Öffnen eines der Auslässe wurde Medium nachgeführt und Blasen aus dem System gedrückt, ohne dass die anderen Systeme von der Pumpe abgeklemmt werden mussten. Weiterhin wurde die Pulsation durch das Pumpen minimiert (Abbildung 4-24, Abschnitt 4.5.1). Nachteilig war das Leerlaufen des Mediumbehälters bei undichten Systemen.

Der Wechsel auf Systeme mit vier Anschlüssen sowie Speicherbereich, ermöglichte das Abfangen von Blasen im vorgelagerten Speicher und das Abziehen von Medium über einen der Nebenanschlüsse. Trotzdem kam es immer wieder zur Bildung bzw. dem Festsetzen von Luftblasen im Kulturbereich, was sich durch Verzicht auf die Blockstruktur (siehe 4.3.1) nochmals erheblich reduzieren ließ. In blockfreien Systemen ließen sich die Zellen dann relativ problemlos kultivieren, da Blasenansammlungen leicht und mit wenig Scherstress für die Zellen entfernt werden konnten sofern sie auftraten. Da sich auch das Auftreten bzw. Festsetzen von Blasen in blockfreien Systemen reduzierte war dies zudem seltener notwendig.

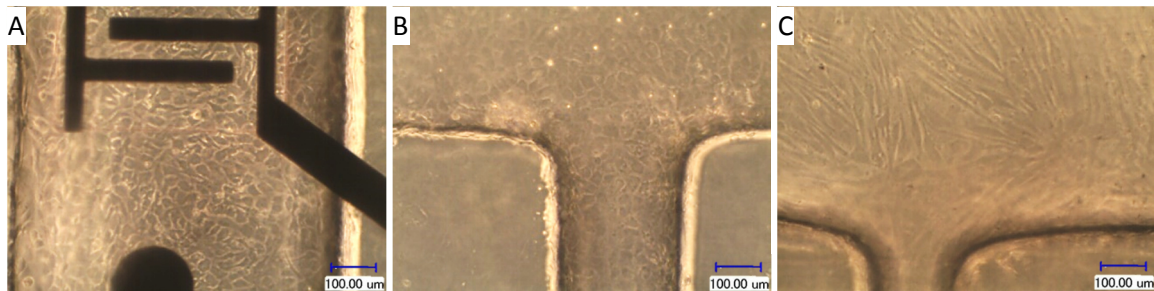


Abbildung 4-52 Zellen im Fluidiksystem 4A-OB

MC3T3-E1 Zellen im aktiv versorgten Fluidiksystem auf dem Chip ohne Beschichtung. A,B: Zellen mit ausgeprägtem Osteoblasten-Phänotyp im linken-obenem Zulauf (A) bzw. Übergang zwischen Speicher und Kulturbereich. C: Zellen mit fibroblastärem Phänotyp im äußerst-rechten Übergang zwischen Speicher und Kulturbereich. Diese Form tritt meist in stärker durchströmten Bereichen bzw. während des nicht konfluenten Stadiums der Zellkultur auf.

Die Blasenproblematik konnte im Dauerbetrieb nie vollständig gelöst werden, da es immer Bereiche gab, in denen sich bevorzugt Blasen sammelten. Eine Entgasung war nicht möglich, da eine Sauerstoffversorgung der Zellkultur notwendig war, sowie keine adäquate Entgasungslösung verfügbar war. Das sequenzielle Pumpen bzw. das manuelle Tauschen des Mediums führte zwangsläufig zum Eintrag von Blasen.

4.8.2 Sensormessungen in Zellkultur

4.8.2.1 Sauerstoffmessungen mit Zellen

Die elektrochemischen Sauerstoffmessungen wurden in den Systemen 4A-OB durchgeführt, da diese Systeme die maximal mögliche Kulturfläche boten. Für die Zellkulturexperimente wurden die Chips über mehrere Zyklen ohne Zellen gemessen, um das System zu kalibrieren. Die Messungen erfolgten automatisiert nur alle 20 min (zur Reduktion des Eigenverbrauches) bei -650 mV vs. Ag/AgCl-Referenz, wobei die Stromantwort 5 s nach Sensoraktivierung aufgezeichnet wurde. Bei den Zellkulturexperimenten wurde das Medium alle 5 h mit max. $300 \mu\text{l}/\text{min}$ für 5 min ausgetauscht. Nachfolgend wurden die Zellen in das System injiziert und nach einer Adhäsionszeit von 4 Stunden die Messzyklen begonnen (Abbildung 4-53).

Die in Abbildung 4-53 dargestellte Messung zeigt eine Zunahme der Verbrauchsraten. Die Zunahme korreliert mit den mikroskopischen Beobachtungen, wobei die Zellen nach ca. 29 h eine vollständig geschlossene Schicht bildeten. Bei den gezeigten Messungen lag die Sauerstoffkonzentration bei 37 °C mit Zellen zwischen 70 % und 90 % Luftsättigung, basierend auf 100 % Luftsättigung für die zellfreie Messung. Dies zeigt, dass die Zellen in diesem System nahe Sauerstoffsättigung kultiviert wurden. Dies liegt wahrscheinlich an dem im Verhältnis zu anderen Systemen [133] hohen Mediumvolumen im Verhältnis zur Zellzahl. Ein weiterer Einflussfaktor ist die hohe Sauerstoffdiffusionsrate in PDMS ($5.00 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei 38 °C) [145].

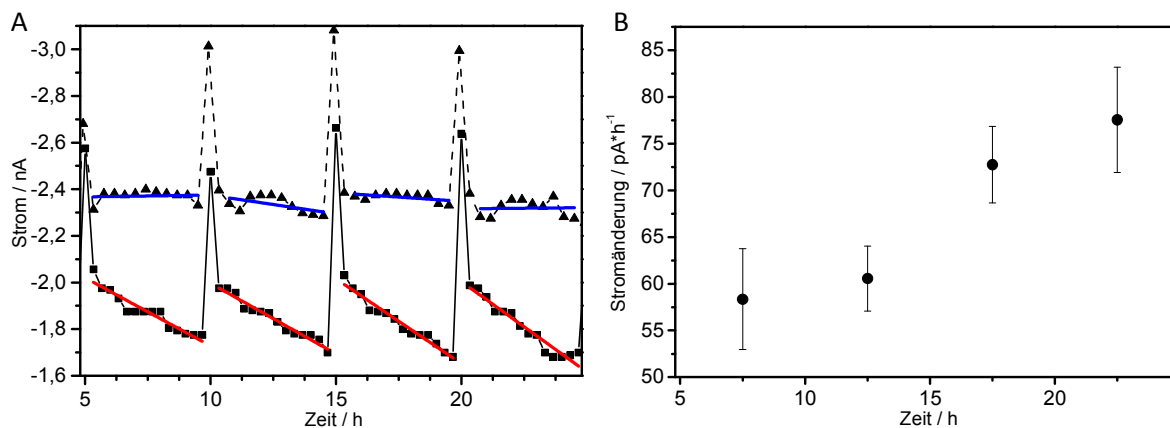


Abbildung 4-53: Exemplarische Sauerstoff-Verbrauchskurven gemessen im GeSiM-System mit 25 µm Sensor.

A: Kontinuierliche Messungen im zellfreien System (Dreiecke) und mit Zellen (Quadrate). Die auftretenden Peaks sind durch die Pumpaktivierung während des Medienwechsels verursacht; die Daten der zellfreien Messungen wurden normalisiert, um sie mit den Zellmessungen zu korrelieren. Zur Bestimmung des Verbrauchs wurden die Daten mit einer linearen Regressionsgeraden für die zellfreie Messung (blau) und für die Messung mit Zellen (rot) gefittet. **B:** Aus den linearen Fitfunktionen berechnete Sauerstoffverbrauchsraten für die Zellmessungen angegeben in pA/h.

Die mittleren Stromänderungsraten mit und ohne Zellen unterschieden sich ca. um den Faktor 10. Die Zehrung des Sensors kann in diesem Messmodus also vernachlässigt werden. Die minimalen Raten der zellfreien Messungen sind durch die Sensordrift verursacht, während die Verbrauchsraten bei der Messung mit Zellen direkt auf die Atmung der Zellen zuzüglich der Drift zurück zu führen sind. Folglich ist die Zunahme der Ströme bei der Messung direkt auf das Wachstum und die damit einhergehende erhöhte Aktivität der Zellen zurückzuführen. Dies wird auch durch die mikroskopische Beobachtung gestützt sowie den Umstand, dass die Werte bei Fortführung der Messung (bis zu 80 h) nicht weiter zunahmten, sondern um die Höchstwerte schwankten. Trotz der 2-Elektrodenkonfiguration waren die Messwerte vergleichbar zu kommerziellen Systemen [172,225]. Die Erhöhung der Aufzeichnungsrate bis zu 1 Messwert/min sollte möglich sein, ohne Probleme durch die Eigenzehrung des Sensors zu bekommen. Je nach Systemdesign kann zudem eine Nachlieferung des Sauerstoffes aus der Raumluft die Eigenzehrung kompensieren. Die Einschränkung der Sauerstoffnachlieferung, zur Optimierung der Sensitivität, steht dem wiederum entgegen. Alternativ könnten die Sensoren auch in kleineren Systemen mit kürzeren Messzyklen eingesetzt werden, wie sie für metabolische Studien von Chemikalien in Tierversuchersatzmethoden oder der Pharmakologie verwendet werden [133].

4.8.2.2 pH-Messungen mit Zellen

Vor Messung der Ansäuerungsraten mussten die Sensoren im Mikrofluidiksystem mit pH 7- und pH 8-Pufferlösungen kalibriert werden. Die Sensoren wurden für jede pH-Stufe vs. Ag/AgCl-Referenz gemessen und das System zwischen den Versuchen mit PBS gespült. Für beide pH-Werte wurden Driftraten von $-8,16$ mV/h gemessen. Da die Raten konstant waren, war ihr Einfluss auf die Bestimmung der Potentialdifferenz vernachlässigbar. Die durchschnittliche Potentialdifferenz wurde aus den Werten bestimmt, die zur selben Zeit nach Lösungsaustausch für pH 7 und pH 8 gemessen wurden. Mit $-39,3 \pm 0,96$ mV/pH zeigten diese Sensoren gute Sensitivitäten. Die Abbildung 4-54 A zeigt die Aufzeichnung der pH-Messung im Zellsystem (4A-OB) während der Zellkultur über 25 h, mit 5 h Messzyklen im Vergleich mit der Messung ohne Zellen. Auch bei diesen Messungen wurde eine Drift wie bei den Testlösungen beobachtet. Eine durchgehende Bestimmung des absoluten pH-Wertes wird damit schwierig, allerdings entspricht der erste Wert nach Ende des Pumpzyklus einem pH von 7,8 dem pH-Wert des eingestellten Mediums. Für die Messung wurden gleich hohe Zellzahlen wie bei den Sauerstoffmessungen eingesetzt und die Messung 4 h nach Einsaat begonnen (Abbildung 4-54). Das Medium wurde im 5 h Takt mit nur $150 \mu\text{l}/\text{min}$ für 6 min erneuert, um einen möglichst vollständigen Medien austausch zu gewährleisten ($900 \mu\text{l}$ entspricht ca. dem 10-fachen Volumen des Systems). Die Verringerung der Pumpgeschwindigkeit gegenüber den Sauerstoffmessungen sollte das Ablösen von Zellen verhindern und die Störung der Sensoren (Strömungspotentiale) reduzieren.

Nachdem die nicht adhärennten Zellen aus dem System gespült wurden, hatten die verbleibenden Zellen aufgrund der hohen Zellzahl bereits eine weitgehend konfluente Schicht gebildet, welche sich während der nächsten 20 Stunden vollständig schloss. Dies ging mit einer Erhöhung der Ansäuerung bis zur Stabilisierung einher (Abbildung 4-54 B).

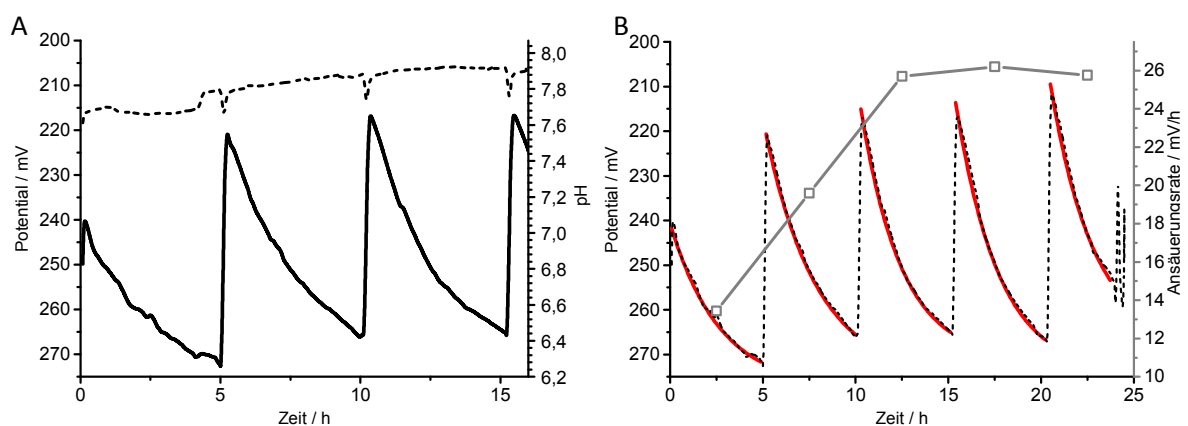


Abbildung 4-54: Messungen der Ansäuerung im GeSiM-System (V2-Chip, 4A-OB).

A: 3 Zyklen im 5 h Takt mit Zellen (50.000 Z/System, schwarze Linie) im Verhältnis zur Referenzmessung ohne Zellen (gestrichelte Linie); Linke Ordinatenachse: gemessenes Potential, rechte Achse: aus Referenzmessung und Sensor-Sensitivität berechneter pH-Wert. **B:** Darstellung der Fits (Formel 6.1, rote Linien) über den Messgraphen für die Ansäuerung (gestrichelt Linie, linke Ordinate), und den daraus berechneten Ansäuerungsraten (rechte Ordinate, offene Quadrate, graue Linie).

Zur Berechnung der Ansäuerungsrate ist es für die meisten Anwendungen ausreichend, eine lineare Regression durchzuführen oder die Differenz zwischen dem Wert bei Ende des Pumpzyklus und einem Wert nach einer definierten Zeit (z. B. 30 min nach Pumpende) zu bestimmen [133]. In der dargestellten Messung wurde zur Erhöhung der Genauigkeit allerdings eine Exponentialfunktion (4.1) separat auf die einzelnen Ansäuerungskurven zwischen den Pumpzyklen angepasst. Die Änderung des Potentials $pot(t)$ ergibt sich dabei aus dem Anfangspotentials pot_0 und der Potentialänderung $pot_{delta} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$

$$pot(t) = pot_0 + pot_{delta} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \text{ mit } pot_{end} = pot_0 + pot_{delta} \quad (4.1)$$

Die Ansäuerungsrate für jeden Zyklus berechnen sich dann über die erste Ableitung nach t:

$$\frac{dpot(t)}{dt} = \frac{pot_{delta}}{\tau} \left(e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (4.2)$$

Der Vorteil dieser komplizierteren Kalkulation liegt in der besseren Kompensation der Drift, die sowohl in Kontrolle als auch der Messung feststellbar war. Die aus Gleichung (4.1) berechneten Zeitkonstanten τ nahm für aufeinanderfolgende Messungen kontinuierlich ab. Dies wiederum resultiert in zunehmenden Ansäuerungsrate berechnet nach Gleichung (4.2). Die berechneten Ansäuerungsrate für die obige Messung beliefen sich auf 13,4 mV/h, 19,6 mV/h, 25,7 mV/h, 26,2 mV/h und 25,8 mV/h. Das Erreichen der Konfluenz und die Stagnation des Zellwachstums sind die wahrscheinlichsten Ursachen für die Stabilisierung bei ca. 25 mV/h. Die Ansäuerungsrate zeigen relativ große Werte, welche die Erhöhung der Pufferkapazität oder die Reduktion der Messzeiten notwendig macht. Die damit verbundene Reduktion des pH-Bereiches dürfte auch eine Verringerung des Stresses für die Zellen bedeuten. Alternativ besteht auch die Möglichkeit mit geringeren Zellzahlen zu arbeiten, wodurch das Zellwachstum beobachtet werden kann.

Die Messungen zeigten, dass der pH-Wert ein wesentlich sensitiverer Wert als die Sauerstoffmessung ist. Dies lässt sich zum wesentlichen Teil auf die Nachlieferung von Sauerstoff durch das PDMS zurückführen. Infolge des Wechsels auf anaerobe Stoffwechselwege, hätte eine künstliche Einschränkung der Sauerstoffversorgung wiederum einen verstärkenden Effekt auf die Ansäuerung. Die in Abbildung 4-54 B zum Ende auftretende Störung zeigt auch hier die Probleme durch den Eintrag von Luftblasen.

4.8.3 Zellkultur in den SLV-Systemen

Entsprechend den Erfahrungen mit den GeSiM-Systemen wurde für die SLV-Systeme die Fluidik vereinfacht. Dadurch wurde die Blasenproblematik erheblich reduziert. Blasen die trotzdem entstanden, bzw. im System verblieben, konnten durch vorsichtiges Spülen und mit leichtem Eindrücken des PDMS-Oberteiles an den entsprechenden Stellen aus dem System entfernt werden. Mikroskopische Kontrollen zeigten, dass dieses Vorgehen nicht zu einem großflächigen Ablösen der Zellen führt, punktuell aber Schäden verursachen kann.

Blasen waren meist nur im Randbereich ein Hindernis für die Besiedelung mit Zellen, während Ablösungen oder Öffnungen der Zelllayer hauptsächlich im Bereich des Eingangsbereiches bzw. um die zentralen Pfosten auftraten (Abbildung 4-55 A,B,C). Verursacht wurde das durch die hohen Strömungsgeschwindigkeiten im Eingangsbereich bei Mediumzugabe, sowie durch das zur Blasenentfernung notwendige Eindringen des Deckels. Auch die normale Handhabung (Abklemmen, Kontrolle, Mikroskopie) kann dazu führen. Eine Hauptursache ist wahrscheinlich die schlechte Adhäsion der Zellen an PDMS.

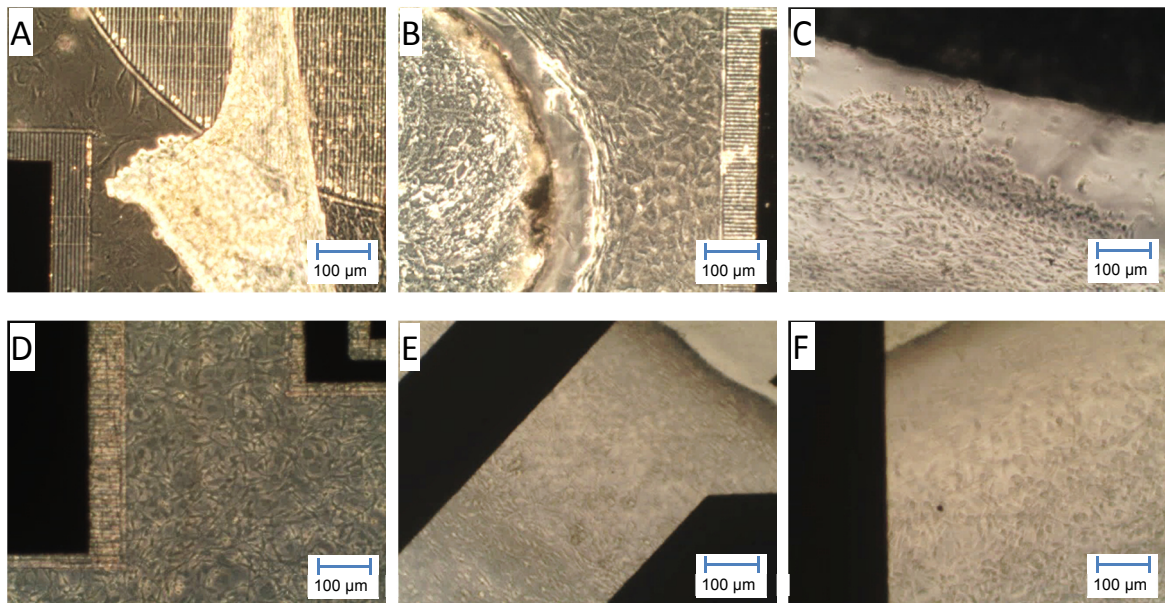


Abbildung 4-55 Zellen in den SLV-Systemen.

MC3T3 Zellen in SLV-Systemen auf unbeschichteten Chips. A: im inneren Bereich Nähe des Einlasses abgelöster Zellrasen, B: verdrängte Zellen um einen Pfosten, C: Bewuchs bis zum Rand, D: flächiger Bewuchs in strömungsarmen Bereich, E,F: Bewuchs mit Ablösung des konfluenten Zellrasens vom Rand

Die Blasenbildung in den Systemen konnte erheblich reduziert werden wenn Aqua dest. in den Deckel gegeben wurde. Offensichtlich verdunstet ohne die Wasserüberschichtung Medium aus dem System. Obwohl das Medium höher steht und somit den Verlust ausgleichen müsste, kommt es zur Entstehung bzw. Ansammlung von Blasen. Wieso diese nicht durch das offensichtlich gut gasdurchlässige PDMS entweichen blieb unklar. Auch eine Diffusion von Gas in das System ist möglich, wobei es sich aber vollständig im Medium lösen müsste. Dieser Effekt ist bei dem Design und Betrieb von mikrofluidischen Systemen besonders unter Nutzung von PDMS zu berücksichtigen. Zellkultur über mehrere Tage bis zu mehreren Wochen war möglich. Die Dichte und Proliferation der Zellen in den Systemen konnte, aufgrund Handhabung und fertigungsbedingten Abweichungen stark variieren. Sofern keine Kontaminationen oder Leckagen auftraten, ließen sich dennoch großflächige, dichte Zellrasen erreichen (Abbildung 4-55 D,E,F).

