



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Transepitheliale impedanzspektroskopische 4-Punkt-
Messung von Caco-2-Zellen und -Geweben mittels
Chipdevices“

Verfasser

Christian Peter

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 411

Studienrichtung lt. Studienblatt: Physik

Betreuerin / Betreuer: O. Univ. Prof. Dr. Emmerich Bertagnolli

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Einleitung.....	5
1. Theorie.....	7
1.1 Einleitung.....	7
1.2 Elektrische Kenngrößen.....	8
1.2.1 Gleichstromtechnik.....	8
1.2.2 Wechselstromtechnik.....	8
1.2.3 Graphische Darstellung der Impedanz und der Impedanzspektroskopie.....	10
1.3 Stromleitung in Elektrolytlösungen.....	12
1.3.1 Gleichstromionenleitung in Elektrolytlösungen.....	12
1.3.1.1 Kohlrausch-Gesetz und Ostwald'sche Verdünnungsgesetz.....	16
1.3.1.2 Gleichstromleitfähigkeit von Makromolekülen.....	18
1.3.2 Wechselstromleitung in Elektrolytlösungen: Hüpfleitung.....	18
1.4 Frequenzabhängige Leitfähigkeit verschiedener gelöster Ladungsträger.....	20
1.5 Messtechnik.....	23
1.5.1 Elektroden.....	24
1.5.1.1 Inerte Redoxelektroden.....	24
1.5.1.2 Metall/Metallionen-Elektroden.....	24
1.5.2 Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt.....	25
1.5.3 Die Vier-Punkt-Messtechnik.....	29
1.6 Epithelzellen.....	31
1.6.1 Caco-2-Zellen.....	31
1.6.2 Elektrische Eigenschaften von Caco-2-Zellen.....	32
1.6.3 IS an lebenden Caco-2-Zellkulturen in vitro.....	35
1.7 Permeation Enhancer in der IS.....	36
2. Experimenteller Aufbau.....	37
2.1 Struktureller Aufbau des Messsystems.....	37
2.2 Das Messmodul.....	38
2.2.1 Der Elektroden-Chip.....	40
2.2.1.1 Materialien zur Mikrostrukturherstellung.....	41
2.2.1.2 Geräte zur Mikrostrukturherstellung.....	42
2.2.1.3 Prozess zur Mikrostrukturherstellung.....	43
2.2.1.4 Der IDES-Chip.....	48
2.2.2 FlexiPERM (mit Kanalsystem).....	49
2.2.3 Top-Elektroden und Top-Elektroden-Decke.....	49
Top-Elektroden-Decke.....	51
2.2.4 Kontaktierung der Elektroden.....	51
2.2.5 Die Halterung für das Messmodul.....	52
2.3 Schlauchquetschpumpe und RPMI-Reservoir.....	53
2.3.1 RPMI-Nährmedium.....	53
2.4 Der Multiplexer (MUX).....	55
2.5 HIOKI LCR-Meter 3522-50.....	56
2.6 Das LabVIEW-Programm.....	58
2.6.1 Die LabVIEW-Benutzeroberfläche.....	58