4.8.3.1 Sauerstoffdiffusion in das SLV-System

Bei den Charakterisierungsmessungen in den Zellkultursystemen für das GeSiM-Format konnte beobachtet werden, dass die Ströme für sauerstofffreie Lösungen größer als zu erwarten waren. Außerdem vergrößerte sich dieser Wert teilweise. Dieser Effekt wurde mit bei Verwendung des SLV-Systems offensichtlich. Um die Dauer bis zur vollständigen Wiederanreicherung des sauerstofffreien Mediums zu bestimmen, wurden Testexperimente durchgeführt.

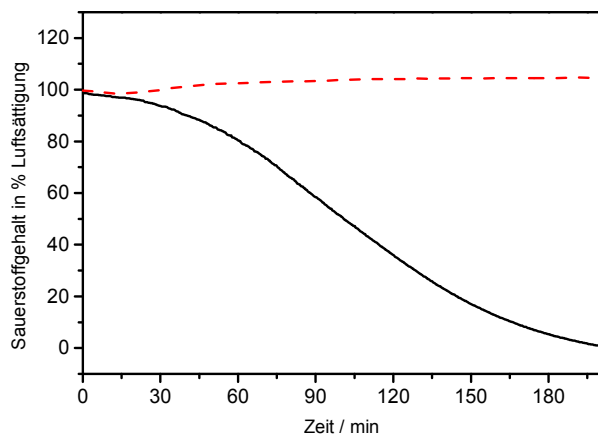


Abbildung 4-56: Sauerstoffdiffusion in das Zellkultursystem.

Rot-gestrichelt: Übersichtung des Zellkultursystems mit Aqua dest., schwarze Linie: mit Na₂SO₃ (2 % in ddH₂O) auf dem Deckel (1 mm PDMS).

Dafür wurden zwei Systeme mit je einem 2 mm Presens-Sauerstoffspot im Brutschrank bei 37 °C überwacht. Die Systeme wurde dann via Pumpe mit 500 µl sauerstofffreiem Medium (1 % Na₂SO₃) gespült, um den Sauerstoff zu entfernen. Nach Abschalten der Pumpe, wurde in den Deckel eines der beiden Systeme zusätzlich sauerstofffreies Aqua dest. (2ml mit 2 % Na₂SO₃) gegeben, um die Sauerstoffdiffusion durch das PDMS zu unterbinden (Abbildung 4-56). In den Deckel des anderen Systems wurden 2 ml

Aqua dest. gegeben, um Verdunstung aus dem Zellkultursystem zu unterbinden.

Die Messungen zeigten, dass das System ohne Na₂SO₃ auf dem Deckel nur kurz eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration zeigte und sich bei einem Wert knapp über 100 % der Luftsättigung einstellte. Das System mit Na₂SO₃ im Deckel erreichte nach 200 Minuten vollständig anaerobe Verhältnisse.

Dies ist wichtig zu berücksichtigen, weil die Zellatmung ausreichend groß sein muss, um den nachdiffundierenden Sauerstoff zu verbrauchen und somit eine Verringerung des Sauerstoffgehaltes und die Messung des Verbrauches zu ermöglichen. Im Gegenzug ermöglicht dies aber auch die Messung in anaeroben Verhältnissen durch Befüllen des Deckels mit Na₂SO₃-haltiger Lösung.

4.8.4 Sensormessungen in Zellkultur

4.8.4.1 Änderung der Sauerstoffkonzentration während der Zellkultur

Die Sauerstoffdiffusion in das Zellkultursystem beeinträchtigte die Messungen. Eine Limitierung der Versorgung war möglich, wobei auch der Betrieb unter vollständig anaeroben Verhältnissen durchführbar war. Die Systeme konnten bei aktiver Medienversorgung anaerob gehalten werden ohne das Medium aufwendig zu entgasen oder das System in einem gasdichten, sauerstofffreien Behälter aufbauen zu müssen. Die in Abbildung 4-57 gezeigten Messungen wurden mit optischen Sauerstoffsensorspots, in mit Natriumsulfit überschichteten Systemen durchgeführt. Die Aktivierung der Pumpe und

das Durchspülen der Systeme mit dem Mehrfachen ihres Volumen reichte nicht aus, um den Sauerstoffgehalt längere Zeit zu erhöhen (Abbildung 4-57 A). Die Messung zeigt, dass bei abgedeckten Deckel mit sauerstofffreiem Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃) die Systeme bis zu 18 h sauerstofffrei gehalten werden konnten, bevor das Na₂SO₃ aufgebraucht war. Die Sauerstoffdiffusion kann allein durch Zugabe von 2 ml Aqua dest. verringert werden, dass der Verbrauch der Zellen ausreicht, um den lokalen Sauerstoffgehalt messbar zu reduzieren (Abbildung 4-57 B). Weiterhin konnte gezielt der Sauerstoffgehalt auf 0 % gesenkt werden, ohne die Zellen durch das Natriumsulfid auf dem Deckel zu schädigen.

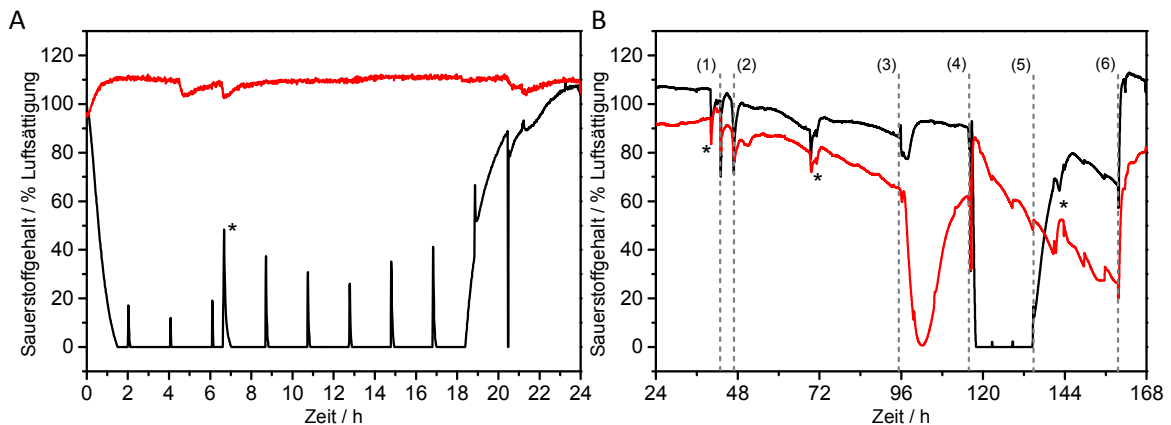


Abbildung 4-57: Parallele Messungen in zwei SLV-Systemen.

A: Messung zweier Systeme, **System 1 (rot)** wurde mit sauerstoffhaltigem 2ml Aqua dest. und **System 2 (schwarz)** mit sauerstofffreiem Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃) überschichtet und im 2 h Takt das Medium ausgetauscht (300µl/min für 2 min). **B:** Messungen mit Zellen und Austausch des Mediums alle 6 h (150µl/min für 5 min). (1) Zelleinsaat 1Mio. Zellen/ml, (2) Herausspülen überzähliger Zellen, (3) Übersichtung mit sauerstofffreiem Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃) auf **System 1 (rot)** mit langsamer Wiederanreicherung, (4) Herausnahme der Systeme zur Mikroskopischen Kontrolle und Übersichtung mit sauerstofffreiem Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃) auf **System 2 (schwarz)**, bzw. pH-Puffer auf System 1, (5) Austausch der Lösungen mit Aqua dest., (6) Entfernen der Lösungen im Deckel. * Durch Handling hervorgerufene Störungen.

Bei den Messungen mit Zellen war die Trägheit der Sauerstoffsensoren in besiedelten Systemen so hoch, dass sich die sonst erkennbaren Pumpenpeaks nur bei sehr hohen Verbrauchsdaten ausbildeten. In den Messungen in Abbildung 4-57 B wurde nach Einstellen der Systeme 1 Mio. Zellen/ml injiziert (1). Nach 4 h Adhäsionszeit wurden überzählige Zellen ausgespült (2) und das System aus Gründen der Sensorträgheit und den erwartenden geringen Verbrauchsdaten mit Pumpzyklen von 6 h betrieben. Nach 2 Tagen in Kultur wurde eines der Systeme mit sauerstofffreier Lösung (2ml Aqua dest. mit 2 % Na₂SO₃) überschichtet. Da die Na₂SO₃-Lösung (ca. pH 10) durch die Übersichtung den Medium-pH im System beeinflussen könnte, wurde zur Kompensation potentieller pH Einflüsse das sauerstoffhaltige System mit pH Messpuffer (pH 10) überschichtet (3). Durch Verdunstung der Lösung im Deckel reicherte sich das Medium aber schneller wieder an als erwartet. Die mikroskopische Kontrolle zeigte in beiden Systemen eine Zunahme der Zellzahl ohne Konfluenz zu erreichen (4). Bei Wiederholung des Experimentes mit getauschten Lösungen (5) konnte das zweite System für 18 h sauerstofffrei gehalten werden.

In beiden Systemen stieg die Sauerstoffzehrung, auch nach dem Sauerstoffzug, kontinuierlich an. Die wahrscheinlichste Ursache liegt im Erreichen der vollständigen Konfluenz, wobei System 1 den wesentlich dichteren Zellrasen zeigte als System 2. Auch das Umschließen der Spots mit Zellen dürfte zu den beobachteten Zehrungen beigetragen

haben. Bei der ersten Kontrolle hatten die Zellen noch einen erheblichen Abstand (mind. 100 μm) zu den Spots, wahrscheinlich weil die Spots nicht die ideale Oberfläche boten bzw. der verwendete Klebstoff wachstumshemmend wirkte. Hierfür spricht der, besonders in System 1 (rot), zunehmenden Sauerstoffverbrauch vor dem Sauerstoffzug. Die mikroskopische Kontrolle nach den Experimenten zeigte vollständig konfluente Systeme in denen sogar die Zuläufe zugewachsen waren. Während der Versuchsdurchführung wurde dies nur vereinzelt (4) überprüft, um die Zellkultur nicht zu beeinträchtigen. Das Entfernen der Flüssigkeit in den Deckeln (6) führte zu Anstiegen der Sauerstoffkonzentration bis auf die Anfangswerte, sodass die Diffusionslimitierung im PDMS, durch verbliebenes Na_2SO_3 oder andere chemische Vorgänge ausgeschlossen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist eine erhöhte metabolische Aktivität bzw. ein stark erhöhter Sauerstoffbedarf der Zellen infolge des vorhergehenden Sauerstoffentzuges. Als Reaktion auf das vorherige Defizit, könnten die Zellen sauerstoffverbrauchende Prozesse gesteigert haben. Eine durch die anaeroben Verhältnisse induzierte Differenzierung oder der vollständige Übergang der Kultur von der proliferierenden in die stationäre Phase, wie er auch in der Literatur diskutiert wird (siehe Abschnitt 2.1.7), könnte ebenfalls eine Ursache für den erhöhten Verbrauch sein. Um eine abschließende Aussage zu treffen müssten weitergehende Experimente, beispielsweise bei anaeroben Bedingungen ohne Verwendung von Na_2SO_3 oder unter Einbeziehung von Genom,- bzw. Proteomanalysen durchgeführt werden.

Das dargestellte Experiment diene der Verdeutlichung des Einflusses der Sauerstoffversorgung auf die Kultur und die Relevanz der Überwachung dieses Parameters. Das Problem zu hoher Sauerstoffversorgung bei aeroben Bedingungen kann durch ein Neudesign des Deckels entgegengewirkt werden. Dafür müsste die PDMS Dicke vergrößert oder eine Scheibe aus PMMA oder PC als Diffusionsbarriere mit eingegossen werden. Auch der Abschluss des Deckels durch eine gefräste passende Abdeckung aus PC oder PMM wäre möglich, sodass die Verdunstung oder der Sauerstoffeintrag verringert wird, wodurch aerobe und anaerobe Experimente länger und einfacher durchführbar sind.

4.8.4.2 pH-Messungen

Die Messungen in den Systemen wurden mit den Si_3N_4 -Sensoren sowie den eingebetteten optischen Sensoren durchgeführt. Die Sensoren wurden zuvor mit Standardmedien entsprechend der Vorgabe für die optischen Sensoren kalibriert. Das Protokoll sah die Messung bei 6 pH-Werten im Bereich von pH 9 bis pH 4 vor. Die Dauer pro Messung ergab sich aus der Einstellzeit der elektrochemischen Sensoren. Diese wurden mit kalibriert und benötigten aufgrund des Anschlusses an den MUX jeder mind. 30 s Einstellzeit. Um die Belastung durch den MUX zu reduzieren wurde das zuvor diskutierte inverse Anschlussschema verwendet. Die Referenzelektroden lagen auf den Anschlüssen der Arbeitselektroden, während die Arbeitselektroden auf dem Referenzanschluss lagen. Dies führte zu einer Vorzeichenänderung der Messungen, die bei der Auswertung entsprechend verrechnet wurden. Die Messungen liefen danach stabiler und die Sensoren zeigten eine mittlere Sensitivität von $-45,2 \pm 2,4$ mV bei 37 °C in Standardpufferlösungen

von pH 5 bis pH 9. Bei der Verwendung von 8 Sensoren ergab sich eine Kalibrierdauer von 4 min pro pH-Wert. Aufgrund des hohen pH-Sprunges wurde jeder pH-Wert mehrfach gemessen. Zwischen dem Wechseln der Lösungen wurden die Systeme mit PBS gespült. Vor der Zellzugabe wurden die Systeme mehrere Stunden entsprechend dem Messprotokoll mit Medium betrieben, um sie zu stabilisieren und Reste der Pufferlösungen zu entfernen. Die Systeme wurden unter Verwendung von Spritzen, über den Anschluss des Medienreservoirs mit 0,5 Mio. Zellen/ml (ca. $\frac{1}{4}$ konfluent) besiedelt. Nach 4 h Adhäsionszeit wurden die Messungen mit 2 h Pumpzyklen gestartet.

Für die elektrochemischen Sensoren wurden vergleichbare Charakteristiken wie für die optischen Sensoren gemessen (Abbildung 4-58). Allerdings erschwerte die Nutzung des MUX die Messungen durch erhöhte Störanfälligkeit. Dies führte zu einem veränderten Messprotokoll, bei dem nach Umschalten des MUX der Sensor 30 s lang sein Potential stabilisieren konnte, bevor dieses aufgezeichnet wurde. Die Zeit für eine Messung aller 8 Sensoren dauerte somit 4 min und war einer der Gründe für die gewählten Pumpzyklen, da bei 120 min ca. 30 Werte pro Sensor aufgezeichnet wurden.

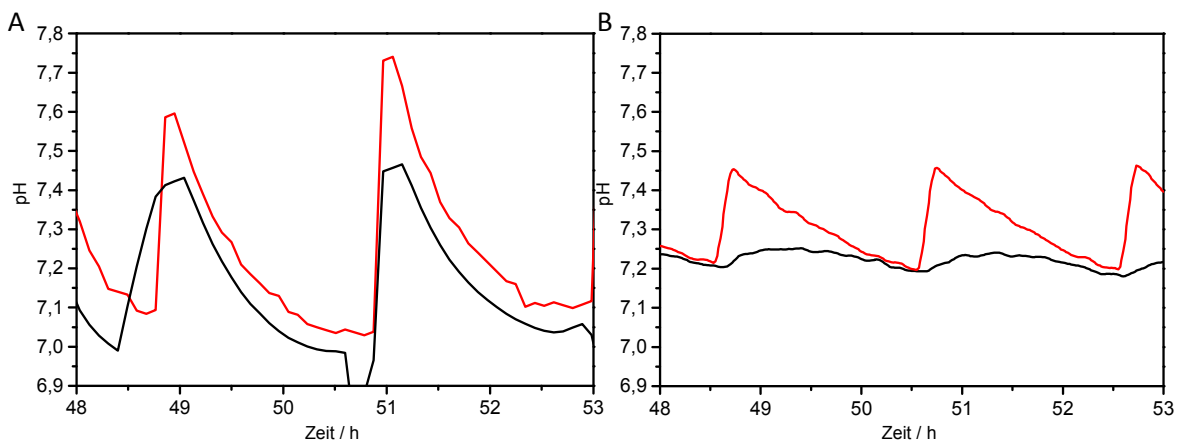


Abbildung 4-58: Messungen in 2-Systemen mit elektrochemischem (A) und optischen pH-Sensoren (B). Parallele Messung in 2 Systemen: **System 1 (rote Linien)** mit pH Spot am Einlass und **System 2 (schwarze Linien)** mit pH-Spot am Auslass. In System 2 bildete sich eine Blase im Randbereich des Spots, wodurch der Mediumfluss geändert wurde. Der behinderte Austausch führte zu veränderten Messwerten im Verhältnis zum zugehörigen elektrochemischen Sensor.

Obwohl die optischen Sensoren als Referenzsystem fungieren sollten, zeigten die elektrochemischen Sensoren oft höhere pH-Werte und pH-Wertänderungen als die optischen Sensoren. Dies war aber nicht die alleinige Abweichung der elektrochemischen Sensoren, sondern es zeigte sich, bei nachfolgender Messung mit Standard pH-Lösungen, dass die optischen Sensoren eine verzögerte Reaktion aufwiesen. Hinzu kam die Notwendigkeit die optischen Sensoren mit einer nichtlinearen Boltzmann Gleichung zu fitten, wodurch die Spots im Bereich um pH 7,8 eine geringere Sensitivität als bei niedrigeren pH-Werten besaßen. Ein weiterer Grund für die abweichenden pH-Werte bzw. pH-Wertänderungen dürfte in der Größe der Sensoren begründet sein. Die wesentlich größeren pH-Spots müssten aufgrund der Größe eine erheblich höhere Trägheit betreffend pH-Änderung und Signaländerung (Fluoreszenzquenching) aufweisen als die sehr viel kleineren pH-Sensoren.

Ein zusätzlicher Grund könnte der geometrische Faktor sein. Der Spot ist mit 200 μm etwa so hoch wie die Fluidik, wodurch über dem Spot kaum Medium strömt und auch keine Zellen auf ihm wachsen können, während der Spot selbst zusätzlich die Strömungsverteilung beeinflusst. Infolgedessen erreichen sie die korrekten pH-Werte nicht, bzw. nicht in dem gewählten Zeitrahmen. Dies würde auch erklären warum die Maximalwerte (ca. pH 7,8) nach Ende der Pumpaktivierung nicht erreicht werden oder warum die Flanken während der Pumpaktivität nicht so steil sind wie bei den elektrochemischen Sensoren in Abbildung 4-58.

Ein Beispiel wie stark diese Effekt sein kann, ist ebenfalls in Abbildung 4-58 gezeigt, bei dem sich in System 2 eine Blase vor dem Spot gefangen hat, welche die Messung negativ beeinflusst hat. Durch Einkleben in eine extra geschaffene Aussparung im Chip (gelasert) oder im Deckel (Modifikation der Gußform) ist das wahrscheinlich kompensierbar.

Bewertung der Sensortypen

Bei entsprechender Auslegung der Elektronik sollten die elektrochemischen pH-Sensoren aufgrund ihrer besseren Stabilität gegenüber den Reinigungsmethoden (Ethanol, Dampfsterilisation) vorteilhaft sein. Dies gilt besonders für Systeme mit sehr flacher Mikrofluidik (<200 μm) oder ohne optische Zugänglichkeit. Die optischen pH-Spots wiederum dürften vorteilhaft für größere Systeme sein, besonders wenn in diesen durch Blasenbildung Unterbrechungen in der elektrischen Verbindung zwischen Sensor und Referenzelektrode auftreten können. Für die Überwachung der Ansäuerung in unserem System sind beide Typen grundsätzlich verwendbar. Von Störungen durch Blasen abgesehen, wurden durchgehende Messungen mit Zellen bis zu 50 h realisiert, was zum Beispiel für Zellkulturüberwachung und Untersuchung des Proliferationsverhaltens nutzbare Zeiträume sind. Nachteilig an den optischen Sensoren sind aber neben dem Platzbedarf, die aufwendige Kalibrierung und die nichtlineare Kennlinie.

4.8.4.3 pH Messungen in Zellkultur unter Sauerstoffentzug

Die in Abbildung 4-57 dargestellte Messung wurde zusätzlich mit optischen pH-Sensoren überwacht. Um die metabolische Reaktion und somit die Ansäuerungsrate der Zellen auf Sauerstoffentzug zu bestimmen, wurden die Systeme mit sauerstofffreiem Aqua dest. überschichtet. Dadurch wurde dem Kulturmedium durch das PDMS des Deckels der Sauerstoff entzogen. Die Diskussion zur Änderung der Sauerstoffkonzentration wurde bereits in Abschnitt 4.8.4.1 geführt. Referenzmessungen mit zellfreien Systemen (4.8.3.1) hatten ergeben, dass das sauerstofffreie Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃, pH 10) im Deckel den pH-Wert im System beeinflusst, wobei in zellfreiem Medium mit 2 mM HEPES eine maximale pH-Wert-Erhöhung von 0,05 pH-Stufen pro Stunde (ca. 0,3 pH-Stufen pro 6 h Zyklus) induziert wurde. Bei längerfristigen Experimenten empfiehlt sich eine Einstellung des pH-Wertes des sauerstofffreien Aqua dest. oder die Zugabe eines pH-Puffers um den Einfluss der pH Werterhöhung zu kompensieren.

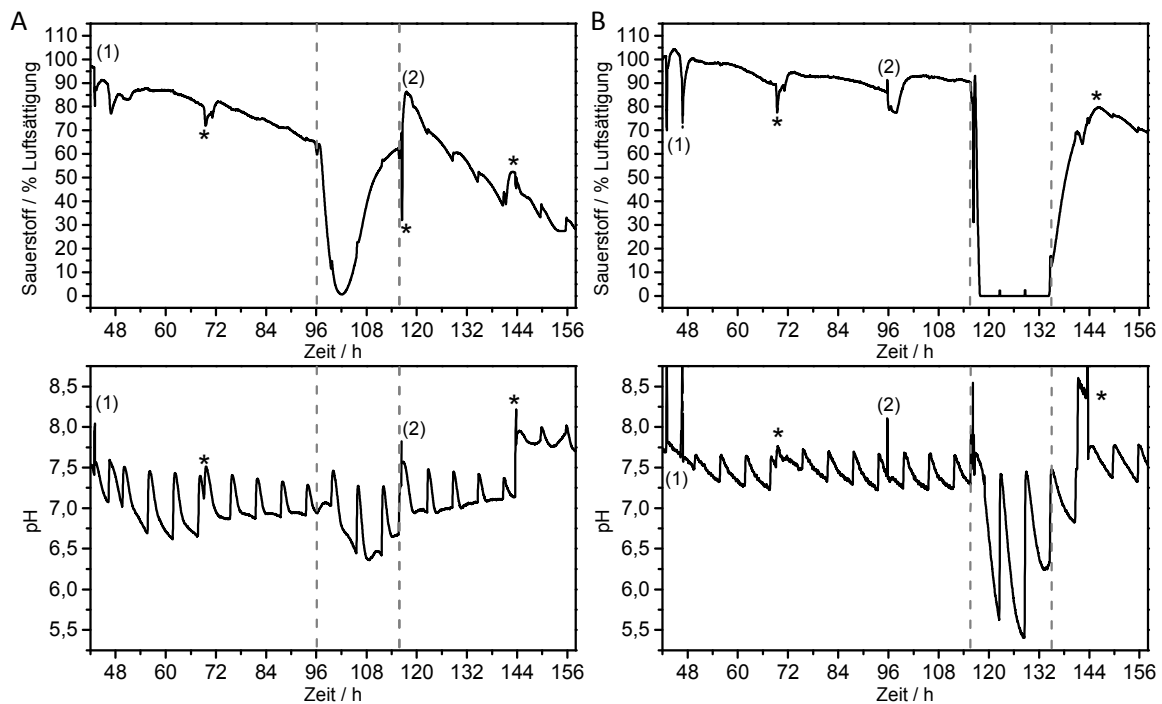


Abbildung 4-59: Vergleich des Sauerstoffgehaltes (oben) und des pH-Wertes (unten) in 2 Systemen.

Die Messungen erfolgten mit optischen Sauerstoff- und pH-Spots die zuvor kalibriert wurden. Verwendet wurde AMEM-CF mit 2 mM HEPES. Überschichten der Systeme mit sauerstofffreiem Aqua dest. (2ml, 2 % Na₂SO₃) zum Sauerstoffentzug ab t=96 h (A) bzw. ab t=116 h (B). Die gestrichelten Linien markieren den Bereich in dem der Sauerstoffgehalt im Medium durch das Na₂SO₃ reduziert wurde. (1) Peaks markieren den Zeitpunkt der Zelleinsaat, bzw. des Herausspülens nach Ende der Adhäsionszeit, (2) Überschichtung von pH 10 Puffer im Referenzsystem parallel zur sauerstofffreien Messung zur Bestimmung des pH-Effektes. * Durch manuelles Handling (Mediumtausch, Kontrolle, Entfernen von Blasen) verursachte Störungen.

Die Messungen mit Zellen zeigten, dass die alkalisierende Wirkung des Na₂SO₃ die gesteigerte Ansäuerung durch die Zellen nicht kompensierte. Die Messungen verdeutlichen die Korrelation zwischen Sauerstoffversorgung und Ansäuerungsleistung. Auffällig ist der gesteigerte Sauerstoffverbrauch der Zellen nach den sauerstoffreduzierten Phasen. Dadurch ist, neben der mikroskopischen Kontrolle, erkennbar, dass die sauerstoffreduzierte/anaerobe Phase keine Schädigung der Zellen (Abtöten, metabolische Hemmung) hervorgerufen hat.

Die parallelen Messungen zeigen, dass das System die längerfristige Kultur der Zellen mit gleichzeitiger Überwachung von Sauerstoff- und pH-Wert ermöglicht, wobei während der Kultur zwischen sauerstoffgesättigten und sauerstoffreduzierten/anaeroben Verhältnissen gewechselt werden kann. Die Nutzung des Na_2SO_3 zur Herstellung anaerober Verhältnisse hat hierbei keine negativen Folgen auf die Zellproliferation. Davon abgesehen wurde in Abschnitt 4.7.1 bereits der positive Effekt der pH-Wertanhebung für die Überlebensfähigkeit und die Proliferation der Zellen gezeigt.

Die Möglichkeit einen Parameter gezielt zu verändern, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Klärung des limitierenden Faktors für die Besiedelung von komplexen Zellkulturscaffolds oder Implantaten. Durch die Möglichkeit das System mit geringem Aufwand an neue Scaffolds anzupassen, den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt zu überwachen und darüber hinaus selektiv zu manipulieren, bietet sich ein weites Spektrum an vergleichenden Versuchen für die zellphysiologische Forschung.

5 Zusammenfassung

Die hier vorgestellten Sensoren und Chipkonzepte sind grundsätzlich zur Nutzung in Zellkultursystemen geeignet. Die verwendeten Zelllinien MC3T3-E1 und MG63 wachsen auf den Chips in den Systemen auch ohne Beschichtung. Dies erleichterte die Handhabung und verhinderte mögliche Beeinträchtigung der Sensormessungen durch die Beschichtungen. Die Auswirkung der Beschichtung für den Zellbewuchs sind teils negativ, so zeigten sich bei Impedanzmessungen im Bereich unter 1 kHz oft Einbrüche der $-\Delta C$ -Werte, welche eine Ablösung der Beschichtung indizieren.

Die Sauerstoffsensoren waren über längere Kulturzeiten (> 2 Wochen) und in voll konfluenten Systemen funktionsfähig, wobei die ursprüngliche Größe von $10 \mu\text{m}$ Durchmesser zu klein bemessen war. Die Sensoren mit ca. $25 \mu\text{m}$ Durchmesser waren für die Anwendung besser geeignet. Eine Weiterentwicklung zu einem Biosensor ist wegen der geringen Stromstärken und der damit verbundenen geringen Sensitivität dennoch nur bedingt realisierbar. Hierfür ist eine weitere Vergrößerung sinnvoll.

Das 3-Elektrodenprinzip ist in Mikrofluidiksystemen mit externer Referenz nicht empfehlenswert, da die Elektroden durch Unterbrechung in der Fluidikverbindung, z. B. durch Luftblasen im Verbindungsschlauch, zerstört werden können. Das Problem trat in der 2-Elektrodenanordnung nicht auf, wobei trotzdem eine langsame Auflösung der Sensoren, nach über 2 Wochen Dauermessung, in Kultur beobachtet werden konnte. Empfehlenswert wäre trotzdem eine 3-Elektrodenanordnung um die Sauerstoffeigenzehrung der Elektrode zu reduzieren.

Die Nutzung ohne sauerstoffpermeable Membran für die Zellkultur war möglich und die Bestandteile des Zellkulturmediums sind für die Messung unproblematisch. Durch eine Beschichtung (z. B. Nafion® oder PDMS) könnte die Strömungsanfälligkeit und das Überwachsen der Elektrode reduziert und die Reproduzierbarkeit der Messung erhöht werden.

Die Fertigung der Sauerstoffsensoren mittels Laserablation stellte ein Problem aufgrund geometrischer Faktoren, besonders aufgrund des hohen Energieeintrages in kleinen radialen Strukturen, dar. Eine Anpassung des Designs, zum Beispiel indem man den Sensor durch ein punktuell gelasertes Mikroelektrodenarray ersetzt, wäre möglich um Sauerstoffelektroden lasertechnisch zuverlässig fertigen zu können. Kompensiert wurde dieses Problem durch die Möglichkeit zum Einsatz optischer Sensorspots für pH und Sauerstoff. Angesichts der hohen Sauerstoffdiffusionsraten des PDMS wurde die Zellkultur unter Sauerstoffgesättigten Bedingungen durchgeführt, weshalb die Überwachung des Sauerstoffverbrauches nur bei hohen Zellzahlen sinnvoll ist. Die für das selbstgefertigte System gegebene Möglichkeit, durch Übersichten mit Natriumsulfit, anaerobe Verhältnisse herzustellen ist ein erheblicher Vorteil des Systems.

Die Messungen mit den pH-Sensoren zeigten, dass Si_3N_4 als pH-sensitives Material für die Bestimmung des pH-Wertes verwendbar ist. Die verwendeten Schichtdicken von 20 nm bis maximal 60 nm sollten noch weiter erhöht werden um die Langzeitstabilität zu verbessern. Der Abbau der sensitiven Schicht ist problematisch, wobei Harald Redlin [187] es als einen wichtigen Aspekt für die Funktionsfähigkeit, durch kontinuierliche Erneuerung der Gel-Schicht an der Grenzschicht zwischen Si_3N_4 und Medium, betrachtet. Für die Verlängerung der Nutzungsdauer solcher Chips sollte daher die Modifikation der Schicht bzw. Ihrer Wiederherstellung, z. B. durch gezieltes Nachbesputtern, untersucht werden. Für Langzeitmessungen (>4 Wochen) bzw. wiederverwendbare Chips ist das Substrat nur bedingt geeignet. Zur Verlängerung der Nutzungszeit bietet sich aber die Erhöhung der Schichtdicke auf bis zu 100 nm [180] an.

Die Dauerstabilität des Si_3N_4 ist vergleichbar zu anderen sensitiven Substraten. Sie gleicht der von Beschichtungen auf ISFETs und ist besser als von Sensoren auf Basis von Polymeren. Für Metalloxidsensoren, besonders Iridiumoxid kann keine Aussage getroffen werden, weil die Dauernutzungsstabilität, besonders in Zellkultur, bei diesen nicht angegeben wird. Die in der Literatur beschriebenen höheren Sensitivitäten, die hervorragenden Korrosionseigenschaften und die Möglichkeit elektrochemischer Abscheidung sprechen für Iridiumoxid, während der günstigere Preis, die Nutzung in Halbleiterprozessen bzw. mit Halbleiterprozesstechnik (Sputtern, CVD), die hohe mechanische Härte und die gute Biokompatibilität für Si_3N_4 als Sensorsubstrat sprechen.

Die Impedanzsensoren zeigten sich als funktional und zuverlässig. Die Störanfälligkeit der Impedanzmessungen durch die elektrische Kontaktierung und Zuleitungen, z.B. durch Zugspannung oder Luftfeuchtigkeit, konnte besonders in niedrigen Frequenzbereichen (<1kHz) zu hohen Messabweichungen führen. Das wurde auch durch Verwendung der Flexplatinen, die sich sonst sehr gut bewährt haben, nicht vollständig beseitigt. Die Auswertung der Impedanz in Form der Peakmaxima ist zwar umfassender und genauer, da so die Verschiebung der Maxima besser berücksichtigt werden kann. Allerdings ist für die Überwachung des Wachstums bzw. der Ablösung von Zellkulturen die übliche Auswertung der Kapazitäten bei einer ausgewählten Messfrequenz ausreichend und auch besser automatisierbar. Die gängige Fixierung auf eine Frequenz von 10 kHz ist problematisch,

weil sie den Einfluss des IDES-Designs nicht berücksichtigt. Entsprechend der Größenänderung der IDES muss eine Vergrößerung der Fingerabstände erfolgen, um die geometrischen Verhältnisse (Kammerkonstante) beizubehalten. Ansonsten verschiebt sich die Messfrequenz zu niedrigeren Werten. Bei den SLV-Chips lag das beobachtete Optimum für die Auswertung im Bereich von 2 kHz bis 3 kHz, bei den GeSiM-Chips im Bereich von 5 kHz bis 8 kHz. Dies ist für den Vergleich von verschiedenen Messsystemen ein wichtiger Aspekt, der in der Literatur vernachlässigt wird. Bei neuen IDES Designs, bei Verwendung anderer Zellen oder Beschichtungen müssten zumindest anfangs immer Messungen über ein Spektrum gefahren werden, um die optimale Messfrequenz zu bestimmen. Alternativ könnten auch einige ausgewählte Messpunkte im Bereich der zu erwartenden Peakmaxima verwendet werden, um die C_{PK} -Werte zu bestimmen.

Die Stimulation und der aktiv versorgte Betrieb der Zellkultur sind erfolgreich getestet worden, wobei ein kontinuierlicher Betrieb weiterhin eine Herausforderung darstellt. Die Pulsation der Versorgung stellt praktisch selbst eine Stimulation dar. Eine Trennung von Pumpstimuli und Aktor-induzierter Stimulation ist deshalb in diesem System nicht möglich. Für die Abgrenzung der mechanischen Stimulation von versorgungsabhängigen Effekten ist eine pulsationsfreie Pumptechnologie notwendig. Auch die Nutzung von 3D-Scaffolds wäre eine Möglichkeit, um über größere Volumina und durch die porösen bzw. verzweigten Strukturen den Pumpenimpuls glätten zu können. Dafür müsste aber der Aktor ersetzt werden, weil die Kompression eines 3D-Scaffolds mehr Kraft erfordert. Die verwendeten Aktoren hätten diese nicht aufbringen können.

Die Experimente in den Well-Platten mit den Proliferationsassays zeigten, dass die verwendeten Substrate biokompatibel sind und mit Ausnahme von PDMS von den Zellen auch gut angenommen werden. Somit war der Einfluss auf das Wachstum, durch die in der Mikrofluidik verwendeten Materialien, gering.

Ein wichtiger und definitiv bedeutenderer Einflussfaktor stellt der pH-Wert dar. Obwohl in dieser Arbeit primär getestet, um die Überlebensfähigkeit der Zellen während der Experimente zu erhöhen, zeigte sich ein eindeutiger positiver Effekt auf die Proliferation der Zellen. Dieser hatte einen stärkeren Einfluss als die gängigen kalzifikationsfördernden Substrate (Kalzium, β -Glycerophosphat). Besonders die beobachteten negativen Effekte bei pH-Werten unterhalb von pH 7,2, stellen Experimente bei denen eine signifikante Ansäuerung zugelassen wurde in Frage. Dies ist zwangsläufig bei stationären 3D-Kulturen oder bei Experimenten ohne Puffersysteme der Fall. Dadurch wird ein essentieller Parameter für das Wachstum und die metabolische Aktivität der Zellen zu einem negativen Effekt, der aufgrund vielfach nicht existierender Sensorik oder unzureichender Kontrolle in solchen Systemen nur bedingt berücksichtigt wird. Standardzellkulturexperimente sind somit nicht in der Lage zu 3D-Modellen vergleichbare Ergebnisse zu liefern.

Der Einfluss des pH-Wertes auf den Zustand von Knochenzellen während der Kultivierung ist nach Kenntnisstand des Autors bis jetzt (03.2016) nur in drei Publikationen [13,121,122] ausführlich beschrieben worden. Keine hat sich mit dem längerfristigen Effekt

auf die Proliferation, auf die Überlebensfähigkeit oder auf die Kalzifikation auseinandergesetzt. Die Betrachtungen fokussieren sich auf den negativen Effekt der Ansäuerung, nicht aber auf den positiven Effekt der Alkalisierung. Während die Knochenzellforschung den pH-Aspekt als therapeutischen Ansatz nicht berücksichtigt, wird er in der Zahnmedizin zumindest indirekt verwendet, denn das als Füllmaterial verwendete Kalziumhydroxid ist stark alkalisch. Bei den entsprechenden Arbeiten wird aber vor allem die antibakterielle und entzündungshemmende Wirkung des hohen pH-Wertes als Ursache genannt.

Ein erhöhter pH-Wert stellt somit einen einfachen Weg zur Optimierung der Zellkultur dar. Gezielte Kultur bei höheren pH-Werten könnte dem Absterben von Zellen in 3D-Scaffolds entgegen wirken, längerfristige Experimente vergleichbarer machen und die Kalzifikation *in vitro* fördern. In der Medizin könnte durch gezielte Beschichtung mit alkalischen Substanzen die Integration und die Ossifikation von Implantaten gefördert werden.

Gerade diese Beobachtung zeigt, wie wichtig die Überwachung und Kontrolle von Parametern wie Sauerstoff und pH in der Zellkultur ist und welchen Beitrag integrierte Sensorik für das Verständnis von Wachstumsprozessen liefern kann. Die Stärke des Effektes im Vergleich zur Zugabe gängiger kalzifikationsfördernder Substanzen, die hohen Strömungsgeschwindigkeiten durch die mechanische Stimulation sowie der Umstand, dass Osteozyten die eigentlich mechanisch sensitiven Knochenzellen sind, implizieren, dass die Wachstumsförderung durch Stimulation *in vivo* als auch *in vitro* auf eine verbesserte Versorgungssituation zurückzuführen sein könnte.

Das für diese Arbeit etablierte UKP-Laserablationsverfahren ist ein praktikabler Ansatz für die Fertigung von Glas-Chips mit elektrischen Sensoren im μm -Maßstab. Es hilft die Kosten und die Beschränkungen für die Fertigung von Chipsystemen zu verringern und die verbreitete Nutzung von Mikrosensorsystemen zu unterstützen. Die Erkenntnisse aus der Chipentwicklung, dem Fluidikdesign, sowie der Zellkulturoptimierung, besonders betreffend der proliferationsfördernden Wirkung der pH-Wert-Erhöhung, können als Grundlage für nachfolgende Arbeiten dienen, welche im Ausblick vorgestellt werden.

6 Ausblick

Die Erkenntnisse der Sensorentwicklung und der Chipfertigung wurden bereits bei dem Neudesign von MEA-Chips am Lehrstuhl für Biophysik berücksichtigt. Diese MEA-Chips verfügen über neu entworfene IDES-Strukturen, sowie auf Si_3N_4 basierende pH-Elektroden. Für eine breitere Anwendung von ZMS müssen Lösungen für das mikrofluidische Handling, besonders unter den erschwerenden Randbedingungen der Zellkultur, gefunden werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit, besonders die Nutzung von fest verlöteten, flexiblen Leiterplatten und vereinfachten Fluidikdesigns, der Verwendung von selbstversiegelnden Systemen oder die Adaption der Lösung für die Nutzung von Luer-Verbindern mit Teflonschläuchen dürften auch in Zukunft Verwendung finden.

Erste Überlegungen zur Weiterentwicklung und Etablierung einer umfassenderen Lösung dieser Probleme, führte zum Entwurf des „ACID-BASE“-Konzeptes (Automated Cell Incubation Device with Basic Sensor Environment), einem modularen Zellkultursystem welches im Zuge des Ideen-Wettbewerbes MV vorgestellt wurde. Aus diesem Konzept heraus wurden zwei Patente beantragt, welche zu Beginn des Jahres 2014 von der Universität Rostock beim Patentamt eingereicht wurden [265,266]. Das eine beschreibt ein Mehrkanal-Ventil zur Fluidiksteuerung, das andere eine spezielle Peristaltikpumpe für planare mikrofluidische Systeme. Beide haben die Vereinfachung und Größenreduktion der externen Steuerungs- und Versorgungskomponenten zum Ziel. Eine Notwendigkeit für die verbreitete Nutzung von mikrofluidischen Systemen in der Zellkultur. Die gewonnenen Erfahrungen, die Patente zusammen mit der Adaption alternativer Fertigungstechniken (Laserablation) können als Grundlage für die zukünftige Umsetzung eines modularen ZMS dienen. Die Adaption der UKP-Laserablation für die Fertigung der Chips, sowie teilweise auch der Gußformen können die Entwicklung in der Mikrofluidik allgemein fördern, indem die Prototypenfertigung beschleunigt und die Kosten für Abformwerkzeuge und Chips besonders bei geringen Stückzahlen reduziert werden.

Der beobachtete pH-Einfluss kann einen neuen Impuls für die Forschung an Knochenzellen liefern. Die Ausnutzung des Effektes durch Erhöhung des pH-Wertes in der Zellkultur erhöht die Überlebensfähigkeit und die Kalzifikationsrate von Knochenzellen und dürfte einen ähnlichen Effekt auch in der 3D-Kultur haben. Dies würde eine erhebliche Verbesserung für die Zellkultur auf komplexen Scaffolds wie Gelen, porösen Keramiken oder Metallstrukturen bedeuten, wodurch die Entwicklung von biodegradierbaren Implantaten allgemein gefördert würde. Ein Konzept zur Verbesserung von bestehenden Implantaten unter Ausnutzung dieses Effektes, wurde ebenfalls als Patent eingereicht [267].

Literaturverzeichnis

- [1] Munk, K. *Biochemie - Zellbiologie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2008.
- [2] Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*; 3., vollst. überarb. Aufl.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2009.
- [3] Schmidt, R. F. *Physiologie kompakt*; 4., korr. Und aktualisierte Aufl.; Springer: Berlin [u.a.], 2001.
- [4] Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **1965**, *37*, 614–636.
- [5] Baumann, W. H. Entwicklung eines Meßsystems zur zellulären Signalanalyse auf Basis von Feldeffekttransistoren. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität: Freiburg im Breisgau, 1996.
- [6] Arnett, T. R. Extracellular pH regulates bone cell function. *Journal of Nutrition* **2008**, *138*, 415S–418S.
- [7] Silbernagl, S.; Lang, F.; Gay, R.; Rothenburger, A. *Taschenatlas Pathophysiologie*; 4., aktualisierte und erweiterte Auflage.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2013.
- [8] Newman, R. J.; Stone, M. H.; Mukherjee, S. K. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury* **1987**, *18*, 241–246.
- [9] Delory, G. E.; King, E. J. A sodium carbonate-bicarbonate buffer for alkaline phosphatases. *Biochem J* **1945**, *39*, 245–245.
- [10] Almany, L.; Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2467–2477.
- [11] Heeg, A. 3D-Biplotting mit vitalen Zellen. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität: Freiburg im Breisgau, 2010.
- [12] Shor, L.; Güçeri, S.; Wen, X.; Gandhi, M.; Sun, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5291–5297.
- [13] Ramp, W. K.; Lenz, L. G.; Kaysinger, K. K. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone and Mineral* **1994**, *24*, 59–73.
- [14] Kromp, T.; Roggenbach, H.; Bredebusch, P. *Praxis des Tauchens*; Delius Klasing: Bielefeld, 2014.
- [15] Harada, S.; Rodan, G. A.; others Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **2003**, *423*, 349–355.
- [16] Frost, H. M. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *The Anatomical Record* **1987**, *219*, 1–9.
- [17] Frost, H. M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff’s Law: The bone modeling problem. *The Anatomical Record* **1990**, *226*, 403–413.
- [18] Frost, H. M. Why do long-distance runners not have more bone? A vital biomechanical explanation and an estrogen effect. *Journal of bone and mineral metabolism* **1997**, *15*, 9-16.
- [19] Ehrlich, P.; Lanyon, L. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis International* **2002**, *13*, 688–700.