3. Methode und Durchführung.....	60
3.1 Status vorangehender Arbeiten.....	60
3.2 Vorbereitungen zur Messung der Gewebeimpedanz.....	61
3.3 Schema der Bioimpedanzmessung.....	65
3.4 Standardparameter einer Bioimpedanzmessung.....	66
3.4.1 Messaufbau im Brutschrank; Einstellen der Nährstoffversorgung.....	66
3.4.2 Methode der elektrischen Messung und Überblick über deren Parameter.....	66
3.5 Darstellung relativer Bioimpedanzspektra.....	67
3.6 Feststellung der Zelladhäsion und der Zellbedeckung	68
3.7 Einsatz von Permeation Enhancer (PE).....	68
4. Ergebnisse.....	71
4.1 Charakterisierung des Messsystems.....	71
4.1.1 Funktionstüchtigkeit des LCR-Meters.....	71
4.1.2 Funktionsprüfung des MUX.....	73
4.1.3 Funktionsprüfung des Messmoduls	75
4.1.4 Impedanzspektroskopische Untersuchung verschiedener Flüssigmedien.....	78
4.1.4.1 Stabilität der Elektroden und Auflösungsvermögen.....	81
4.2 Messungen an Zellkulturen - Bioimpedanzmessungen.....	83
4.2.1 Ein Überblick.....	83
4.3 Messungen an Zellkulturen: Einzelergebnisse.....	85
4.3.1 Pilotmessungen und Änderungen am bisherigen Aufbau.....	85
4.3.1.1 Erste und Zweite Pilot-Bioimpedanzmessung	85
4.3.1.2 Zelladhaesion und Zellbedeckung.....	86
4.3.2 Bioimpedanzmessung mit dem ringförmigen-Platin-Elektroden-Chip.....	87
4.3.2.1 Ergebnisübersicht der 3. Bioimpedanzmessung	101
4.3.3 Bioimpedanzmessungen mit dem IDES-Chip.....	102
4.3.3.1 Vierte Bioimpedanzmessung.....	102
4.3.3.2 Fünfte Bioimpedanzmessung.....	109
4.3.3.3 Ergebnisübersicht der 4. und 5. Bioimpedanzmessung.....	118
4.3.3.4 Sechste Bioimpedanzmessung: Einsatz von Permeation Enhancer (PE).....	123
4.3.3.5 Ergebnisse der 6. Bioimpedanzmessung; Auswertung des PE-Versuchs.....	124
5. Diskussion und Ausblick.....	130
6. Anhang.....	133
Danksagung.....	143
Lebenslauf.....	144

Zusammenfassung

Pharmazeutische Wirkstoffe werden häufig oral eingenommen und über die Darmwand weiter in den Körper verteilt. Die Darmwand stellt somit eine entscheidende Barriere dar, die eine Arznei überwinden muss, um gezielt wirken zu können. Caco-2-Zellen haben sich in der pharmazeutischen Technik als *in vitro* Ersatz für *in vivo* Transportstudien, von über die Darmwand resorbierten Arzneien, bewährt. Dabei wird der Transport der Arznei durch (trans-epithelial) ein konfluentes Caco-2-Zellgewebe beobachtet. Ein konfluentes Caco-2-Gewebe ist dadurch charakterisiert, dass eine lückenlose Barriere zwischen den Gewebeseiten entsteht. Die Impedanzspektroskopie (IS) ist eine elektrische Messmethode, die sich als zielführend erwiesen hat, um die Konfluenz eines Caco-2-Zellgewebes zu prüfen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im ersten Teil mit der Herstellung und Charakterisierung eines Mikroelektrodensystems für transepitheliale impedanzspektroskopische (IS) *in vitro* Untersuchungen an Caco-2-Zellgeweben mit 4-Punkt-Elektrodenmesstechnik. Im zweiten Teil werden Caco-2-Zellen in mit Elektroden ausgestatteten Zellkulturkammern kultiviert und während deren Vermehrung zu einem konfluenten Zellschicht kontinuierlich transepitheliale IS-Messungen durchgeführt.

Bei der Messung stehen zwei Mikroelektroden einer Chipoberfläche einem oberhalb über den Chipelektroden befindlichen Elektrodenpaar gegenüber. Das gesamte Messsystem stellt 8 solche Elektrodenanordnungen bereit, die jeweils eine Zellkulturkammer mit elektrischen Sensoren ausstatten und eine jeweils voneinander unabhängige Messumgebung bilden. Der Messablauf wird durch eine LabVIEW-Programmierung, einen Multiplexer (MUX) und ein Fluidik-System soweit automatisiert, sodass IS-Messungen (1Hz-100kHz) an biologischen Zellen bzw. Geweben kontinuierlich (jede h oder alle 2h) über mehrere Tage (7-24) ohne menschliches Eingreifen durchgeführt werden können.