- [20] Thompson, D. D. Age changes in bone mineralization, cortical thickness, and haversian canal area. *Calcified tissue international* **1980**, *31*, 5–11.
- [21] Sipe, J. D. Tissue Engineering and Reparative Medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2002**, *961*, 1–9.
- [22] Chaikof, E. L.; Matthew, H.; Kohn, J.; Mikos, A. G.; Prestwich, G. D.; Yip, C. M. Biomaterials and Scaffolds in Reparative Medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2002**, *961*, 96–105.
- [23] Hench, L. L.; Polak, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* **2002**, *295*, 1014–1017.
- [24] Dumas, V.; Ducharme, B.; Perrier, A.; Fournier, C.; Guignandon, A.; Thomas, M.; Peyroche, S.; Guyomar, D.; Vico, L.; Rattner, A. Extracellular Matrix Produced by Osteoblasts Cultured Under Low-Magnitude, High-Frequency Stimulation is Favourable to Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Calcified Tissue International* **2010**, *87*, 351–364.
- [25] Rheinberger, H.-J. Kulturen des Experiments. *Berichte zur Wissenschaftsgeschichte* **2007**, *30*, 135–144.
- [26] Kieninger, J. Electrochemical Microsensor System for Cell Culture Monitoring. Dissertation, University of Freiburg, Germany, 2011.
- [27] Munk, K. *Mikrobiologie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2008.
- [28] Bonk, S. M.; Lisdat, F. Layer-by-layer assembly of electro-active gold nanoparticle/cytochrome c multilayers. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *25*, 739–744.
- [29] Cammann, K.; Lemke, U.; Rohen, A.; Sander, J.; Wilken, H.; Winter, B. Chemical Sensors and Biosensors—Principles and Applications. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 516–539.
- [30] Scheller, F. W.; Wollenberger, U.; Warsinke, A.; Lisdat, F. Research and development in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, *12*, 35–40.
- [31] Buehler, S.; Stubbe, M.; Gimsa, U.; Baumann, W.; Gimsa, J. A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips. *Toxicology Letters* **2011**, *207*, 182–190.
- [32] Kartsogiannis, V.; Ng, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2004**, *228*, 79–102.
- [33] Sato, K.; Fujii, Y.; Asano, S.; Ohtsuki, T.; Kawakami, M.; Kasono, K.; Tsushima, T.; Shizume, K. Recombinant human interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, *141*, 285–291.
- [34] Kawazoe, Y.; Shiba, T.; Nakamura, R.; Mizuno, A.; Tsutsumi, K.; Uematsu, T.; Yamaoka, M.; Shindoh, M.; Kohgo, T. Induction of Calcification in MC3T3-E1 Cells by Inorganic Polyphosphate. *Journal of Dental Research* **2004**, *83*, 613.
- [35] Itakura, Y.; Kosugi, A.; Sudo, H.; Yamamoto, S.; Kumegawa, M. Development of a new system for evaluating the biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line (MC3T3-E1). *Journal of Biomedical Materials Research* **1988**, *22*, 613–622.
- [36] Ohtsuki, T.; Suzu, S.; Nagata, N.; Motoyoshi, K. A human osteoblastic cell line, MG-63, produces two molecular types of macrophage-colony-stimulating factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1992**, *1136*, 297–301.

- [37] Dean, D. D.; Schwartz, Z.; Bonewald, L.; Muniz, O. E.; Morales, S.; Gomez, R.; Brooks, B. P.; Qiao, M.; Howell, D. S.; Boyan, B. D. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of β -glycerophosphate and ascorbic acid. *Calcified tissue international* **1994**, *54*, 399–408.
- [38] Dhurjati, R.; Liu, X.; Gay, C. V.; Mastro, A. M.; Vogler, E. A. Extended-term culture of bone cells in a compartmentalized bioreactor. *Tissue engineering* **2006**, *12*, 3045–3054.
- [39] Ali, S. Y.; Sajdera, S. W.; Anderson, H. C. Isolation and Characterization of Calcifying Matrix Vesicles from Epiphyseal Cartilage. *PNAS* **1970**, *67*, 1513–1520.
- [40] Robison, R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochem J* **1923**, *17*, 286–293.
- [41] Miao, D.; Scutt, A. Histochemical Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Decalcified Bone and Cartilage. *J Histochem Cytochem* **2002**, *50*, 333–340.
- [42] Wennberg, C.; Hessel, L.; Lundberg, P.; Mauro, S.; Narisawa, S.; Lerner, U. H.; Millán, J. L. Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **2000**, *15*, 1879–1888.
- [43] Narisawa, S.; Wennberg, C.; Luis Millán, J. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *The Journal of Pathology* **2001**, *193*, 125–133.
- [44] van Straalen, J. P.; Sanders, E.; Prummel, M. F.; Sanders, G. T. B. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinica Chimica Acta* **1991**, *201*, 27–33.
- [45] Ross, M. H.; Ely, J. O.; Archer, J. G. ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY AND pH OPTIMA. *J. Biol. Chem.* **1951**, *192*, 561–568.
- [46] Szulc, P.; Chapuy, M. C.; Meunier, P. J.; Delmas, P. D. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* **1993**, *91*, 1769–1774.
- [47] Hauschka, P. V. Osteocalcin: The Vitamin K-Dependent Ca^{2+} -Binding Protein of Bone Matrix. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* **1986**, *16*, 258–272.
- [48] Hauschka, P. V.; Wians, F. H. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical Record* **1989**, *224*, 180–188.
- [49] Ducy, P.; Desbois, C.; Boyce, B.; Pinero, G.; Story, B.; Dunstan, C.; Smith, E.; Bonadio, J.; Goldstein, S.; Gundersen, C.; Bradley, A.; Karsenty, G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **1996**, *382*, 448–452.
- [50] Sugiyama, T.; Kawai, S. Carboxylation of osteocalcin may be related to bone quality: a possible mechanism of bone fracture prevention by vitamin K. *J Bone Miner Metab* **2001**, *19*, 146–149.
- [51] Anselme, K.; Linez, P.; Bigerelle, M.; Le Maguer, D.; Le Maguer, A.; Hardouin, P.; Hildebrand, H. F.; Iost, A.; Leroy, J. M. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1567–1577.
- [52] Martin, J. Y.; Schwartz, Z.; Hummert, T. W.; Schraub, D. M.; Simpson, J.; Jr, J. L.; Dean, D. D.; Cochran, D. L.; Boyan, B. D. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29*, 389–401.
- [53] Lee, Y.-K.; Song, J.; Lee, S.-B.; Kim, K.-M.; Choi, S.-H.; Kim, C.-K.; LeGeros, R. Z.; Kim, K.-N. Proliferation, differentiation, and calcification of preosteoblast-like MC3T3-E1 cells cultured onto noncrystalline calcium phosphate glass. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *69A*, 188–195.

- [54] Baschong, W.; Lambrecht, J. T. Influence of the implant surface on the early phase of osteogenesis in vitro. *Schweiz Monatsschrift Zahnmedizin* **2004**, *114*, 792–799.
- [55] St-Pierre, J. P.; Gauthier, M.; Lefebvre, L. P.; Tabrizian, M. Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7319–7328.
- [56] Bancroft, G. N.; Sikavitsas, V. I.; Van Den Dolder, J.; Sheffield, T. L.; Ambrose, C. G.; Jansen, J. A.; Mikos, A. G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12600.
- [57] Blecha, L. D.; Rakotomanana, L.; Razafimahery, F.; Terrier, A.; Pioletti, D. P. Mechanical interaction between cells and fluid for bone tissue engineering scaffold: Modulation of the interfacial shear stress. *Journal of Biomechanics* **2010**, *43*, 933–937.
- [58] Rieger, T. Einfluss fluidier Scherspannungen auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten, Dissertation, Universität Marburg: Marburg, 2004.
- [59] Hutmacher, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, *12*, 107–124.
- [60] E. Cukierman; Pankov, R.; Stevens, D. R.; Yamada, K. M. Taking Cell-Matrix Adhesion to the Third Dimension. *Science* **2001**, *294*, 1704–1708.
- [61] Cukierman, E.; Pankov, R.; Yamada, K. M. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology* **2002**, *14*, 633–640.
- [62] Krishnan, V.; Shuman, L. A.; Sosnoski, D. M.; Dhurjati, R.; Vogler, E. A.; Mastro, A. M. Dynamic interaction between breast cancer cells and osteoblastic tissue: Comparison of Two- and Three-dimensional cultures. *Journal of Cellular Physiology* **2011**, *226*, 2150–2158.
- [63] Jarrahy, R.; Huang, W.; Rudkin, G. H.; Lee, J. M.; Ishida, K.; Berry, M. D.; Sukkarieh, M.; Wu, B. M.; Yamaguchi, D. T.; Miller, T. A. Osteogenic differentiation is inhibited and angiogenic expression is enhanced in MC3T3-E1 cells cultured on three-dimensional scaffolds. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2005**, *289*, 408–414.
- [64] Abbott, A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature* **2003**, *424*, 870–872.
- [65] Ignatius, A.; Blessing, H.; Liedert, A.; Schmidt, C.; Neidlinger-Wilke, C.; Kaspar, D.; Friemert, B.; Claes, L. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* **2005**, *26*, 311–318.
- [66] Suck, K. Neue Biomaterialien für das Tissue Engineering osteochondraler Gewebe und Knochenzüchtung mittels eines inovativen 3D-Bioreaktrosystems. Dissertation, Universität Hannover: Hannover, 2006.
- [67] Pinkernell, R. Untersuchung zum 3-D- Einwachsverhalten von Osteoblasten like cells (MG63) in resorbierbare Gelatine- Schwämme. Dissertation, Philipps Universität: Marburg, 2010.
- [68] Chen, M.; Wang, X.; Ye, Z.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Tan, W. S. A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers. *Biomaterials* **2011**.
- [69] Wenzel, S. Etablierung eines dynamischen Kultursystems auf Calciumphosphat-Scaffolds unter Verwendung zweier verschiedener Zelllinien. Inaugural-Dissertation, Julius-Maximilians-Universität: Würzburg, 2010.
- [70] Lange, R.; Elter, P.; Biala, K.; Matschegewski, C.; Stählike, S.; Löffler, R.; Fleischer, M.; Nebe, J. B.; Kern, D.; Beck, U. Titanium surfaces structured with regular geometry-material investigations and cell morphology. *Surface and Interface Analysis* **2010**, *42*, 497–501.

-
- [71] Kunz, F.; Bergemann, C.; Klinkenberg, E.-D.; Weidmann, A.; Lange, R.; Beck, U.; Nebe, J. B. A novel modular device for 3-D bone cell culture and non-destructive cell analysis. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 3798–3807.
- [72] Hutmacher, D. W.; Schantz, T.; Zein, I.; Ng, K. W.; Teoh, S. H.; Tan, K. C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *55*, 203–216.
- [73] Zein, I.; Hutmacher, D. W.; Tan, K. C.; Teoh, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1169–1185.
- [74] Chevallay, B.; Herbage, D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical and Biological Engineering and Computing* **2000**, *38*, 211–218.
- [75] Takayama, Y.; Mizumachi, K. Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells. *Journal of bioscience and bioengineering* **2009**, *107*, 191–195.
- [76] Kloß, D.; Fischer, M.; Rothermel, A.; Simon, J. C.; Robitzki, A. A. Drug testing on 3D in vitro tissues trapped on a microcavity chip. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 879–884.
- [77] Layer, P. G.; Robitzki, A.; Rothermel, A.; Willbold, E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends in Neurosciences* **2002**, *25*, 131–134.
- [78] Di Maggio, N.; Piccinini, E.; Jaworski, M.; Trumpp, A.; Wendt, D. J.; Martin, I. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* **2011**, *32*, 321–329.
- [79] Takagishi, Y.; Kawakami, T.; Hara, Y.; Shinkai, M.; Takezawa, T.; Nagamune, T. Bone-like tissue formation by three-dimensional culture of MG63 osteosarcoma cells in gelatin hydrogels using calcium-enriched medium. *Tissue Engineering* **2006**, *12*, 927–937.
- [80] Orban, J. M.; Wilson, L. B.; Kofroth, J. A.; El-Kurdi, M. S.; Maul, T. M.; Vorp, D. A. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *68A*, 756–762.
- [81] Ito, A.; Mase, A.; Takizawa, Y.; Shinkai, M.; Honda, H.; Hata, K.-I.; Ueda, M.; Kobayashi, T. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2003**, *95*, 196–199.
- [82] Klein, F.; Richter, B.; Striebel, T.; Franz, C. M.; Freymann, G. von; Wegener, M.; Bastmeyer, M. Two-Component Polymer Scaffolds for Controlled Three-Dimensional Cell Culture. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 1341–1345.
- [83] Greiner, A. M.; Richter, B.; Bastmeyer, M. Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell Culture Studies. *Macromolecular Bioscience* **2012**, *12*, 1301–1314.
- [84] Klein-Nulend, J.; Van Der Plas, A.; Semeins, C. M.; Ajubi, N. E.; Frangos, J. A.; Nijweide, P. J.; Burger, E. H. Sensitivity of Osteocytes to Biomechanical Stress in Vitro. *Faseb Journal* **1995**, *9*, 441–445.
- [85] Burger, E. H.; Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone-role of the lacunocanalicular network. *Faseb Journal* **1999**, *13*, 101–112.
- [86] Owan, I.; Burr, D. B.; Turner, C. H.; Qiu, J.; Tu, Y.; Onyia, J. E.; Duncan, R. L. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1997**, *273*, 810–815.
- [87] Sandino, C.; Planell, J.; Lacroix, D. A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of biomechanics* **2008**, *41*, 1005–1014.

- [88] Gross, T. S.; Poliachik, S. L.; Ausk, B. J.; Sanford, D. A.; Becker, B. A.; Srinivasan, S. Why rest stimulates bone formation: a hypothesis based on complex adaptive phenomenon. *Exercise and sport sciences reviews* **2004**, *32*, 9-13.
- [89] Watts, D. J.; Strogatz, S. H. Collective dynamics of "small-world" networks. *Nature* **1998**, *393*, 440-442.
- [90] Strogatz, S. H. Exploring complex networks. *Nature* **2001**, *410*, 268-276.
- [91] Fritton, S. P.; J McLeod, K.; Rubin, C. T. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *Journal of biomechanics* **2000**, *33*, 317-325.
- [92] Gabbay, J. S.; Zuk, P. A.; Tahernia, A.; Askari, M.; O'Hara, C. M.; Karthikeyan, T.; Azari, K.; Hollinger, J. O.; Bradley, J. P. In vitro microdistraction of preosteoblasts: distraction promotes proliferation and oscillation promotes differentiation. *Tissue engineering* **2006**, *12*, 3055-3065.
- [93] Tanaka, S. M.; Li, J.; Duncan, R. L.; Yokota, H.; Burr, D. B.; Turner, C. H. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *Journal of biomechanics* **2003**, *36*, 73-80.
- [94] Cowin, S. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* **2002**, *2*, 256-260.
- [95] Noonan, K. J.; Farnum, C. E.; Leiferman, E. M.; Lampl, M.; Markel, M. D.; Wilsman, N. J. Growing Pains: Are They Due to Increased Growth During Recumbency as Documented in a Lamb Model? *Journal of Pediatric Orthopaedics* **2004**, *24*.
- [96] Duarte, L. R. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* **1983**, *101*, 153-159.
- [97] Klammert, U. Einfluss von niederenergetischem gepulsten Ultraschall auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten osteoblastärer Zellen in vitro, Bayerischen Julius-Maximilians-Universität: Würzburg, 2003.
- [98] Heckman, J. D.; Sarasohn-Kahn, J. The economics of treating tibia fractures. *Bulletin Hospital for Joint Diseases* **1997**, *56*, 63-72.
- [99] Volkmer, E.; Drosse, I.; Otto, S.; Stangelmayer, A.; Stengele, M.; Kallukalam, B. C.; Mutschler, W.; Schieker, M. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. *Tissue Engineering Part A* **2008**, *14*, 1331-1340.
- [100] Chao, E. Y.; Inoue, N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater* **2003**, *6*, 72-84.
- [101] Ungethüm, M.; Kolb, und W. Elektro-Osteo-Stimulation, Teil 1 Historische Entwicklung und „Stimulations“-Hypothesen Electro-osteo stimulation, Part 1 Historical development and Stimulation hypotheses. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* **2009**, *27*, 130-135.
- [102] Kaspar, D.; Seidl, W.; Neidlinger-Wilke, C.; Ignatius, A.; Claes, L. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *Journal of Biomechanics* **2000**, *33*, 45-51.
- [103] Tanaka, S. M. A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator. *Journal of biomechanics* **1999**, *32*, 427-430.
- [104] Park, H.; Kim, D.; Yun, K. S. Single-Cell Manipulation on Microfluidic Chip by Dielectrophoretic Actuation and Impedance Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, 167-173.
- [105] Park, S.-H.; Sim, W. Y.; Min, B.-H.; Yang, S. S.; Khademhosseini, A.; Kaplan, D. L. Chip-Based Comparison of the Osteogenesis of Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells under Mechanical Stimulation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46689.

- [106] Hsieh, Y.-F.; Robling, A. G.; Ambrosius, W. T.; Burr, D. B.; Turner, C. H. Mechanical Loading of Diaphyseal Bone In Vivo: The Strain Threshold for an Osteogenic Response Varies with Location. *Journal of Bone and Mineral Research* **2001**, *16*, 2291–2297.
- [107] Brighton, C. T.; Fisher Jr, J. R. S.; Levine, S. E.; Corsetti, J. R.; Reilly, T.; Landsman, A. S.; Williams, J. L.; Thibault, L. E. The Biochemical Pathway Mediating the Proliferative Response of Bone Cells to a Mechanical Stimulus*. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **1996**, *78*, 1337-1347.
- [108] Pollack, S. R.; Petrov, N.; Salzstein, R.; Brankov, G.; Blagoeva, R. An anatomical model for streaming potentials in osteons. *Journal of Biomechanics* **1984**, *17*, 627–636.
- [109] Fukada, E.; Yasuda, I. On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan* **1957**, *12*, 1158–1162.
- [110] Anderson, J. C.; Eriksson, C. Piezoelectric Properties of Dry and Wet Bone. *Nature* **1970**, *227*, 491–492.
- [111] Meng, S.; Rouabhia, M.; Zhang, Z. Electrical Stimulation in Tissue Regeneration. *Applied Biomedical Engineering. Rijeka: InTech* **2011**, 37–62.
- [112] Schmidt-Rohlfing, B.; Silny, J.; Niethard, F. U. Pulsierende Elektromagnetische Felder in der Behandlung von Verletzungen und Erkrankungen der Bewegungsorgane- eine Uebersicht und Metaanalyse. *Zeitschrift fuer Orthopaedie* **2000**, *138*, 379–389.
- [113] Griffin, M.; Bayat, A. Electrical Stimulation in Bone Healing: Critical Analysis by Evaluating Levels of Evidence. *Eplasty* **2011**, *11*, 303-353.
- [114] Kochel, M. B. Tissue engineering von Knochen: Entwicklung eines Zweikreis-Perfusionssystems für die Langzeitkultivierung von Knochenzellen in einer dreidimensionalen Matrix. Inaugural-Dissertation, Julius-Maximilians-Universität: Würzburg, 2004.
- [115] Arnett, T. Regulation of bone cell function by acid–base balance. *Proceedings of the Nutrition Society* **2003**, *62*, 511–520.
- [116] Shen, Y.; Liu, W.; Lin, K.; Pan, H.; Darvell, B. W.; Peng, S.; Wen, C.; Deng, L.; Lu, W. W.; Chang, J. Interfacial pH: A Critical Factor for Osteoporotic Bone Regeneration. *Langmuir* **2011**, *27*, 2701–2708.
- [117] Brandao-Burch, A.; Utting, J. C.; Orriss, I. R.; Arnett, T. R. Acidosis Inhibits Bone Formation by Osteoblasts In Vitro by Preventing Mineralization. *Calcif Tissue Int* **2005**, *77*, 167–174.
- [118] Han, S.-H.; Chae, S.-W.; Choi, J.-Y.; Kim, E.-C.; Chae, H.-J.; Kim, H.-R. Acidic pH environments increase the expression of cathepsin B in osteoblasts: The significance of ER stress in bone physiology. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **2009**, *31*, 428–431.
- [119] Malda, J.; Klein, T. J.; Upton, Z. The Roles of Hypoxia in the In Vitro Engineering of Tissues. *Tissue Engineering* **2007**, *13*, 2153–2162.
- [120] Partale, K. Einfluss von Belastung und einer Implantatbeschichtung auf die knöcherne Integration von Schanz´Schrauben. Inaugural, Freie Universität Berlin: Berlin, 2003.
- [121] Kohn, D. H.; Sarmadi, M.; Helman, J. I.; Krebsbach, P. H. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *60*, 292–299.
- [122] Kaysinger, K. K.; Ramp, W. K. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*. **1998**, *68*, 83–89.
- [123] Busenlechner, D.; Tangl, S.; Mair, B.; Fugger, G.; Gruber, R.; Redl, H.; Watzek, G. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3195–3200.

- [124] Bushinsky, D. A. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *the American Physiological Society* **1996**, 216–222.
- [125] Frick, K. K.; Bushinsky, D. A. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **1998**, 275, 840–847.
- [126] Sprague, S. M.; Krieger, N. S.; Bushinsky, D. A. Greater inhibition of in vitro bone mineralization with metabolic than respiratory acidosis. *Kidney International* **1994**, 46, 1199–1206.
- [127] Arnett, T. R.; Dempster, D. W. Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* **1986**, 119, 119–124.
- [128] Bushinsky, D. A.; Krieger, N. S.; Geisser, D. I.; Grossman, E. B.; Coe, F. L. Effects of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **1983**, 245, 204–209.
- [129] Martin, G. R.; Jain, R. K. Fluorescence Ratio Imaging Measurement of pH Gradients: Calibration and Application in Normal and Tumor Tissues. *Microvascular Research* **1993**, 46, 216–230.
- [130] Chakkalakal, D. A.; Mashoof, A. A.; Novak, J.; Strates, B. S.; McGuire, M. H. Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix. *Journal of Biomedical Materials Research* **1994**, 28, 1439–1443.
- [131] Frassetto, L.; Sebastian, A. Age and Systemic Acid-Base Equilibrium: Analysis of Published Data. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **1996**, 51A, 91–99.
- [132] Tylavsky, F. A.; Spence, L. A.; Harkness, L. The Importance of Calcium, Potassium, and Acid-Base Homeostasis in Bone Health and Osteoporosis Prevention. *J. Nutr.* **2008**, 138, 164–165.
- [133] Thedinga, E.; Kob, A.; Holst, H.; Keuer, A.; Drechsler, S.; Niendorf, R.; Baumann, W.; Freund, I.; Lehmann, M.; Ehret, R. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicology and applied pharmacology* **2007**, 220, 33–44.
- [134] Csete, M. Oxygen in the Cultivation of Stem Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2005**, 1049, 1–8.
- [135] Csete, M.; Walikonis, J.; Slawny, N.; Wei, Y.; Korsnes, S.; Doyle, J. C.; Wold, B. Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J. Cell. Physiol.* **2001**, 189, 189–196.
- [136] Grayson, W. L.; Zhao, F.; Bunnell, B.; Ma, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 358, 948–953.
- [137] Fehrer, C.; Brunauer, R.; Laschober, G.; Unterluggauer, H.; Reitingger, S.; Kloss, F.; Güllly, C.; Gaßner, R.; Lepperdinger, G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* **2007**, 6, 745–757.
- [138] Das, R.; Jahr, H.; van Osch, G. J. V. M.; Farrell, E. The Role of Hypoxia in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2009**, 16, 159–168.
- [139] Lennon, D. P.; Edmison, J. M.; Caplan, A. I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Journal Cellular Physiology*. **2001**, 187, 345–355.
- [140] Schön, J.; Paarmann, H.; Heringlake, P. D. M. Zerebrale Oxymetrie. *Anaesthesist* **2012**, 61, 934–940.

- [141] Severinghaus, J. W.; Honda, Y. History of blood gas analysis. VII. Pulse oximetry. *Journal of Clinical Monitoring and Computing* **1987**, *3*, 135–138.
- [142] Pfeiffer, S. A.; Nagl, S. Microfluidic platforms employing integrated fluorescent or luminescent chemical sensors: a review of methods, scope and applications. *Methods and Applications in Fluorescence* **2015**, *3*, 34003.
- [143] Sun, S.; Ungerböck, B.; Mayr, T. Imaging of oxygen in microreactors and microfluidic systems. *Methods and Applications in Fluorescence* **2015**, *3*, 34002.
- [144] Zhu, H.; Tian, Y.; Bhushan, S.; Su, F.; Meldrum, D. R. High Throughput Micropatterning of Optical Oxygen Sensor for Single Cell Analysis. *Sensors Journal, IEEE* **2012**, *12*, 1668–1672.
- [145] Cox, M. E.; Dunn, B. Oxygen diffusion in poly(dimethyl siloxane) using fluorescence quenching. I. Measurement technique and analysis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1986**, *24*, 621–636.
- [146] Griffiths, J. R.; Robinson, S. P. The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *The British Journal of Radiology* **1999**, *72*, 627–630.
- [147] Marshall, A. J.; Blyth, J.; Davidson, C. A. B.; Lowe, C. R. pH-Sensitive Holographic Sensors. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 4423–4431.
- [148] Schwedt, G. *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 1995.
- [149] Hamann, C. H.; Vielstich, W. *Elektrochemie*; 4., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.; Wiley-VCH-Verl.: Weinheim, 2005.
- [150] Lehmann, M.; Baumann, W.; Brischwein, M.; Gahle, H. J.; Freund, I.; Ehret, R.; Drechsler, S.; Palzer, H.; Kleintges, M.; Sieben, U.; others Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, *16*, 195–203.
- [151] Yeow, T. C. W.; Haskard, M. R.; Mulcahy, D. E.; Seo, H. I.; Kwon, D. H. A very large integrated pH-ISFET sensor array chip compatible with standard CMOS processes. *Sensors & Actuators: B. Chemical* **1997**, *44*, 434–440.
- [152] Hagedorn, R. Characterisation of Cell movement by impedance measurement on fibroblasts grown on perforated Si-membranes. *BBA* **1995**, *1269*, 221–232.
- [153] Kreider, K. G.; Tarlov, M. J.; Cline, J. P. Sputtered thin-film pH electrodes of platinum, palladium, ruthenium, and iridium oxides. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1995**, *28*, 167–172.
- [154] Ges, I. A.; Ivanov, B. L.; Schaffer, D. K.; Lima, E. A.; Werdich, A. A.; Baudenbacher, F. J. Thin-film IrOx pH microelectrode for microfluidic-based microsystems. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *21*, 248–256.
- [155] Jobst, G.; Urban, G.; Jachimowicz, A.; Kohl, F.; Tilado, O.; Lettenbichler, I.; Nauer, G. Thin-film Clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **1993**, *8*, 123–128.
- [156] Urban, G.; Jobst, G.; Keplinger, F.; Aschauer, E.; Tilado, O.; Fasching, R.; Kohl, F. Miniaturized multi-enzyme biosensors integrated with pH sensors on flexible polymer carriers for in vivo applications. *Biosensors and Bioelectronics* **1992**, *7*, 733–739.
- [157] Lisdat, F.; Schäfer, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *391*, 1555–1567.
- [158] Chiriaco, M. S.; Primiceri, E.; D'Amone, E.; Ionescu, R. E.; Rinaldi, R.; Maruccio, G. EIS microfluidic chips for flow immunoassay and ultrasensitive cholera toxin detection. *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 658–663.

- [159] Szeponik, J.; Möller, B.; Pfeiffer, D.; Lisdat, F.; Wollenberger, U.; Makower, A.; Scheller, F. W. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. *Biosensors and Bioelectronics* **1997**, *12*, 947-952.
- [160] Chang, S.-C.; Pereira-Rodrigues, N.; Henderson, J. R.; Cole, A.; Bedioui, F.; McNeil, C. J. An electrochemical sensor array system for the direct, simultaneous in vitro monitoring of nitric oxide and superoxide production by cultured cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *21*, 917-922.
- [161] Naware, M.; Rege, A.; Genov, R.; Stanacevic, M.; Cauwenberghs, G.; Thakor, N. Integrated multi-electrode fluidic nitric-oxide sensor and VLSI potentiostat array. In *Circuits and Systems, 2004. ISCAS'04. Proceedings of the 2004 International Symposium on*; 2004; Vol. 4, p. IV-25.
- [162] Kafka, J.; Pänke, O.; Abendroth, B.; Lisdat, F. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 7467-7474.
- [163] Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Hartwich, G.; Wang, J.; Gründler, P. DNA Hybridization Detection at Heated Electrodes. *Langmuir* **2005**, *21*, 7848-7853.
- [164] Pan, D.; Chen, J.; Nie, L.; Tao, W.; Yao, S. An amperometric glucose biosensor based on poly(o-aminophenol) and Prussian blue films at platinum electrode. *Analytical Biochemistry* **2004**, *324*, 115-122.
- [165] Shichiri, M.; Yamasaki, Y.; Kawamori, R.; Hakui, N.; Abe, H. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *The Lancet* **1982**, *320*, 1129-1131.
- [166] Dzyadevich, S. V.; Korpan, Y. I.; Arkhipova, V. N.; Alesina, M. Y.; Martelet, C.; El'Skaya, A. V.; Soldatkin, A. P. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14*, 283-287.
- [167] Huang, C.-J.; Chen, Y.-H.; Wang, C.-H.; Chou, T.-C.; Lee, G.-B. Integrated microfluidic systems for automatic glucose sensing and insulin injection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *122*, 461-468.
- [168] Perdomo, J.; Hinkers, H.; Sundermeier, C.; Seifert, W.; Martínez Morell, O.; Knoll, M. Miniaturized real-time monitoring system for L-lactate and glucose using microfabricated multi-enzyme sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, *15*, 515-522.
- [169] Clark, L. C.; Wolf, R.; Granger, D.; Taylor, Z. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *Journal of Applied Physiology* **1953**, *6*, 189-193.
- [170] Pereira Rodrigues, N.; Sakai, Y.; Fujii, T. Cell-based microfluidic biochip for the electrochemical real-time monitoring of glucose and oxygen. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *132*, 608-613.
- [171] Baumgärtl, H.; Grunewald, W.; Lübbers, D. W. Polarographic determination of the oxygen partial pressure field by Pt microelectrodes using the O₂ field in front of a Pt macroelectrode as a model. *Pflugers Arch.* **1974**, *347*, 49-61.
- [172] Ross, B.; Cammann, K.; Mokwa, W.; Rospert, M. Ultramicroelectrode arrays as transducers for new amperometric oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1992**, *7*, 758-762.
- [173] Desmond, D.; Lane, B.; Alderman, J.; Glennon, J. D.; Diamond, D.; Arrigan, D. W. M. Evaluation of miniaturised solid state reference electrodes on a silicon based component. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997**, *44*, 389-396.
- [174] Simonis, A.; Krings, T.; Lüth, H.; Wang, J.; Schöning, M. J. A „Hybrid“ Thin-Film pH Sensor with Integrated Thick-Film Reference. *Sensors* **2001**, 183-192.
- [175] Wu, C. C.; Luk, H. N.; Lin, Y. T. ; Yuan, C. Y. A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells. *Talanta* **2009**, *81*, 228-234.

- [176] Pereira Rodrigues, N.; Sakai, Y.; Fujii, T. Cell-based microfluidic biochip for the electrochemical real-time monitoring of glucose and oxygen. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, *132*, 608–613.
- [177] Kratz, L. F. *Die Glaselektrode und ihre Anwendungen*; Wissenschaftliche Forschungsberichte : Naturwissenschaftliche Reihe; Steinkopff: Frankfurt/M, 1950.
- [178] Baumann, W. H.; Lehmann, M.; Schwinde, A.; Ehret, R.; Brischwein, M.; Wolf, B. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, *55*, 77–89.
- [179] Bousse, L.; Bergveld, P. The role of buried OH sites in the response mechanism of inorganic-gate pH-sensitive ISFETs. **1984**, 65–78.
- [180] Bousse, L.; Hafeman, D.; Tran, N. Time-dependence of the chemical response of silicon nitride surfaces. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1990**, *1*, 361–367.
- [181] Köhler, M.; Landgraf, U. pH-ISFET-Strukturen Herstellung und Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften. Dissertation, Technische Universität Chemnitz: Chemnitz, 1990.
- [182] Liao, Y.-H.; Chou, J.-C. Fabrication and Characterization of a Ruthenium Nitride Membrane for Electrochemical pH Sensors. *Sensors* **2009**, *9*, 2478–2490.
- [183] Marzouk, S. A. M. Improved electrodeposited iridium oxide pH sensor fabricated on etched titanium substrates. *Analytical chemistry* **2003**, *75*, 1258–1266.
- [184] Marzouk, S. A. M.; Ufer, S.; Buck, R. P.; Johnson, T. A.; Dunlap, L. A.; Cascio, W. E. Electrodeposited iridium oxide pH electrode for measurement of extracellular myocardial acidosis during acute ischemia. *Analytical chemistry* **1998**, *70*, 5054–5061.
- [185] Tarlov, M.; Semancik, S.; Kreider, K. Mechanistic and response studies of iridium oxide pH sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1990**, *1*, 293–297.
- [186] Paul, R. *Feldeffekttransistoren: physikal. Grundlagen u. Eigenschaften*; Verlag Berliner Union Kohlhammer: Stuttgart Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz, 1972.
- [187] Redlin, H. Physikalische Untersuchung und technologische Beeinflussung der Langzeitstabilität Ionensensitiver Feldeffekttransistoren. Dissertation, Humboldt-Universität: Berlin, 1987.
- [188] Matsuo, T.; Esashi, M. Methods of isfet fabrication. *Sensors and Actuators* **1981**, *1*, 77–96.
- [189] van den Berg, A.; Bergveld, P.; Reinhoudt, D. N.; Sudhölter, E. J. Sensitivity control of ISFETs by chemical surface modification. *Sensors and Actuators* **1985**, *8*, 129–148.
- [190] Schöning, M. J.; Simonis, A.; Ruge, C.; Ecken, H.; Müller-Veggian, M.; Lüth, H. A (bio-) chemical field-effect sensor with macroporous Si as substrate material and a SiO₂/LPCVD-Si₃N₄ double layer as pH transducer. *Sensors* **2002**, *2*, 11–22.
- [191] Schöning, M. J.; Poghossian, A. Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-Art and New Directions. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1893–1900.
- [192] Haramé, D. L.; Bousse, L. J.; Shott, J. D.; Meindl, J. D. Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators. *Electron Devices, IEEE Transactions on DOI* - **1987**, *34*, 1700-1707.
- [193] Bousse, L.; Mostarshed, S.; van der Schoot, B.; De Rooij, N. F. Comparison of the hysteresis of Ta₂O₅ and Si₃N₄ pH-sensing insulators. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1994**, *17*, 157-164.
- [194] Bousse, L.; De Rooij, N. F.; Bergveld, P. Operation of chemically sensitive field-effect sensors as a function of the insulator-electrolyte interface. *IEEE Transactions on Electron Devices* **1983**, *30*, 1263–1270.

- [195] Meixner, L. K.; Koch, S. Simulation of ISFET operation based on the site-binding model. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1992**, *6*, 315–318.
- [196] Schöning, M. J.; Ronkel, F.; Crott, M.; Thust, M.; Schultze, J. W.; Kordos, P.; Lüth, H. Miniaturization of potentiometric sensors using porous silicon microtechnology. *Electrochimica Acta* **1997**, *42*, 3185–3193.
- [197] Lakard, B.; Segut, O.; Lakard, S.; Herlem, G.; Gharbi, T. Potentiometric miniaturized pH sensors based on polypyrrole films. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *122*, 101–108.
- [198] Lakard, B.; Herlem, G.; de Labachellerie, M.; Daniau, W.; Martin, G.; Jeannot, J. C.; Robert, L.; Fahys, B. Miniaturized pH biosensors based on electrochemically modified electrodes with biocompatible polymers. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *19*, 595–606.
- [199] Kieninger, J.; Marx, A.; Spies, F.; Weltin, A.; Urban, G. A.; Jobst, G. pH micro sensor with microfluidic liquid-junction reference electrode on-chip for cell culture applications. In *IEEE Sensors 2009 Conference* **2009**; 2009–2012.
- [200] Brischwein, M.; Grothe, H.; Wiest, J.; Zottmann, M.; Ressler, J.; Wolf, B. Planar ruthenium oxide sensors for cell-on-a-chip metabolic studies. *Chemia Analytyczna* **2009**, *54*, 1193.
- [201] Olthuis, W.; Robben, M.; Bergveld, P.; Bos, M.; Van der Linden, W. pH sensor properties of electrochemically grown iridium oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1990**, *2*, 247–256.
- [202] Arquint, P.; Koudelka-Hep, M.; de Rooij, N. F.; Bühler, H.; Morf, W. E. Organic membranes for miniaturized electrochemical sensors: Fabrication of a combined pO₂, pCO₂ and pH sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, *378*, 177–183.
- [203] Ceriotti, L.; Ponti, J.; Broggi, F.; Kob, A.; Drechsler, S.; Thedinga, E.; Colpo, P.; Sabbioni, E.; Ehret, R.; Rossi, F. Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *123*, 769–778.
- [204] Koester, P. J.; Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Tautorat, C.; Niendorf, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. Modular glass chip system measuring the electric activity and adhesion of neuronal cells—application and drug testing with sodium valproic acid. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 1579–1586.
- [205] K’Owino, I. O.; Sadik, O. A. Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 2101–2113.
- [206] Rügenapp, C.; Remm, M.; Wolf, B.; Gleich, B. Improved method for impedance measurements of mammalian cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2915–2919.
- [207] Yang, L.; Li, Y.; Griffis, C. L.; Johnson, M. G. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *19*, 1139–1147.
- [208] Yeon, J. H.; Park, J.-K. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. *Analytical Biochemistry* **2005**, *341*, 308–315.
- [209] Katz, E.; Willner, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 913–947.
- [210] Ibrahim, M.; Claudel, J.; Kourtiche, D.; Assouar, B.; Nadi, M. Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy. In; Mukhopadhyay, S. C.; Lay-Ekuakille, A.; Fuchs, A., Eds.; Lecture Notes in Electrical Engineering; Springer Berlin Heidelberg, 2011; pp. 169–189.
- [211] Ibrahim, M.; Claudel, J.; Kourtiche, D.; Nadi, M. Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy. *Journal of Electrical Bioimpedance* **2013**, *4*, 13–22.

- [212] Holm, S. H.; Beech, J. P.; Barrett, M. P.; Tegenfeldt, J. O. Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. *Lab on a Chip* **2011**, *7*, 1326-1332
- [213] Cho, C.-H.; Cho, W.; Ahn, Y.; Hwang, S.-Y. PDMS–glass serpentine microchannel chip for time domain PCR with bubble suppression in sample injection. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2007**, *17*, 1810–1817.
- [214] Tsai, J.-H.; Lin, L. Active microfluidic mixer and gas bubble filter driven by thermal bubble micropump. *Sensors and Actuators A: Physical* **2002**, *97–98*, 665–671.
- [215] Ríos, Á.; Zougagh, M.; Avila, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *740*, 1–11.
- [216] El-Ali, J.; Sorger, P. K.; Jensen, K. F. Cells on chips. *Nature* **2006**, *442*, 403–411.
- [217] Fragoso, A.; Latta, D.; Laboria, N.; von Germar, F.; Hansen-Hagge, T. E.; Kemmner, W.; Gärtner, C.; Klemm, R.; Drese, K. S.; O’Sullivan, C. K. Integrated microfluidic platform for the electrochemical detection of breast cancer markers in patient serum samples. *Lab Chip* **2011**, *4*, 625-631.
- [218] Melin, J.; Quake, S. R. Microfluidic Large-Scale Integration: The Evolution of Design Rules for Biological Automation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2007**, *36*, 213–231.
- [219] Eminağa, Y.; Wiest, J.; Remm, M.; Brischwein, M.; Wolf, B. Silicon Based Multi Parametric Biohybrid Microsensor Chips. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany*; Dössel, O.; Schlegel, W. C., Eds.; IFMBE Proceedings; Springer: Berlin Heidelberg, 2010; pp. 299–302.
- [220] Poghossian, A.; Ingebrandt, S.; Offenhäusser, A.; Schöning, M. J. Field-effect devices for detecting cellular signals. In *Seminars in cell & developmental biology*; 2009; Vol. 20, pp. 41-48.
- [221] Wolf, B.; Brischwein, M.; Baumann, W.; Ehret, R.; Kraus, M. Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM®). *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, *13*, 501–509.
- [222] Brischwein, M.; Baumann, W.; Ehret, R.; Schwinde, A.; Kraus, M.; Wolf, B. Mikrosensorische Systeme in der zellbiologischen Grundlagenforschung und der medizinischen Diagnostik. *Naturwissenschaften* **1996**, *83*, 193–200.
- [223] Zanzotto, A.; Szita, N.; Boccazzi, P.; Lessard, P.; Sinskey, A. J.; Jensen, K. F. Membrane-aerated microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *87*, 243–254.
- [224] Torisawa, Y.; Shiku, H.; Yasukawa, T.; Nishizawa, M.; Matsue, T. Multi-channel 3-D cell culture device integrated on a silicon chip for anticancer drug sensitivity test. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2165–2172.
- [225] Ceriotti, L.; Kob, A.; Drechsler, S.; Ponti, J.; Thedinga, E.; Colpo, P.; Ehret, R.; Rossi, F. Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Analytical biochemistry* **2007**, *371*, 92–104.
- [226] Wiest, J.; Brischwein, M.; Blank, S.; Grothe, H.; Wolf, B. Measurement and simulation of the dissolved oxygen concentration and the pH value at the O₂-FET. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*; Magjarevic, R.; Nagel, J. H., Eds.; IFMBE Proceedings; Springer Berlin Heidelberg, 2007; Vol. 14, pp. 645–647.
- [227] Hintsche, R.; Paeschke, M.; Wollenberger, U.; Schnakenberg, U.; Wagner, B.; Lisec, T. Microelectrode arrays and application to biosensing devices. *Biosensors and Bioelectronics* **1994**, *9*, 697–705.