Zu Beginn werden vereinzelte Caco-2-Zellen in einer elektrolytischen RPMI-Nährlösungssuspension in die Zellkulturkammern ausgesät. Im Zuge der Vermehrung der Zellen überwachen sie zunehmend die Chipelektroden. Die zunehmende Konfluenz des Caco-2-Zellmonolayers auf den Chipelektroden erhöht - so die dem Experiment zugrundeliegende Hypothese - die transepitheliale Impedanz bei charakteristischen Frequenzen. Neben der elektrischen Messung wird mit Hilfe von mikroskopischer Aufnahmen auf die Konfluenz des Caco-2-Zellmonolayers geschlossen. Der Vergleich des elektrischen mit dem optischen Ergebnis, zeigt eine Korrelation zwischen Zellbedeckung der Elektroden in Form eines Anstiegs der transepithelialen Impedanz. Abschließend wurden chemische Substanzen, sogenannte Permeation Enhancer (PE), eingesetzt um den parazellulären Ionenstrom durch Caco-2-Zellgewebe zu beeinflussen. Dieses letzte Experiment brachte die Gewissheit, dass der Anstieg, der im transepithelialen Impedanzspektrum zu beobachten ist, ausschließlich auf die Zellbedeckung der Elektroden zurückgeführt werden kann. All diese Untersuchungen stellen eine Grundlage für die weiterführende Beschreibung von Transportmechanismen durch die Darmwand durch ein elektrisches Modell dar.

Einleitung

Das Interesse am pharmazeutischen Wirkstofftransport im menschlichen Körper ist verständlicherweise groß. Ein Wirkstoff muss nicht nur effektiv sein, sondern auch an die passenden Orte gelangen um gezielt wirken zu können. Viele Medikamente werden oral eingenommen und gelangen über den Darm in den Körper. Die Darmwand stellt somit eine entscheidende Barriere dar, die erst von einem Medikament überwunden werden muss. Caco-2 Zellen haben sich über die letzten Jahre als geeignetes in vitro-Modell für oral eingenommene und über den Darm resorbierte Medikamente erwiesen. Sie zählen zu den Epithelzellen und bilden, als eine Besonderheit, nur eine Zellschicht (Monolayer) aus.

Seit Luigi Galvanis elektrischen Experimenten an Froschschenkeln und der 1781 erschienenen „Abhandlung über die Kräfte der Elektrizität bei der Muskelbewegung“ studiert eine breite Wissenschaftswelt die elektrischen Eigenschaften von biologischen Geweben. In der Medizintechnik sind das EKG oder das EEG bereits gängige elektrische Messmethoden in der Diagnostik. In pharmazeutische Forschungseinrichtungen hat auch die für Caco-2-Zellgewebe zuverlässige, einfach zu handhabende, schnell durchführbare und kostengünstige TEER (transepithelial electrical resistance)-Messung als eine elektrische Messmethode Einzug gefunden. Die Arbeiten von M.Hufnagel [1] und M.Fischender [2] zeigen das der TEER-Wert nicht nur bei 12,5Hz sondern für ein ganzes Spektrum an Frequenzen auftritt.

Äquivalentschaltbilder einer Zelle oder eines Zellgewebes (layers) beschreiben die spezifischen elektrischen Eigenschaften von Zellen schematisch. Sie sind wie ein elektrischer Schaltkreis aus klassischen (passiven) elektrischen Bauteilen, wie Kondensatoren und elektrischen Widerständen (usw.) zusammengesetzt und simulieren das elektrische Verhalten von Zellen im veränderlichen elektrischen Feld. Die Impedanzspektroskopie ist eine elektrische Messmethode, die dem Äquivalentschaltbild eine mächtige experimentelle Methode zur elektrischen Charakterisierung elektrischer Ladungsflüsse zur Seite stellt. Die Impedanzspektroskopie (IS) ist die Messung des elektrischen Wechselstromwiderstandes (Impedanz) über ein Frequenzband.

Einer Forschungsgruppe, die Epithelialgewebe in „Ussing“-Kammern einspannte, und dieses mit zwei-Weg-Impedanzspektroskopie und mit Hilfe von Äquivalentschaltbildern untersuchte, gelang bereits die Unterscheidung verschiedener Transportwege bestimmter Substanzen durch die Zellmembran [3]. Dabei werden sogenannte Permeation Enhancer (PE) eingesetzt: PE sind chemische Substanzen die spezifische Ionenkanäle öffnen und so dem Ionenstrom ein Passieren des Zellgewebes erleichtern.

Das Ziel dieser Arbeit ist das Aufwachsen von Caco-2-Zellen auf ein Mikrochip-Bauteil, um transepitheliale Impedanzmessungen in einem Frequenzbereich von 1Hz-100kHz durchführen zu können. Die dem Experiment zugrundeliegende Hypothese ist, dass mit dem Ladungstransport durch (trans-) das Caco-2-Zellgewebe

(-epithelial) auch gleichzeitig der Wirkstofftransport durch eine entscheidende Barriere, die Darmwand,

studiert werden kann.

Erst soll das Messsystem gebaut und charakterisiert werden. Die Mikrostrukturierung, bei der verschieden strukturierte Mikroelektroden aus Gold oder Platin erzeugt werden, findet im Reinraum statt. Den Chipelektroden (Bottom-Elektroden) wird eine 2-polige Edelmetallelektrode (Top-Elektroden) gegenüber gestellt, sodass die transepitheliale Impedanz in 4-Punkt-Messtechnik festgestellt werden kann. Durch Anwendung der 4-Punkt-Messmethode können Impedanzen bis zu tiefen Frequenzen von 200Hz gemessen werden [2]. Dazu müssen vier unabhängig ansprechbare Elektroden (zwei Top- und zwei Bottom-Elektroden) in jeder Zellkulturkammer vorliegen. Zu Anfang einer für diese Arbeit typischen Messung, einer sogenannten Bioimpedanzmessung, werden vereinzelt, in einem RPMI-Nährmedium gelöste, Caco-2-Zellen in die Zellkulturkammern ausgesät. Die Caco-2-Zellen vermehren sich und bilden dabei ein zunehmend konfluenter werdendes Gewebe über den Chipelektroden. Die Caco-2-Zellen haften adhäsiv auf der Chipoberfläche, die von einem Glassubstrat und 200nm dicken metallischen Elektroden gebildet wird. Die dem Experiment zugrunde liegende Hypothese ist, dass mit zunehmender Gewebeverdichtung eine für Ionen nur bedingt durchlässige Barriere zwischen den Gewebeseiten entsteht und dass dies elektrisch gemessen werden kann.

Die Bioimpedanzmessung besteht aus kontinuierlichen Messreihen, die ohne menschliches Zutun, völlig automatisiert, über Tage aufgenommen werden. Über ein Kanalsystem und eine Pumpe werden die heranwachsenden Caco-2-Zellkulturen durch einen steten Nährstoffstrom versorgt und Stoffwechselabfallprodukte abgeführt. Eine Programmierung in LabVIEW automatisiert das Messsystem und koordiniert die Tätigkeiten eines LCR-Meters und einer Relaisstation (Multiplexer (MUX)). Das LCR-Meter ist Signalgenerator und Signalmessgerät der impedanzspektroskopischen Messung. Die Relaisstation (MUX) fungiert als Verteiler und verbindet die Signal- und Messpole des LCR-Meter rechtzeitig mit den Elektroden die in 8 messtechnisch unabhängigen Zellkulturkammern untergebracht sind.

Der Frequenzbereich der signifikanten Änderungen der transepithelialen Impedanz wird zwischen 10Hz und 5kHz vermutet ([1]und[2]). Es soll gezeigt werden, dass die Zunahme der Bedeckung der Chipoberfläche mit Zellgewebe eindeutig mit Änderungen im transepithelialen Impedanzspektrum korrelieren. Der Zellbedeckungsgrad bzw. die Konfluenz der Caco-2-Gewebeschicht, wird mit verschiedenen mikroskopischen Methoden festgestellt.

Abschließend werden chemischen Substanzen, sogenannte Permeation Enhancern, eingesetzt, um zu zeigen, dass

1. das Impedanzmessergebnis ausschließlich auf die elektrischen Eigenschaften des Caco-2-Zellgewebes zurückgeführt werden kann.
2. der die Einzelzellgrenzen passierende, parazelluläre, Ionenstrom mit Zunahme der Konfluenz der Zellschicht zunehmend versiegt und so den größten Anteil des Anstiegs der transepithelialen Impedanz hin zu einer konfluenten Zellschicht verursacht.

1. Theorie

1.1 Einleitung

In diesem Kapitel werden zunächst einige Begriffe und Grundlagen der elektrischen Messtechnik, der Elektrochemie, der Biologie und Pharmakologie vorgestellt. Sie sind Basis für das Verständnis der impedanzspektroskopischen Messung an auf Mikrochips adhaesiv haftenden Caco-2-Zellen bzw. Caco-2-Zellgeweben.