- [228] Sung, J. H.; Shuler, M. L. A micro cell culture analog (μ CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1385–1394.
- [229] Chen, A.; Pan, T. Fit-to-Flow (F2F) interconnects: Universal reversible adhesive-free microfluidic adaptors for lab-on-a-chip systems. *Lab on a Chip* **2011**, *4*, 727-732.
- [230] Ferrell, R. T.; Himmelblau, D. M. Diffusion coefficients of nitrogen and oxygen in water. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1967**, *12*, 111–115.
- [231] Chen, C.-Y.; Chen, C.-H.; Tu, T.-Y.; Lin, C.-M.; Wo, A. M. Electrical isolation and characteristics of permanent magnet-actuated valves for PDMS microfluidics. *Lab on a Chip* **2011**, *4*, 733-737.
- [232] Lai, H.; Folch, A. Design and dynamic characterization of “single-stroke” peristaltic PDMS micropumps. *Lab on a Chip* **2010**, *2*, 336-342.
- [233] Mosadegh, B.; Taviana, H.; Lesher-Perez, S. C.; Takayama, S. High-density fabrication of normally closed microfluidic valves by patterned deactivation of oxidized polydimethylsiloxane. *Lab on a Chip* **2011**, *4*, 738-742.
- [234] Tourovskaia, A.; Figueroa-Masot, X.; Folch, A. Differentiation-on-a-chip: A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on a Chip* **2005**, *5*, 14–19.
- [235] Lii, J.; Hsu, W.-J.; Parsa, H.; Das, A.; Rouse, R.; Sia, S. K. Real-Time Microfluidic System for Studying Mammalian Cells in 3D Microenvironments. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 3640-3647.
- [236] Wu, W.; Kang, K.-T.; Lee, N. Y. Bubble-free on-chip continuous-flow polymerase chain reaction: concept and application. *The Analyst* **2011**, *136*, 2287.
- [237] Khan Malek, C.; Robert, L.; Boy, J.-J.; Blind, P. Deep microstructuring in glass for microfluidic applications. *Microsystem Technologies* **2006**, *13*, 447–453.
- [238] Khan Malek, C. G. Laser processing for bio-microfluidics applications (part I). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*, 1351–1361.
- [239] Liao, Y.; Song, J.; Li, E.; Luo, Y.; Shen, Y.; Chen, D.; Cheng, Y.; Xu, Z.; Sugioka, K.; Midorikawa, K. Rapid prototyping of three-dimensional microfluidic mixers in glass by femtosecond laser direct writing. *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 746–749.
- [240] Sugioka, K.; Cheng, Y. Ultrafast lasers—reliable tools for advanced materials processing. *Light: Science & Applications* **2014**, *3*, e149.
- [241] Gattass, R. R.; Mazur, E. Femtosecond laser micromachining in transparent materials. *Nature Photonics* **2008**, *2*, 219–225.
- [242] Ross, B.; Cammann, K.; Mokwa, W.; Rospert, M. Ultramicroelectrode arrays as transducers for new amperometric oxygen sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1992**, *7*, 758–762.
- [243] Billiau, A.; Edy, V. G.; Heremans, H.; Damme, J. V.; Desmyter, J.; Georgiades, J. A.; Somer, P. D. Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1977**, *12*, 11–15.
- [244] Clover, J.; Gowen, M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* **1994**, *15*, 585–591.
- [245] Morris, C.; Thorpe, J.; Ambrosio, L.; Santin, M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *Journal of Nutrition* **2006**, *136*, 1166-1170.

-
- [246] Hundt, S. M. Immortalisierung und Charakterisierung von Zellen osteoblastischen Phänotypes und die Mechanismen der Apoptose. Inaugural Dissertation, Philipps-Universität: Marburg, 2000.
- [247] Sudo, H.; Kodama, H. A.; Amagai, Y.; Yamamoto, S.; Kasai, S. In Vitro Differentiation and Calcification in a New Clonal Osteogenic Cell Line Derived from Newborn Mouse Calvaria. *The Journal of Cell Biology* **1983**, *96*, 191–198.
- [248] Bonk, S. M.; Oldorf, P.; Peters, R.; Baumann, W.; Gimsa, J. Fast Prototyping of Sensorized Cell Culture Chips and Microfluidic Systems with Ultrashort Laser Pulses. *Micromachines* **2015**, *6*, 364–374.
- [249] Lee, S. J.; Choi, J. S.; Park, K. S.; Khang, G.; Lee, Y. M.; Lee, H. B. Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4699–4707.
- [250] Holtappels, M.; Stubbe, M.; Gimsa, J. ac-field-induced fluid pumping in microsystems with asymmetric temperature gradients. *Physical Review E* **2009**, *79*.
- [251] Stubbe, M.; Holtappels, M.; Gimsa, J. A new working principle for ac electro-hydrodynamic on-chip micro-pumps. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2007**, *40*, 6850–6856.
- [252] Walther, S.; Bonk, S.; Stubbe, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. Mikrofluidik, innere Sensorik und Strukturentwurf für ein 3D-Zellkultursystem. In *Knöchelne Geweberegeneration Zellphysiologie im Dreidimensionalen*; Neumann, H.-G.; Klinkenberg, E.-D., Eds.; Shaker: Aachen, 2014; pp. 73–111.
- [253] Bovatsek, J.; Tamhankar, A.; Patel, R. S.; Bulgakova, N. M.; Bonse, J. Thin film removal mechanisms in ns-laser processing of photovoltaic materials. *Thin Solid Films* **2010**, *518*, 2897–2904.
- [254] Stubbe, M.; Gimsa, J. A short review on AC electro-thermal micropumps based on smeared structural polarizations in the presence of a temperature gradient. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, *376*, 97–101.
- [255] Clark, L.; Richard, W.; Donald, G.; Zena, T. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *Journal of Applied Physiology* **1953**, 189–193.
- [256] Jobst, G.; Urban, G.; Jachimowicz, A.; Kohl, F.; Tilado, O.; Lettenbichler, I.; Nauer, G. Thin-film Clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **1993**, *8*, 123–128.
- [257] McLaughlin, G. W.; Braden, K.; Franc, B.; Kovacs, G. T. A. Microfabricated solid-state dissolved oxygen sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2002**, *83*, 6, 138–148.
- [258] Ho, M.; Yu, D.; Davidsion, M. C.; Silva, G. A. Comparison of standard surface chemistries for culturing mesenchymal stem cells prior to neural differentiation. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4333–4339.
- [259] Bonk, S.; Stubbe, M.; Buehler, S.; Tautorat, C.; Baumann, W.; Klinkenberg, E.-D.; Gimsa, J. Design and Characterization of a Sensorized Microfluidic Cell-Culture System with Electro-Thermal Micro-Pumps and Sensors for Cell Adhesion, Oxygen, and pH on a Glass Chip. *Biosensors* **2015**, *5*, 513–536.
- [260] Swan, G. W. Cancer chemotherapy: Optimal control using the Verhulst-Pearl equation. *Bulletin of Mathematical Biology* **1986**, *48*, 381–404.
- [261] Ehret, R.; Baumann, W.; Brischwein, M.; Schwinde, A.; Wolf, B. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Medical and Biological Engineering and Computing* **1998**, *36*, 365–370.

- [262] Gimsa, J.; Stubbe, M.; Gimsa, U. A short tutorial contribution to impedance and AC-electrokinetic characterization and manipulation of cells and media: Are electric methods more versatile than acoustic and laser methods? *Journal of Electrical Bioimpedance* **2014**, *5*, 74–91.
- [263] Gimsa, U.; Schreiber, U.; Habel, B.; Flehr, J.; van Rienen, U.; Gimsa, J. Matching geometry and stimulation parameters of electrodes for deep brain stimulation experiments—Numerical considerations. *Journal of Neuroscience Methods* **2006**, *150*, 212–227.
- [264] Blau, A. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2013**, *18*, 481–492.
- [265] Bonk, S. M. Einrichtung zur Flusststeuerung durch einen Mikrofluidikkanal. 2014, DE 10 2014 207 249.2.
- [266] Bonk, S. M. Einrichtung zum Flüssigkeitstransport durch einen Mikrofluidikkanal. 2014, DE 10 2014 207 238.7.
- [267] Galow, A.; Bonk, S. M.; Wysotzki, P.; Modrozynski, R.; Baumann, W. H. Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenaufbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten. 2015, DE 10 2015 220 651.3.

Anhang

A1 Erläuterung zu den Anhängigen Daten

Im folgenden Abschnitt sind Versuche und Entwicklungen aufgeführt, welche dem vertieften Verständnis dienen können oder mögliche Entwicklungstendenzen aufzeigen, welche aber aus Zeit oder Aufwandsgründen nicht weiter verfolgt werden konnten.

Das beinhaltet einige Vorarbeiten von Kollegen sowie Zuarbeiten die ich für Kollegen bzw. deren Projekte gemacht habe. Die wichtigste Vorarbeit stellt die erste Generation an Sensorchips dar, welche von Dr. Marco Stubbe und Dipl. Phys. Marko Kaeselitz entworfen wurden. Die wichtigsten Zuarbeiten sind die parallel durchgeführten Arbeiten für ein 3D-Zellkultursystem für das ich die V2R-Chips konzipierte, sowie die Anwendung des UKP-Laserablationssystems für die Bohrung der Chips (für 2D-Systeme nicht notwendig).

Die Zellkulturarbeiten am 3D System wurden von Dipl. Biol. Mandy Rickler und Dr. Sabine Walther durchgeführt, die Elektrische Anbindung des Bionas 2500 Systems wurde durch Dipl. Ing. Thomas Kröger und Dipl. Ing. Carsten Tautorat durchgeführt. Simulationen der Strömungsverteilung im 3D-System wurden zum Teil durch Dipl. Phys. Christoph Litwinski durchgeführt.

A2 Waferdesign V1-Chips

Design des Wafers von Marko Kaeselitz und Marko Stubbe. Das Design (Abbildung A. 1) beinhaltete 2 Layer, die Struktur definierende Layer (rot) und die Layer für die Passivierungsöffnungen (blau). Weiterhin ist noch eine Vielzahl anderer Chips auf dem Wafer enthalten. Die Ecken welche aufgrund der Abrundung des Wafers, nur begrenzt brauchbar waren wurden für verschiedene Teststrukturen verwendet.

Die in der oberen linken Ecke gezeigten Sauerstoffsensoren verschiedener Größe wurden unter anderem für die ersten Beschichtungsversuche verwendet und mit Schichtdicken von 40 und 80 nm Si_3N_4 beschichtet. Experimente mit den IDEs und den Sauerstoffsensoren der Chips sind in der Arbeit erläutert, die pH Sensoren waren aufgrund der fehlenden dritten Layer für die Beschichtung mit der sensitiven Si_3N_4 -Beschichtung nicht verwendbar. Die auf den Chips angeordneten ET μ Ps waren funktionsfähig, wurden aber aufgrund der externen Versorgung und der aufwendigen Elektronik zu ihrer Ansteuerung im Laufe der Weiterentwicklung zu den V2-Chips nicht mehr integriert.

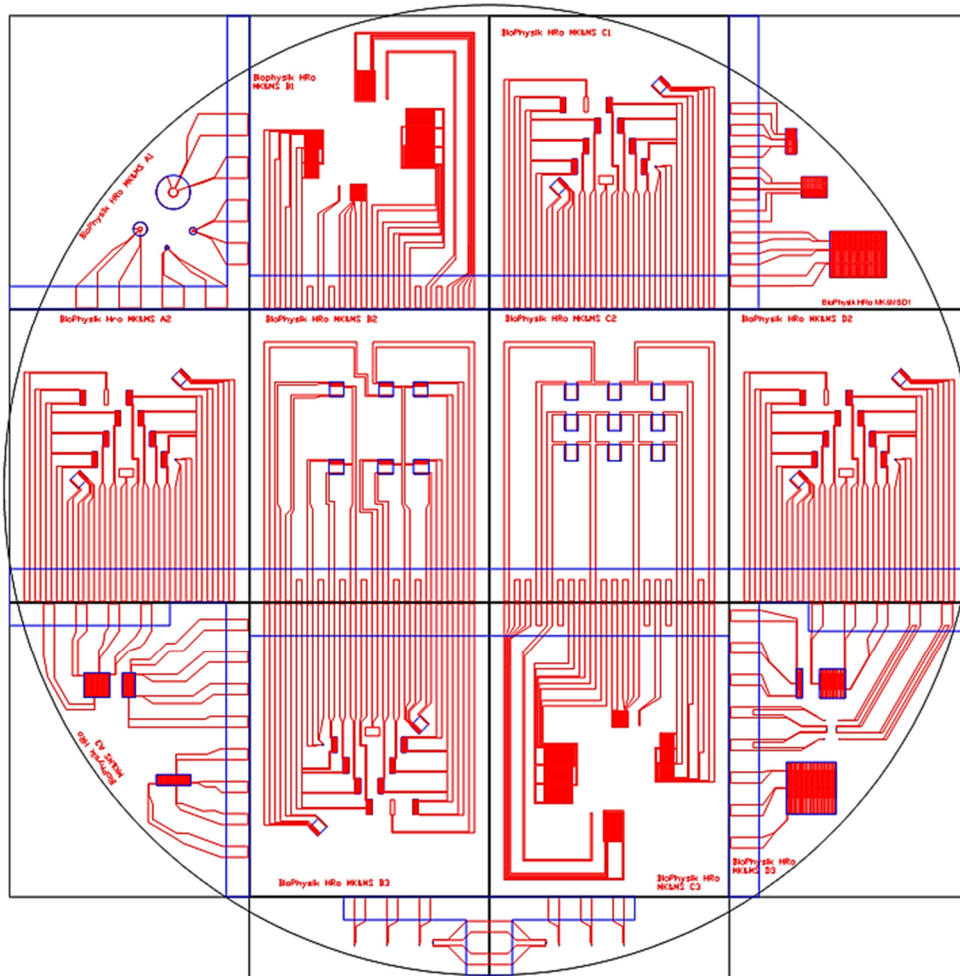


Abbildung A. 1. Wafer der V1-Chips.

Erster entworfener Wafer mit Chips sowie verschiedenen zum Teil als Testchips verwendeten Strukturen. Entworfen nach Vorgaben von Prof. Jan Gimsa, durch Marko Kaeselitz und Marco Stubbe.

A3 Chipentwicklung für das 3D-Zellkultursystem

Ziel des 3D-Systems war es Glaschips mit Sensoren für physiologische Parameter in einem gestapeltes System zu integrieren, um so eine 3-dimensionale Anordnung zu erreichen in der auf verschiedenen Ebenen Messungen durchgeführt werden können. Dadurch sollte das Verahften im Knochen bzw. in 3D-Scaffolds simuliert werden ohne die Möglichkeit zur Observation der Zellen zu verlieren.

Die aufwändige Struktur machte eine Anpassung der Sensoranordnung an das radial angeordnete Fluidiksystem notwendig. Zudem mussten die Chips welche zuvor strukturiert worden waren, mit Bohrungen versehen werden, um den vertikalen Fluidiktransport zu ermöglichen. Um die Chips bohren zu können wurden sie von den geplanten 1mm Glasdicke auf 550 μm reduziert. Angesichts fehlender Alternativen wurden die Chips dann mit dem UKP-Lasersystem gebohrt. Die Zwischenlagen wurden aus 500 μm dicken PMMA-Platten (Acrylics shop, Acryl Ltd, DE) auf die gleiche Art gefertigt (Abbildung A. 2). Die zusammengesetzten Chips mit den Zwischenlayern ergaben dann eine meanderförmige 3-dimensionale Fluidikstruktur.

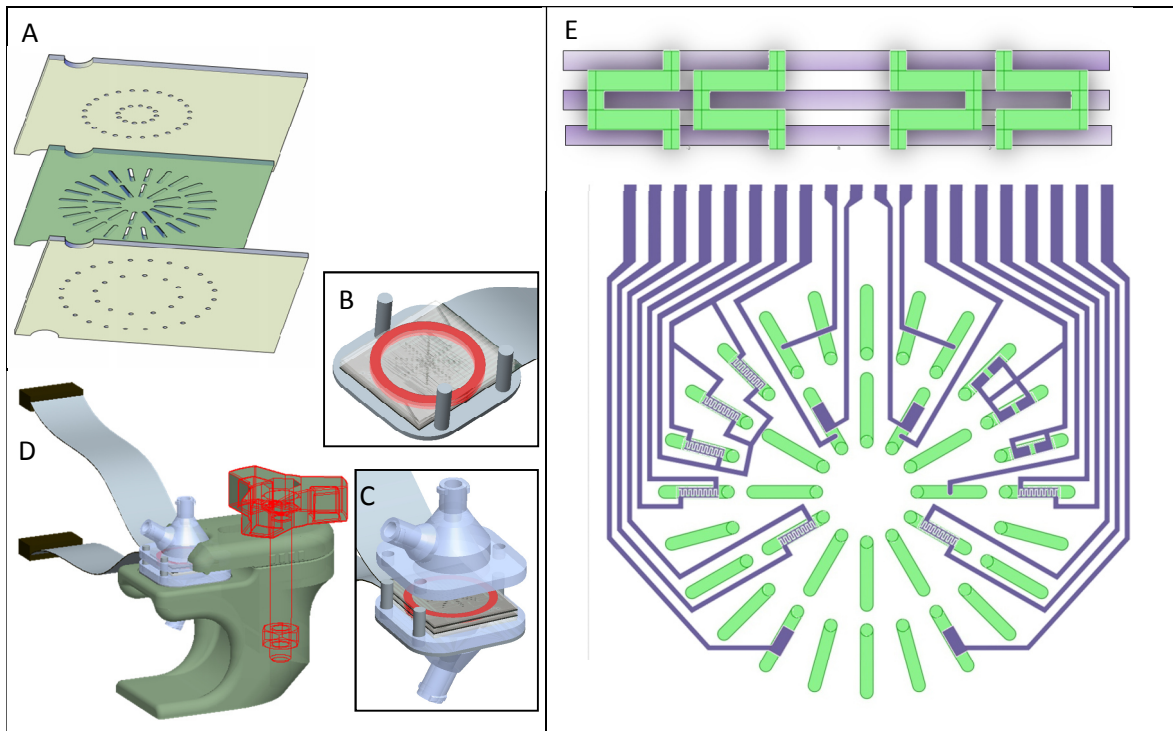


Abbildung A. 2 Darstellung der Layerstruktur des 3D-Systems.

A: Chips (Oben=äußerer Chip, Mitte=Zwischenlayer (PMMA, grün); Unten=Innerer Chip) für das 3D-System; B: Justierhalterung des IPT-Reaktors mit Führungsstiften und Dichtung (rot); C: Fluidikanschlüsse für Luer-Lock-Verbinde; D: vollständiges System aus 3D-Druckpolymer, zur Verfügung gestellt vom IPT-Wismar; E: Dargestellt ist die schematische Seitenansicht der mäanderförmig angeordneten Kanäle (grün) durch drei Layer (grau), sowie die Chipstruktur und die Fluidik in Draufsicht (violett: Sensoren, Grün: Fluidik).

A4 Lasergestützte Bohrung 3D-Chips (V2R)

Während der Entwicklung der 2D-Chips der 2-Generation war die Anpassung für die 3D-Anordnung der Chips vorgesehen. Die Chips hatten bis auf die durch die Bohrungen eingeschränkten IDEs gleiche große pH- und Sauerstoffsensoren (Abbildung A. 3)

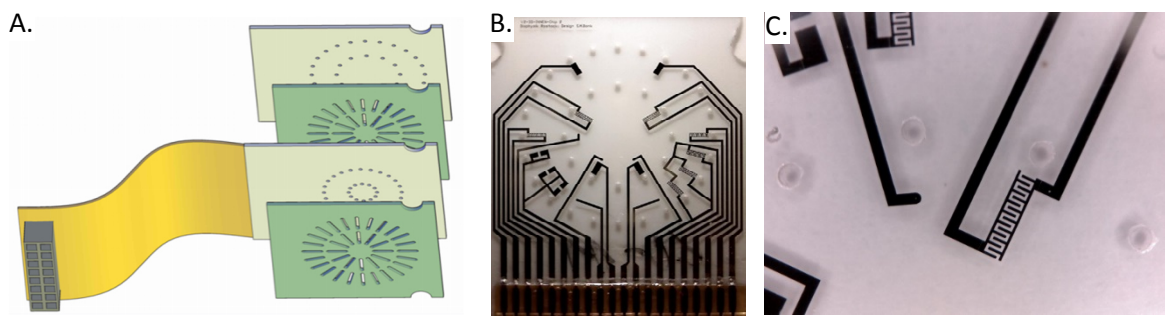


Abbildung A. 3. Abbildung der gelaserten Chips.

A.: geplanter Aufbau des Schichtstapels des 3D-Systems mit hellgrün eingezeichneten Chips und dunkelgrün dargestellten Zwischenlayern. B.: Fertig Prozessierter Chip, mit Löchern und fixierter Flexplatine. C.: Mikroskopische Aufnahme des Chips mit gelaserten Löchern (500 µm)

Das Bohren der Glaschips wurde mit dem Lasersystem der SLV realisiert, was die erste Anwendung für die Laseranlage dar. Da das System den Vorgaben der Projektpartner zufolge radialsymmetrisch sein musste, war das Design eines eigenen Chips notwendig, um den Anforderungen zu genügen (V2R). Kernforderungen für dieses Design waren, radialsymmetrischer Aufbau, Maximierung der Querverbindungen, 500 µm Kanaldurchmesser und somit 500 µm Bohrungsgröße, sowie möglichst gleichmäßige Verteilung der Sensoren.

Die Sensoren durften nicht zu nah an den Bohrungen liegen, da die thermischen Spannungen im Glas durch das Laserbohren die Strukturen sonst beschädigen könnten. Für Strukturen und Zuleitungen wurde daher ein Mindestabstand von 200 μm vorgesehen, was sich auch auf das Strukturdesign auswirkte. Außerdem musste ein Layer mit den Bohrungsdaten sowie den Daten für die Justiernuten der Chips mit in die CAD Zeichnung aufgenommen werden. Außer in der Anordnung wurden nur die IDES-Designs gegenüber den V2-Chips geändert, um innerhalb der durch die Zwischenlayer definierten Fluidik zu bleiben.

Die lasertechnische Bohrung von 500 μm dicken Chips, welche bereits strukturiert sind, ist eine ungewöhnliche und schwierige Anforderung. Bei Einhaltung der 200 μm Sicherheitsabstand zeigte es sich als realisierbar. Die Löcher hatten aufgrund des geringeren Substratabtrages in der Tiefe und eine konische Form sodass Sie auf der Unterseite bzw. bei zweiseitiger Bearbeitung in der Mitte einen geringeren Durchmesser aufwiesen.

A5 Fertigung der Gußformen per UKP-Laserablation

Als Versuch Formen mit besserer Oberflächenqualität zu erzeugen, wurden unter anderem auch Formen aus Aluminiumoxid Keramiken hergestellt, um die Eignung des Lasersystems zu überprüfen.