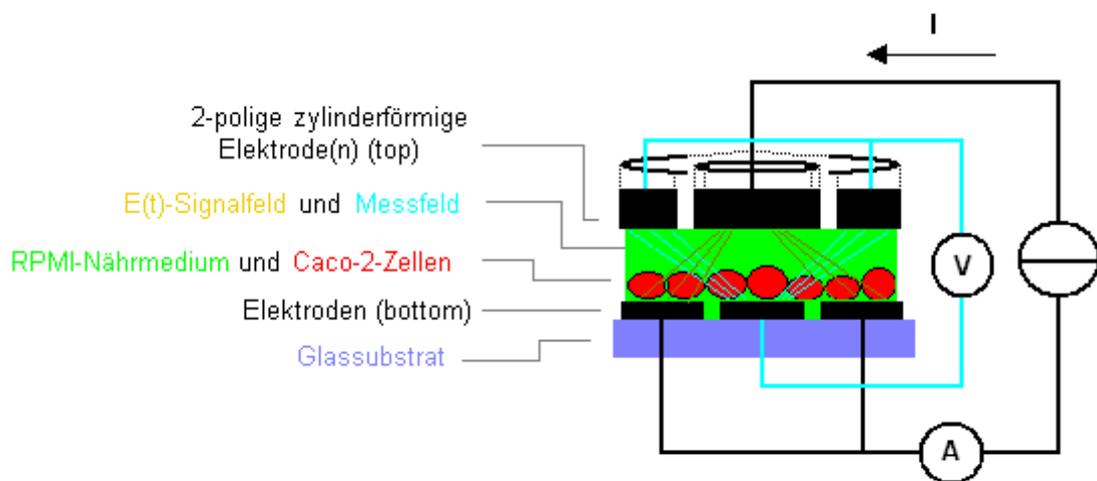


Abbildung 1: Schema des Messaufbaus; Transepitheliale impedanzspektroskopische 4-Punkt-Messung

In Abbildung 1 ist das in dieser Arbeit verwendete Messprinzip schematisch dargestellt. Gezeigt wird Caco-2-Zellgewebe, welches auf der einen (basolateralen) Gewebeseite auf einer von Glassubstrat und Elektroden gebildeten Chipoberfläche aufgewachsen ist und auf der anderen (apikalen) Gewebeseite von einer elektrolytischen Nährlösung bedeckt wird. Die Messung erfolgt zwischen Top- und Bottom-Elektroden und durch Anwenden der 4-Punkt-Messmethode. Dabei wird der Strom an Stromelektroden in das in das RPMI-Medium bzw. direkt in das Zellgewebe eingepreßt und die Spannung stromfrei gemessen. Diese Bioimpedanzspektroskopische Messung erfolgt in einem Frequenzbereich von 1Hz-100kHz und bei niedrigen Spannungen $\geq 100\text{mV}$.

1.2 Elektrische Kenngrößen

Das Experiment verwendet die Impedanzspektroskopie als elektrisches Messwerkzeug zur Untersuchung elektrischer Eigenschaften von biologischem Gewebe. Die Definition, das Messen von Impedanzen und deren Darstellung in aussagekräftigen Diagrammen ist Thema dieses Kapitels.

1.2.1 Gleichstromtechnik

Ausgangspunkt jeder theoretischen Beschreibung ist immer das einfachste der Messung zugrunde liegende theoretische Modell. In unserem Fall, der Impedanzspektroskopie, ist dies das Ohmsche Gesetz für elektrische Gleichströme, welche in Gleichung 1 dargestellt ist. Es beschreibt einen linearen Zusammenhang zwischen Strom I [A], Spannung U [V] und Widerstand R [Ω].

$$U = IR$$

Gl. 1: Ohmsches Gesetz

1.2.2 Wechselstromtechnik

Die Impedanz ist in der Impedanzspektroskopie an biologischem Gewebe der entscheidende Messwert. Die Impedanz ist der elektrische Widerstand der Wechselströmen entgegenwirkt.

Erweitert man das Ohmsche Gesetz (Gl.1) auf Wechselströme (Gl.2), geschieht dies durch Einbringen der Zeit t in das Argument von Strom $i(t)$ und Spannung $u(t)$. Bei zeitlich veränderlichen Potentialen und Ladungsflüssen wird der Phasenwinkel φ zwischen Spannung und Strom zu einer entscheidenden Größe. Der hier dem Stromfluss entgegenwirkende Widerstand wird durch die Phasenwinkelabhängigkeit zu einer mathematisch komplexen Größe, die Impedanz Z genannt wird.

Gl.2 verwendet die mathematische Darstellung zeitabhängiger Strom $i(t)$ - und Spannungswerte $u(t)$ über Strom- \hat{i} und Spannungsscheitelwerte \hat{u} , deren zeitliche Schwankung sich durch die Multiplikation mit Kosinusfunktionen ergibt. Das Argument der trigonometrischen Funktion, die sogenannte Phase, bestimmt das dynamische Verhalten.

$$u(t) = \hat{u} \times \cos(\omega t + \varphi_u)$$

$$i(t) = \hat{i} \times \cos(\omega t + \varphi_i)$$

Gl. 2: Darstellung für zeitlich veränderliche(n)
elektrische Spannung und Strom

Im Fall periodischer Signale genügt, wie in Gleichung 3 ersichtlich, die Angabe der Phasenverschiebung zur Beschreibung des effektiven Schwingungszustandes.

$$\varphi = \varphi_u - \varphi_i$$

Gl. 3: Phasenverschiebung

Die Darstellung des nicht stationären elektrischen Verhaltens eines elektrischen (und auch das eines elektrochemischen, siehe später) Systems kann durch ein Netzwerk von einfachen Schaltelementen (R...Widerstand, C..Kondensator, L..Induktivität, W..Warburgimpedanz, CPE..constant-phase-element; für elektrochemische Systeme) erfolgen. Diese Elemente können dann einzelnen elementaren elektrischen und elektrochemischen Prozessen und/oder Bauteilen zugeordnet werden. Die Zeitabhängigkeit elektrischer Systeme wird allgemeiner durch Differentialgleichungen (Gl.4, 5, 6 und 7) beschrieben.

$$u_R(t) = R \times i(t)$$

Gl. 4: zeitabhängiges Ohmsches Gesetz

$$u_C(t) = \int \frac{i(t)}{C} dt$$

Gl. 5: Definition der Kapazität

$$u_L(t) = L \times \frac{di(t)}{dt}$$

Gl. 6: Definition der Induktivität

$$\frac{\partial \Delta c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \Delta c}{\partial x^2}$$

Gl. 7: Diffusionsgleichung

Die Lösungen der Differentialgleichungen (Gl.8) sind im Allgemeinen komplexe Funktionen, da sich entlang der infinitesimalen zeitlichen Änderungen in den obigen Gleichungen der Phasenwinkel φ zwischen Strom und Spannung ändern kann. Der Absolutbetrag (Gl.9) dieser komplexen elektrischen Größen ist der dem Messwert äquivalente Wert.

$$i(t) = \hat{i} \times e^{j\omega t}$$

$$u(t) = \hat{u} \times e^{j(\omega t + \varphi)}$$

Gl. 8: Lösungen zeitabhängiger Dgl.
für Strom und Spannung

$$|z| = \sqrt{z \times \bar{z}} = \sqrt{(x + jy) \times (x - jy)} = \sqrt{x^2 + y^2}$$

Gl. 9: Definition des komplexen Absolutbetrags

Dabei gilt: $j^2 = -1$.

Die Eulergleichung zeigt den trigonometrischen Charakter der Lösungsfunktionen und bettet die Wechselstromrechnung unter Anderem in die Mathematik der komplexen Zahlen ein.

$$e^{j\varphi} = \cos(\varphi) + j \sin(\varphi)$$

Gl. 10: Eulergleichung

Der elektrische Widerstand in einem zeitlich veränderlichen elektrischen System, nennt man Impedanz $\underline{Z}(\omega)$. Die Impedanz (Gl.11) ist eine mathematisch komplexe Größe. Der Absolutbetrag der Impedanz $|\underline{Z}(\omega)| = Z$ wird als Scheinwiderstand, der Realteil R als Wirkwiderstand (ohmscher) und der Imaginär X als Blindwiderstand bezeichnet.