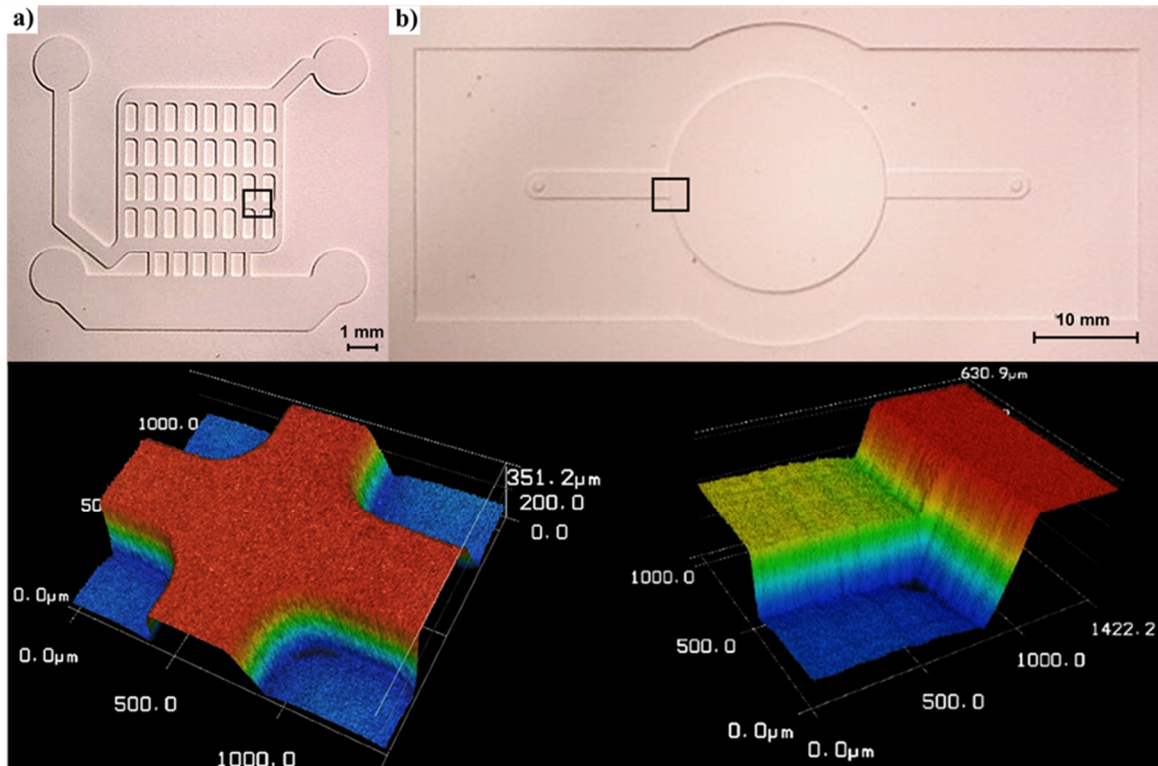


Abbildung A. 4. zwei lasergefertigte Keramik Gussformen.

(a) 30x30 mm² Chip für Fluidik 4A-S mit 240 μm Kanalhöhe. (b) Größere Struktur (33x76 mm²) für das SLV-Zellkultursystem mit ca. 230 μm Höhe (horizontale in- und outlet Zuläufe) und 465 μm (kreisförmiger Bereich). Schwarze Quadrate markieren die Positionen der Laser-Scanning Mikroskopaufnahmen im Bild darunter. Abbildung entnommen aus Bonk et al. [248]]

Pro Ablationsdurchlauf wurden ca. $12\ \mu\text{m}$ abgetragen, wobei mit $2\ \text{m/s}$ Vorschubgeschwindigkeit und einer Pulsrate von $200\ \text{kHz}$ gearbeitet wurde. Daraus resultierten Bearbeitungsgeschwindigkeiten von $3600\ \text{mm}^2/\text{min}$ pro Durchlauf.

Struktur Tiefen von $240\ \mu\text{m}$ wurden bei 20 Durchläufen nach 5 min Prozesszeit für eine Fläche von $30 \times 30\ \text{mm}^2$ erreicht. Unter Nutzung eines größeren Scanners konnte das Guss-Werkzeug für die SLV-Fluidik mit einer finalen Tiefe von $465\ \mu\text{m}$ bei $4\ \text{m/s}$ und $400\ \text{kHz}$ mit 42 Ablationsdurchläufen innerhalb von 35 min gefertigt werden (Abbildung A. 4.)

Die Fertigung der Gußformen aus Aluminiumoxid Keramiken erwies sich als schnell und gut zu realisierende Option, die Formen zeigten eine gute Oberflächenqualität der Bearbeitung. Der Nachteil des Materials lag in der Mikroporosität des Materials, sodass die Formen zur leichteren Ablösung des gegossenen PDMS mit erheblichen Mengen an Trennmitteln bestrichen werden mussten. Bei Anpassung der Laserparameter ist aber auch eine Bearbeitung anderer Materialien wie Polymeren oder Metallen möglich, sodass das Konzept auf diese erweitert werden kann.

A6 Elektronik - Palm-Sens-Multiplexer

Der in dieser Arbeit verwendeten MUX für die PalmSens Geräte waren variabel justierbar. Die Konfiguration wurde angepasst, um bessere Ergebnisse zu erhalten. Die Jumperanordnung ist in Abbildung A. 5 fotografiert.

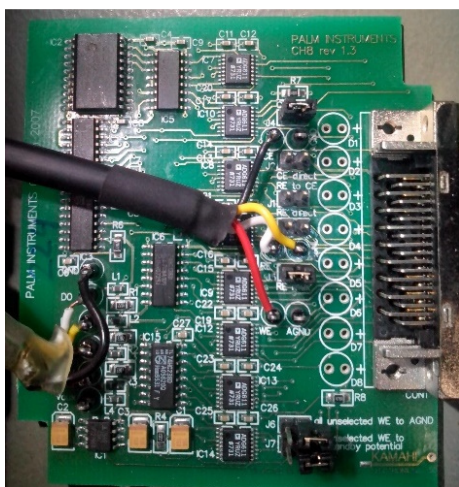


Abbildung A. 5. MUX-Platine des PalmSens mit Anordnung der Jumper

Zur Verdeutlichung des inneren Aufbaus und der Einstellung.

Die Jumperanordnung ist in Abbildung A. 5 fotografiert. Die Jumperkonfiguration des MUX wurde so gewählt, dass jedem der 8 Kanäle eine eigene Arbeitselektrode, Referenzelektrode und Gegenelektrode aufgeschaltet wurde. Dies war notwendig, um den Einfluss der Referenzen anderer Sensoren und die Leckströme zu minimieren. Für die gemeinsame Referenz bzw. gemeinsame Gegenelektroden wurden die Anschlüsse elektronisch auf eine Gegen- bzw. Referenzelektrode verschaltet. Hierdurch könnten die Probleme durch die gegenseitige Beeinflussung der Messungen aufgrund von parasitären Kapazitäten oder Kriechströmen hervorgerufen worden sein. Bei der Justierung wurde auch überprüft ob abgeschaltete

Arbeitselektroden auf den AGND Anschluss (Masse) oder ein festes Potential gelegt wurden. Dies wurde beides deaktiviert, um die Potentialeinstellung der pH-Sensoren nicht zu beeinträchtigen. Für die Sauerstoffsensoren wäre zudem die Einstellung des OCP bei Abschaltung der Messung nicht möglich gewesen. Anzumerken ist ebenfalls die unvorteilhafte Anordnung und fehlende Abschirmung der Kabel im Inneren des MUX was auch zu negativen Effekten geführt haben kann.

A7 Abhängigkeit der Zyklen vom gewählten Messbereich

Die Zyklovoltammogramme dienen der Charakterisierung der Sensoren, während die amperometrischen Messungen den erreichbaren Reduktionsgrenzstrom bestimmen sollten. Bei dem Vergleich der Zyklen mit den amperometrischen Messungen, der gleichen Sensoren, wurden Differenzen der Stromantwort festgestellt. Um sicher zu gehen, dass diese Differenzen aus den unterschiedlichen Messmodi resultieren, wurden zum Vergleich sehr kurze Zyklen im Bereich des Arbeitspotentials der amperometrischen Messungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten im für V2-Chip entwickelten Zellkultursystem 4A-OB (Abbildung 4-11) im Brutschrank bei 37 °C, um die Differenz bei Zellkulturbedingungen zu erhalten.

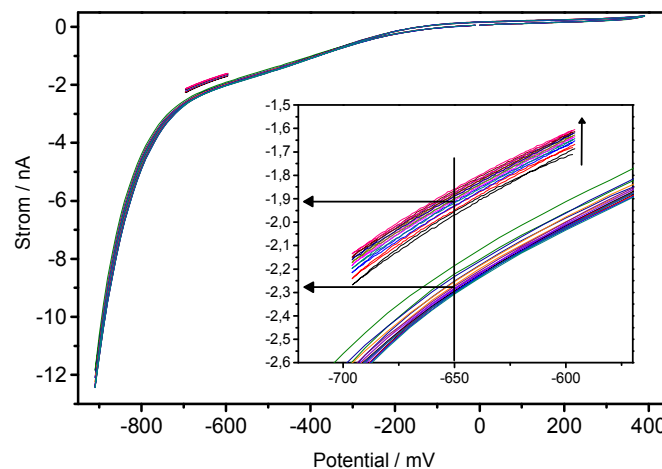


Abbildung A. 6 Zyklovoltammogramme in luftgesättigtem AMEM-CF gemessen im 2D-Kultursystem. Sauerstoffsensoren auf V2-Chip bei 37 °C. Messung von jeweils 10 Zyklen; Kurvenschar 1: von -0,7 V bis -0,6 V mit 0,01 V/s gemessen; Kurvenschar 2: -0,9 V bis 0,4 V mit 0,1 V/s gemessen. Pfeil: Tendenz der Verschiebung der Kurven während der Zyklen (nur Kurvenschar 1). Kurven in sauerstofffreiem Medium lagen übereinander und sind nicht aufgeführt.

Die exemplarisch dargestellten Zyklovoltammogramme in Abbildung A. 6 zeigen die Differenz bei Messung im eingeschränkten Bereich bei 37 °C von -0,7 V bis -0,6 V, zu den unmittelbar darauf durchgeführten Messungen im bisher verwendeten Bereich von -0,9 V bis 0,4 V. In sauerstofffreiem Medium gingen die Kurven ineinander über, das heißt hier lagen die eingeschränkten Scans innerhalb der vollständig gefahrenen Scans, weswegen diese nicht abgebildet wurden. Die Werte für sauerstoffhaltiges Medium im eingeschränkten Messbereich sind etwa 0,4 nA geringer als die der über den vollen Bereich gefahrenen Zyklovoltammogramme. Weiterhin zeigten die verkürzten Zyklen eine tendenzielle Abnahme des Signals besonders bei den ersten Zyklen; ein Effekt der mit den Zyklen über den vollen Bereich nicht feststellbar war.

Die Differenz selbst lässt sich durch den Eigenverbrauch des Sensors erklären. Der Sensor befindet sich während der kurzen Zyklen die gesamte Zeit im reduzierenden Bereich und verbraucht damit kontinuierlich Sauerstoff. Bei einem Vollzyklus hingegen arbeitet er die Hälfte der Zeit in einem Bereich über -0,3 V vs. Ag/AgCl und somit im nicht reduzierenden Bereich. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Rückreaktion der entstanden OH⁻ Ionen, wie sie in den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Ross beschrieben wird [172]. Dies würde im reduzierenden Bereich eine erhöhte Sauerstoffkonzentration

und somit ein höheres Messsignal hervorrufen. Bei der Nutzung der Zyklovoltammetrie für die Sauerstoffmessungen statt des amperometrischen Messmodus stehen den Vorteilen, höherer Sensitivität und geringerer Zehrung der erheblich höhere Aufwand und die Problematik unerwünschter Nebenreaktionen im oxidierenden Bereich gegenüber.

A8 Gesputterte Sensoren mit Schichtdicken von 40 nm und 80 nm

Im Zuge der Chipentwicklung wurden Si_3N_4 auch auf bestehenden Elektroden mit anderen als den später verwendeten Schichtdicken gesputtert. Dafür wurden mehrere Sauerstofftestelektroden aus dem Randbereich des V1-Wafers, flächig mit Si_3N_4 besputtert. Die Elektroden hatten eine Fläche von 84 mm^2 bzw. 8 mm^2 . Sie zeigten eine feste Schicht die auch eine Sensitivität auf pH-Wertänderungen zeigte. Aufgrund der verwendeten Parameter lagen die Schichtdicken bei ca. 40 nm bzw. ca. 80 nm. Die Sensitivität lag bei $-35,8 \pm 4,7 \text{ mV/pH}$ für die 40 nm und $-35,1 \pm 5,1 \text{ mV/pH}$ für die 80 nm Schichten. Die gemessene Sensitivität basiert auf den Werten, welche die Sensoren 120 s nach Start der Potentialmessung erreichten. Die Messung erfolgte unmittelbar nach Wechsel der pH-Lösung wie bei den Messungen der konventionell gefertigten Chips. Es konnten Messungen der gesputterten Schichten im Bereich von pH 4 bis pH 10 mit durchgeführt werden (Abbildung A. 7).

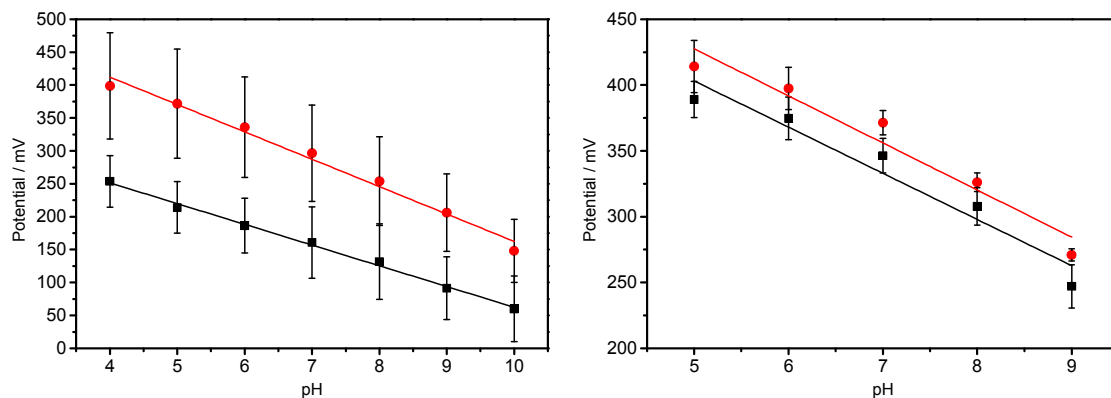


Abbildung A. 7. Darstellung der Messwerte der 40 nm (rot) und 80 nm (schwarz) Testchips mit linearen Regressionsgeraden.

Links: Erste Messungen nach Fertigung über den maximalen Bereich mit einem Sensor in beide Messrichtungen mit 120 s Einstellzeit (3 Wdh.: N=6), mit $-41,6 \pm 2,0 \text{ mV/pH}$ (40 nm) und $-31,5 \pm 0,9 \text{ mV/pH}$ (80 nm); Rechts: Messungen über den reduzierten Messbereich nach 1 Woche Lagerung in PBS zum Quellen, Werte nach 120 s Einstellzeit (2 Sensoren à 3 Wdh.: N=12) mit Sensitivitäten von $-35,8 \pm 4,7 \text{ mV/pH}$ (40 nm) und $-35,1 \pm 5,1 \text{ mV/pH}$ (80 nm)

Es wurden zu Testzwecken wie beschrieben Schichten mit 40 bzw. 80 nm besputtert. Die Werte für 40 nm wurden verwendet, da für diese Schichtdicken die Prozesszeit von 60 s bekannt war. Durch Wiederholen des Sputtervorganges auf demselben Substrat wurde die Schicht von 80 nm gefertigt. Aufgrund der flächigen Beschichtung war eine Messung der Schichtdicken nicht möglich. Die 40 nm Schichten zeigten aber dieselbe rote Färbung wie die 40 nm Schichten der GeSiM-Chips, während die 80 nm Schichten eine dunklere blaue Färbung hatten, vergleichbar der der 60 nm Schichten der GeSiM-Chips. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Zielschichtdicken auch erreicht wurden.

Die Sensoren zeigten vergleichbare Sensitivitäten wie die 20 nm und 60 nm Sensoren der GeSiM-Chips. Zudem zeigte sich hier kein abweichendes Verhalten der 40 nm Schichtdicken. Die Messung zeigt außerdem, dass eine weitere Erhöhung der sensitiven Schicht bis auf mindestens 80 nm möglich ist. Da in der Literatur Schichtdicken von bis zu 100 nm für ISFETs beschrieben sind, könnte auch eine weitere Erhöhung möglich sein.

A9 Scilab Programm zur Auswertung der Kapazitätsdaten

Um die Auswertung der Spektren über den 30-Kanal Multiplexers des Sciospec zu automatisieren wurde ein entsprechendes Programm geschrieben. Hierfür wurde auf das als Freeware verfügbare Paket Scilab 5.5.1 zurückgegriffen. Da die Software des Sciospec nur die Ausgabe aber keine Verarbeitung vorsah, musste diese ebenfalls über das Programm umgesetzt werden. Das Sciospec wurde so eingerichtet, dass die gemessenen Spektren über den Autosavemodus abgespeichert wurden. Dadurch wird für jede Messung ein Ordner erstellt in welchen für jeden Kanal eine eigene Datei im Format „Bezeichnung [Kanal1, Kanal2]Wiederholung“ (Bsp. 5-10kHz-6W [8, 12]0) abgespeichert wurde. Bei 60 Kanälen wurden 30 Dateien für jeden Messdurchlauf erstellt. Um aus diesen Textdateien im kommaseparierten Format (frequency[Hz], Re, Im) die Impedanz und die Differenzen der Impedanz zu berechnen wurde das nachfolgende Skript geschrieben. Es liest die Dateien aus den Unterordnern ein, fügt Sie in einer Datei mit den Real und Imaginärteilen ein, berechnet daraus die Impedanz, welche für jede Messung in einer eigenen Datei abgespeichert wird. Weiterhin fügt es alle Impedanzdaten in einer Datei nacheinander ein. Dies ist für Messungen bei einer definierten Frequenz sinnvoll umso den Kapazitätsverlauf aus einer Datei importieren zu können. Aus diesen Daten wird die Differenz aller Spektren zum Tag-0 berechnet. Die so gewonnen Messungen wurden nicht aufgeführt, da sie aufgrund des IDEs Messbereiches der SLV-Chips zu störanfällig waren und diese Daten aufgrund der Menge und anderer Einflussfaktoren (Handling, Einflüsse des Brutschrankes) nicht verlässlich mit mikroskopischen Beobachtungen korreliert werden konnten.

```
clear()
// Die Ordner werden aufsteigend geordnet. lexigrafisch das heißt, //02.03 ist kleiner als 10.03 aber 2.03
// ist größer als 10.03!!!! VOR AUSFÜHRUNG !! führende Nullen einfügen!!!! Sciospec macht es nicht!!
// AUSGABENDATEI FÜR ALL KAP UD DIFFERENZ WERDEN IN ÜBERGEORDNETEN ORDNER
// EINGEFÜGT!!!

direct=uigetdir('\Users\WERKBANK\Documents\WELISA')
// öffnet Dialogfenster zur Definition des Ordners Pfad des Hauptordners!! in direct

sammel=[];
sammelKap=[];
cd(direct);

Ordnerfrage=isdir(listfiles(direct));
Ordner=(listfiles(direct));
Ordneri=find(Ordnerfrage==%T);

Ordner=Ordner(Ordneri);
```

```

//Ordernum=length(Ordner);

Ordernum=size(Ordner);
Ordner=gsort(Ordner,'g','i');

for a=1:Ordernum(1)
//Generiert mir den Pfad in den Ordner
PFAD=(direct+"\ "+Ordner(a));

files2=listfiles([PFAD+"\*.spec"]);
// zeigt nur die Spec Dateien an
//files2=(PFAD+"\'+files2); sortiert die Ordern nach Bezeichnung

files = gsort(files2,'g','d');
//Sortier es absteigend
files(31)=files(1);

files=files(2:$)
// die 8 12 nach hinten schieben, files2(1) bleibt gefüllt
//$ ist letztes Element!!!

files = gsort(files2,'g','d');
//Sortier es absteigen
files(31)=files(1);
// die 8 12 nach hinten schieben, files2(1) bleibt gefüllt
files=files(2:$)
//$ ist letztes Element!!!

filenum=size(files);
filenum=filenum(1);
// übergibt filenum nur eine Zahl
// Überträgt Anzahl der Dateien aus files nach filenum um Zähler zu erhalten.
// Array definieren einfach Name "Array_=[]"
// hängt backslash an um es zu einem Directory zu machen welches auf PWD gesetzt werden kann.
direct2=direct+"\ ";
//Übergibt den Pfadnamen auf das Scilab current directory
cd(direct2)
//wechselt auf nächst höheren Ordner
cd("..");
//übergit den Ordner an die Variable direct2
direct2=pwd();
Textdatei_Daten=[];
Textdatei_Dateiname=[];
Textdatei_All=[];
Textdatei_COLNAME=[];
Kapazitaet_Daten=[];

//Wichtig er beginnt bei 1 zu zählen
Textdatei_Dateiname(1)=files(1)
Textdatei_Daten=csvRead(Textdatei_Dateiname(1),",",".",[],[],[],5);
Textdatei_All=[Textdatei_All,Textdatei_Daten];

for i=2:filenum(1)
Textdatei_Dateiname=files(i);
//M = csvRead(filename, separator, decimal, conversion, substitute, regexcomment s, range, head
Textdatei_Daten=csvRead(Textdatei_Dateiname,",",".",[],[],[],5);
//[Textdatei_Daten, comments]=csvRead(Textdatei_Dateiname,",",".",,,5,)
Textdatei_Daten=[Textdatei_Daten(:,2),Textdatei_Daten(:,3)];
//: alles
Textdatei_All=[Textdatei_All,Textdatei_Daten];
//; unterander anhängen. , nebeneinander anhängen
end;

```

```

counter=size(Textdatei_All(1,:));
counter=counter(1,2);
FREQ=Textdatei_All(:,1);
Kapazitaet_Daten=[FREQ]
//überträgt die Frequenzspalte
for i=2:2:counter
    RE=Textdatei_All(:,i);
    //i=i+1;
    IM=Textdatei_All(:,i+1);
    KAP=((2*pi*FREQ).^(-1)).*(-IM./(RE.^2+IM.^2));
    Kapazitaet_Daten=[Kapazitaet_Daten,KAP];
end;

Textdatei_COLNAME(1,1)="frequenz ";
Kapazitaet_COLNAME(1,1)="frequenz ";

//Jetzt soll noch die Beschriftung generiert werden
for i=1:filenum(1)
    // ascii Nr von [ =91 ] =93
    col=ascii(files(i));
    von=find(col==91);
    bis=find(col==93);
    Textdatei_COLNAME=[Textdatei_COLNAME+"RE "+(ascii(col(von:bis))+" "];
    Textdatei_COLNAME=[Textdatei_COLNAME+"IM "+(ascii(col(von:bis))+" "];
    Textdatei_COLNAME=ascii(Textdatei_COLNAME)
    Textdatei_COLNAME=ascii(Textdatei_COLNAME)

    Kapazitaet_COLNAME=[Kapazitaet_COLNAME+(ascii(col(von:bis))+" "];
    Kapazitaet_COLNAME=ascii(Kapazitaet_COLNAME);
    Kapazitaet_COLNAME=ascii(Kapazitaet_COLNAME);
    //Hängt an die bestehende Frequenzspalte die Bezeichnungen an
end;
filename=(direct+"\ALL-"+Ordner(a)+".RX");
csvWrite (Textdatei_All, filename,";",[],[],Textdatei_COLNAME);
//Tab als delimiter
// Punkt am ENDE um ELEMENTWEISE Berechnungen durchzuführen
sammel=[sammel;Textdatei_All];

    filename=(direct+"\ "+Ordner(a)+"-Kapazitaet-.kap");
    csvWrite (Kapazitaet_Daten, filename,";",[],[],Kapazitaet_COLNAME);
sammelKap=[sammelKap;Kapazitaet_Daten];
end
// neuen Vektor generieren Für Übergaben nach All Kap Differenz notwendig??
unite=[string(sammelKap)];
csvWrite (unite,'ALL-KAP-nacheinander.DAT',"",[],[],[Kapazitaet_COLNAME]);
Block=[];
unite=sammelKap;
//ii=size(Kapazitaet_Daten,1)/size(Ordner,1);
// rausnehmen der Anzahl der Ornder - den der abgezogen wird.
ii=size(Ordner,1);
zi=size(Kapazitaet_Daten,1)
Differenz=[];
for i=1:ii-1
    Block=[unite(1:zi,:)-unite((i*zi+1):(i*zi+zi,:));
    Differenz=[Differenz; Block];
end;
unite=Differenz;
csvWrite (unite,'Diff-von-ALL-Kap.DAT',"",[],[],[Kapazitaet_COLNAME])

```

Abbildung A. 8. Auswerteprogramm auf Scilab-Basis für die Auswertung der Daten des Sciospec Multiplexers.

A10 Zellkulturprotokolle

Um eine direkte Reproduktion bzw. Vergleichbarkeit der Experimente zu ermöglichen, sind im Folgenden, Protokolle für das Zellhandling bzw. die Durchführung der in der Arbeit genannten relevanten Assays aufgeführt.

ATP-Lite Assay

Vorbereitungen:

- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen, Substratsolution lösen (bei Bedarf)
- Standardreihe aus 10 mM Standard herstellen (1:100 VD, 1:2 VD Reihe)
- 96Well Microplatte (weiß-undurchsichtig)
- Pipetierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..)
- benötigtes Medium auf 37 °C bringen
- dest. Wasser, Pipettenspitzen usw.

Durchführung:

- Medium komplett aus den zu untersuchenden Wells absaugen
- **100 µl** frisches Medium und **50 µl** Lysispuffer in die nun leeren Wells
- vortexen, 5 min, 500-700 rpm
- Testplatte (weiß, undurchsichtig, 96Well) vorbereiten:
 - **90 µl** Medium für die Standards vorlegen + **50 µl** Lysispuffer
 - **90 µl** Medium für die Nullwerte vorlegen + **50 µl** Lysispuffer
- **150 µl** lysierte Zellen (96Well Zellplatte) in die Wells der Testplatte übertragen
- **10 µl** der Standards und **10 µl** des dest. Wassers in die entsprechenden Wells
- **50 µl** Substratpuffer in alle befüllten Wells auf der Testplatte
- vortex, 5 min, 500-700 rpm
- Testplatte **10 min** dunkel stellen
- Platte messen: (LumiStar)

Benutzung des Lumistars:

- Gerät an
- Program: LumiControl -> Run -> TestSetup ->
- Bei Optionen-Tests auswählen der Platte:
 - new-Plate, new Test (Name des Testes eintragen),
- Auswahl des Plattenformates:
 - Microplate Costar96 – Layout – Content (Standards, Emty, Blank, Sample)
 - Standards sind auf der Testplatte doppelt belegt:
 - also: S1; S2; S3

Messung von WST im Überstand

Vorbereitungen:

- WST-Reagenz aus dem Kühlschrank entnehmen
- Medium auf 37 °C temperieren

Durchführung:

- Testplatte (96Well), flacher Boden vorbereiten
 - Platte beschriften
 - Blanks auffüllen mit 500µl Medium und 5µl WST-1 Reagenz
- Spektrometer (Polarstar) und Rechner anschalten
 - Messprogramm aufrufen (Fluostar-Galaxy) und Plattenbelegung sowie Messprozedur einstellen
 -
- **Testlösungskonzentration 1:100**
 - Die Konzentration beträgt 1:100 WST Reagenz pro Volumen Medium
 - Basierend auf einer 24 Well Platte entspricht dies 5µl WST Reagenz auf 500µl Medium
- Zellkulturmedium aus den Wells entnehmen
- **500 µl Medium + 5µl WST Reagenz pro Well zufügen**
- **1h bei 37 °C und 5 % CO₂ zusammen mit der Testplatte kultivieren**
- Nach Entnahme aus dem Brutschrank das Medium abnehmen und je 100µl in die Wells der Testplatte pipettieren.
- Kulturmedium zu den Zellen geben und mit der Platte nach Bedarf weiter arbeiten.

Platte messen:

- Mit Platte die Justierprozedur durchführen (nicht zwingend erforderlich)
- WST Belegung – Bzw. angepasste Plattenbelegung verwenden
- Einstellen auf Multiread
- Messung 1. Bei 450 nm im Spektrometer durchführen.
- Messung 2. Referenzmessung
 - Daten kontrollierbar durch Aufrufen der Excel Tabelle mit dem Excelbutton
 - Einstellung 1. Tabelle: oberste Tabelle! Rohdaten (Raw Data) – Datensatz 1
 - Einstellung 2. Tabelle: Rohdaten – Datensatz 2
 - Einstellung 3. Tabelle: Tabelle 1. – Tabelle 2.

Anmerkungen:

- Für Auswertung Daten in neues Excel Sheet kopieren.
- Beachten dass die Blanks nicht über alle gemittelt werden.
- Bei der ersten Kopie den Kopfteil kopieren, um die Einstellungsdaten zu erhalten

Ausfrieren von Zellen

Vorbereitungen:

- **Fraktionen von Serum, Antibiotika und L-Glutamin auftauen**

Medium + vorbereiten

Anmerkung: **Medium+** bezeichnet alle Medien nach Zugabe der relevanten Zusätze, die erst vor Verwendung zugegeben werden, da sie sonst zerfallen oder abgebaut werden

- Medium (alpha MEM) Biochrome oder Gibco unter der Steril-Bank (BOX) mit
 - 10 % Fetal Bovin Serum (FBS)
 - 1 % Antibiotika z.B Pentamycin/Streptomycin (Pen/Strep)
 - 1 % L-Glutamin

Ansetzen und auf 37 °C temperieren

Unter BOX bereitzustellen:

- Zellkulturflasche 25 ml (T25),
- Pipettenspitzen, Serologische-Pipetten,
- AkkuJet, Pasteurpipetten, Reaktionsgefäßeständer,
- 15ml und 50ml Falcon, 70 % Ethanol-Sprühflasche

Durchführung:

- Zellen aus dem Stickstoff holen und schonend bei Raumtemperatur (**RT**) auftauen
- in ein 15 ml Falcon **5 Volumenteile** des Medium+ geben und Zellen hinzufügen
- Zentrifugieren bei **800 rpm, 5 min, RT**
- Überstand dekantieren, Pellet in **5 ml** Medium+ (für T25) resuspendieren
- **min. 1 d** im Inkubator bei **5 % CO₂, 95 %** Luftfeuchte und **37 °C** inkubieren
- nach max. **1-4 d** Zellen umsetzen

Splitten von Zellen

Vorbereitungen:

- Sofern nicht vorhanden Medium+ vorbereiten (siehe AAW: 2012-2-V1)
- Medium+ herstellen: zugeben von 1 % Pentamycin/Streptomycin (P/S), sowie 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) zu Carbonat gepuffertem Alpha-MEM (Hersteller variabel)
- Medium+, Trypsin und PBS auf 37 °C vorwärmen

Unter BOX bereitzustellen:

- Zellkulturflasche 25 ml (T25)
- Pipettenspitzen, Serologische-Pipetten,
- AkkuJet, Pasteurpipetten, Reaktionsgefäßeständer,
- 15ml und 50ml Falcon, 70 % Ethanol-Sprühflasche

Durchführung:

- Medium aus T25 dekantieren (auf Zellrasen achten falls abgesaugt wird)
- Zellrasen (ZR) mit **5 ml** PBS spülen (vorsichtig schwenken)
- PBS dekantieren
- **1ml** Trypsin auf den ZR → **30s** inkubieren → Trypsin wieder dekantieren
- Zellen für **2,5 min bei 37 °C** inkubieren
- **neue T25 beschriften:**
 - Zelllinie, Medium, Passage, Umsatzverhältnis od. Zellzahl, Datum und Name
- Zellen unter den Durchlichtmikroskop begutachten (sind alle Zellen abgelöst?)
- **5 ml** Medium+ in die T25 geben und Zellen vorsichtig resuspendieren (durch Mehrfachpipetieren oder manuelles Schütteln)
- resuspendierte Zellen in ein **15 ml** Falcon überführen
- Zentrifugieren bei **800 rpm** für **5 min bei RT**
- Medium+ in das beschriftete **neue T25** vorlegen
- Überstand aus dem Falcon dekantieren und verwerfen (mit Pasteurpipette vorsichtig absaugen – ACHTUNG auf das Zellpellet achten!!)
- Zellpellet in **5 ml** Medium+ vorsichtig resuspendieren (durch Mehrfachpipetieren oder manuelles Schütteln)
- Je nach Umsatzverhältnis die Zelllösung in das **neue T25** geben und auf 5 ml auffüllen
 - (z. B. – T25: Umsatzverhältnis 1:5; 1 ml überführen und mit 4 ml Medium + auffüllen)
- Inkubation bei **37 °C, 5 % CO₂ und 95 %** Luftfeuchtigkeit
- Zellen bei **95 % - Konfluenz** abermals umsetzen

Publikationsliste

Paper-Publikationen

S. M. Bonk and F. Lisdat. Layer-by-layer assembly of electro-active gold nanoparticle/cytochromeC multilayers *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 739–744.

S. M. Bonk, P. Oldorf, R. Peters, W. Baumann, J. Gimsa. Fast Prototyping of Sensorized Cell Culture Chips and Microfluidic Systems with Ultrashort Laser Pulses. *Micromachines*, **2015**, *6*, 364–374.

S. M. Bonk, M. Stubbe, S. Bühler, C. Tautorat, C. Litwinski, W. Baumann, E.-D. Klinkenberg and J. Gimsa. Design and characterization of pH, oxygen and adhesion sensors as well as electro-thermal micro-pumps (ET μ Ps) for glass chips in sensorized cell-culture systems. *Biosensors*, **2015**, *5*, 513-536.

S. M. Bühler, M. Stubbe, S. M. Bonk, M. Nissen, K. Titipornpun, E.-D. Klinkenberg, W. Baumann, J. Gimsa. Cell Monitoring and Manipulation Systems (CMMSs) based on Glass Cell-Culture Chips (GC³s). *Micromachines*, **2016**, *7*, 106-130.

Buch-Beitrag

S. Walther, S. Bonk, M. Stubbe, W. Baumann, J. Gimsa. Mikrofluidik, innere Sensorik und Strukturentwurf für ein 3D-Zellkultursystem. In *Knöcherner Geweberegeneration Zellphysiologie im Dreidimensionalen*; Neumann, H.-G.; Klinkenberg, E.-D., Eds.; Shaker: Aachen, **2014**; 73-111.

Tagungsbandbeiträge

T. Weihe, S. Bonk, P. Elter und J. Gimsa. Ein-Zell Kraftspektroskopie zur Bestimmung der initialen Adhäsion von Zellen auf verschiedenen Oberflächen., **BMT**, Warnemünde, 2010

M. Nissen, S.M. Buehler, S.M. Bonk, M. Stubbe, T. Reimer, W. Baumann und J. Gimsa. Sensors for Glass Cell-Culture Chips (GC³). In: Herausgeber A. Stett und G. Zeck Proceedings **MEA Meeting 2012**, Reutlingen, 10-13.07.2012, Seite 290 –291

P. Oldorf, R. Peters, S.M. Bonk und J. Gimsa, Hochpräzise Mikrostrukturierung von Nanoschichten mittels ultrakurzer Laserpulse. **9. Thüringer Grenz- und Oberflächentage**, Zeulenroda, 03.-05.09.2013

S.M. Bonk, P. Oldorf, T. Weihe, M. Stubbe, R. Peters und J. Gimsa. Rapid-Prototyping von Dünnschichtsensoren für Zellkulturchips durch direkte Strukturierung mit einem Ultra-Kurzpulslaser **MST 2013**, 14-16.10.2013 Aachen, ISBN 978-3-8007-3555-6, VDE Verlag GmbH Berlin Offenbach

P. Oldorf, R. Peters, S.M. Bonk und J. Gimsa, Mikrobearbeitung von glasfaserverstärkten, flexiblen und nanobeschichteten Leiterplatten mittels Ultrakurzpulslaser. **7. DVS/GMM-Tagung Elektronische Baugruppen und Leiterplatten**, Fellbach, Feb. 2014, Galvanotechnik, 105. Band, Januar 2014. Leuze Verlag, Bad Saulgau.

S.M. Bonk, P. Oldorf, R. Peters W. Baumann and J. Gimsa. Fast prototyping of multisensory cell culture chips using ultra-short pulse-laser ablation and PCB micromilling, **2nd International Conference on MikroFluidic Handling Systems (MHFS 2014)**, Freiburg, 8-10. Oktober 2014.

Vorträge

S.M. Bonk, A. Kumar, M. Stubbe, T. Kröger, W. Baumann, J. Gimsa. Development of a 3D Cell-Culture System with Sensors for Cell Proliferation, **Bonetec 2010**, Hannover, 7-10.10.2010

S.M. Bonk, W. Baumann and J. Gimsa. Integrated sensors for the monitoring of metabolic parameters in planar and 3D cell culture systems, **Materials Days Rostock 2010**, Rostock, 16.09.2010

Poster

S.M. Bonk and F. Lisdat, Construction and characterization of multilayer assemblies of cytochrom C and gold nanoparticles **Deutsches Biosensorsymposium 2009**, Freiburg, 29.02-01.03.2009

S.M. Bonk, A. Kumar, M. Stubbe, T. Kröger, W. Baumann und J. Gimsa, Development of a 3D Cell-Culture System with Sensors for Cell Proliferation **Bonetec 2010**, Hannover, 7-10.10.2010

T. Weihe, S. Bonk, Y. Chen, P. Elter und J. Gimsa, Single-Cell Force Spectroscopy for the determination of initial adhesion of cells to different surfaces, **Bonetec 2010**, Hannover, 7-10.10.2010

S. M. Bonk, S.M. Bühler, M. Stubbe, W. Baumann und J. Gimsa, Aktuatorik und Sensorik für die Überwachung metabolischer Parameter in 3D Zellkultursystemen **15. Heiligenstädter Kolloquium 2010**, Heilbad Heiligenstadt, 27-29.09.2010

M. Nissen, S.M. Buehler, S.M. Bonk, M. Stubbe, T. Reimer, W. Baumann and J. Gimsa, Sensors for Glass Cell-Culture Chips (GC3), **MEA-Meeting 2012**, Reutlingen, 10-13.07.2012

S. M. Bonk, Paul Oldorf, Marco Stubbe, Werner Baumann, Jan Gimsa. 2013. Rapid-Prototyping von Dünnschichtsensoren für mikroskopierbare Zellkulturchips unter Nutzung eines Ultra-Kurzpulslasers, **Deutsches Biosensorsymposium 2013** Wildau, 10-13.03.2013

S. M. Bonk, P. Oldorf, M. Stubbe, W. Baumann, R. Peters, und J. Gimsa. Rapid prototyping of sensors for microscopable cell-culture chips using an ultra-short pulse laser, **XIV ICEBI 2013**, Heilbad Heiligenstadt, 22-25.04.2013

S. M. Bonk, P. Oldorf, T. Weihe, M. Stubbe, R. Peters und J. Gimsa. Rapid-Prototyping von Dünnschichtsensoren für Zellkulturchips durch direkte Strukturierung mit einem Ultra-Kurzpulslaser, **MST 2013**, Aachen, 14-16.10.2013

S.M. Bonk, P. Oldorf, R. Peters W. Baumann and J. Gimsa. Fast prototyping of multisensory cell culture chips using ultra-short pulse-laser ablation and pcb micromilling, **2nd International Conference on MikroFluidic Handling Systems (MHFS 2014)**, Freiburg, 8-10. Oktober 2014.

Patentanträge

S. Bonk. Planar aufgebaute Peristaltikpumpen für flexible Fluidiksysteme. Eingereicht 15.04.2014, **DE 10 2014 207 249.2**, – angemeldet –

S. Bonk. Planar aufgebaute motorgesteuerte Ventile für flexible Fluidiksysteme. Eingereicht 15.04.2014, **DE 10 2014 207 238.7**, – angemeldet –

A. Galow, S.M. Bonk, P. Wysotzki, R. Modrozynski, W. Baumann. Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenaufbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten. Eingereicht 15.03.2015, **DE 10 2015 220 651.3**, – angemeldet –

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließliche die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

(Sebastian Bonk)

Rostock, 31. August 2016

Lebenslauf



PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Sebastian Marcus Bonk
Anschrift:	Doberaner Str. 147, 18057 Rostock
Geburtsdaten:	01.03.1983, Berlin-Lichtenberg
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

BISHERIGE TÄTIGKEITEN

PROMOTIONSSTUDENT

03.2012 – 02.2015 Promotionsstudent im Graudiertenkolleg „WELISA“ an der Universität Rostock
„Projekt B8/B11: Implementierung von Sensorik und Aktuatorik zur Charakterisierung der Wechselwirkungen von Knochenzellen mit artifiziellen Oberflächen“

PROJEKTMITARBEITER

04.2009-09.2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt „Fluxel“ am Institut für Biophysik, Universität Rostock, *Design, Konstruktion und Fertigung der Mikrofluidik sowie der Sensorchips*

WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER

09.2008-03.2009 Mitarbeiter in der Biosensorik-Arbeitsgruppe der Technischen Hochschule Wildau, Schichtaufbau und Untersuchung von Polyelektrolyt-Multilayern

STUDIUM

MASTER OF SCIENCE

2006-2008 In Biosystemtechnik/Bioinformatik an der Technischen Hochschule Wildau

TITEL DER MASTERARBEIT

„Charakterisierung von Protein-Polyelektrolyt-Multischichten auf Goldoberflächen“

BACHELOR OF SCIENCE

2003-2006 In Biosystemtechnik/Bioinformatik an der Technischen Hochschule Wildau

TITEL DER BACHELORARBEIT

„Ersatz des Radio-Immunoassay zur Bestimmung des Phytoestrogens 8-Prenylnaringenin durch einen Fluoreszenz-Polarisationsassay“

PRAKTIKA

- 09.2007-12.2007 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Technischen Hochschule Wildau,
- Messungen am Biachore T100
 - Synthese und Untersuchungen zum Anlagerungsverhalten von Gold-Nanopartikeln
- 01.2006-02.2006 Celltrend GmbH, Luckenwalde
- IC-50 Bestimmung von Proliferationsassays
 - Analysen von Angiogeneseassays
- 07.2005- 08.2005 Celltrend GmbH, Luckenwalde
- Gewinnung von Endothelzellen aus Nabelschnurblut
 - Albumin-ELISA
- 01.2005- 02.2005 Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam- Rehbrücke
- Suche der Positionen und Orientierungen der 25 Bitter-Geschmacksrezeptoren der hTAS2R Familie
 - Isolierung der Plasmid DNS von Rezeptorproteinen für die Sequenzierung

WEHRDIENST

2002-2003 Ableistung des 9 monatigen Wehrdienstes und Teilnahme am Elbe-Hochwassereinsatz beim 5./Panzerbataillon 413 und der Stabskompanie Der Panzergrenadierbrigade 41

ABITUR

1999-2002 Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe „Paul Dessau“ in Zeuthen.

WEITERE TÄTIGKEITEN

Stipendiatensprecher des Graduiertenkollegs Welisa, Studentenvertreter in der Graduiertenakademie, Teilnahme am Ideen Wettbewerb MV 2011 und 2014 (Gewinner der Sonderpreise Gesundheitswesen und Tourismus mit dem ACID-BASE System bzw. dem MOTIKO)

Rostock den, 22. Mai 2017

Sebastian Bonk