$$\underline{Z}(\omega) = \frac{u(t)}{i(t)} = Ze^{j\varphi} = R + jX$$

Gl. 11: Darstellungsformen der Impedanz

$$|\underline{Z}(\omega)| = \sqrt{R^2 + X^2}$$

Gl. 12: Absolutbetrag der Impedanz

1.2.3 Graphische Darstellung der Impedanz und der Impedanzspektroskopie

In dieser Arbeit wird die Impedanz von Zellschichten in einem Frequenzspektrum von 1Hz-100kHz gemessen. Um die Ergebnisse dieser Messungen graphisch darzustellen, werden im Folgenden Diagramme behandelt, die zur Darstellung von Impedanzen und Impedanzspektren in der Elektrotechnik verwendet werden. Sie stellen für die im Ergebniskapitel dargestellten und in Kapitel 3.5 genauer definierten Darstellungsformen die Verständnisgrundlage.

Graphische Darstellung der Impedanz: Das Zeigerdiagramm: Komplexe mathematische Größen können in der komplexen Ebene aufgetragen werden. Trägt man Schein- (Z), Wirk- (R), und Blindwiderstand (X) in der komplexen Ebene auf, nennt man das sich ergebende Diagramm, Zeigerdiagramm (Abb.2).

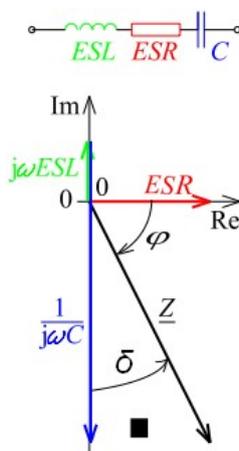


Abbildung 2: Zeigerdiagramm [4]

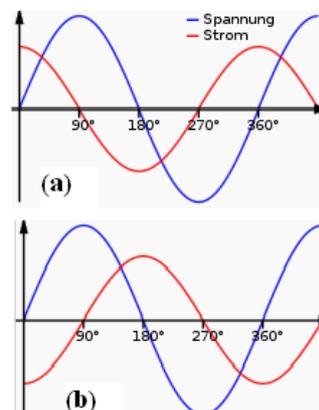


Abbildung 3: typischer Schwingungszustand bei elektrischen Bauteilen ((a)Kapazität, (b) Spule) [5]

Der Realteil ESR (rote Linie in Abb.2; nach [4]) im Zeigerdiagramm gibt den ohmschen, und der Imaginärteil $j\omega ESL$ bzw. $-1/j\omega C$ (blaue bzw. grüne Linie in Abb.2) gibt den frequenzabhängigen Anteil der Impedanz wieder. Im dargestellten Diagramm (Abb.2) setzt sich die Impedanz des Bauteils also aus einer kleinen induktiven Verschiebung, einer großen kapazitiven Verschiebung, die sich zum Teil mit der induktiven ausgleicht und dem ohmschen (frequenzinvarianten) Widerstand über Vektoraddition zusammen. In Abb.3 (nach [5]) ist dem Strom-Spannungs-Zeitverlauf abzulesen, dass bei kapazitiver (a) Phasenverschiebung der Strom der Spannung um 90° voraus eilt und bei induktiver (b) eilt umgekehrt die Spannung dem Strom um 90° voraus. Dargestellt werden die Messwerte einer Impedanzmessung bei

veränderlicher Frequenz eines elektrischen Schaltkreises aus ohmschen, kapazitiven und induktiven Anteilen üblicherweise als Bode -Diagramm oder als Nyquist plot.

Graphische Darstellung der Impedanzspektroskopie: Bode-Diagramm und Nyquist plot: Die Impedanzspektroskopie (IS) ist die Messung der Impedanz über ein ganzes Frequenzband. Die Impedanzmesswerte werden üblicherweise in Bode Diagramme und Nyquist Plots eingetragen.

Beim **Bode Diagramm** werden der logarithmierte Betrag der Impedanz $|Z|=Z$ und die Phasenverschiebung φ gegen die logarithmierte Frequenz f aufgetragen. Aufgrund von Gleichung 11 beinhaltet diese Darstellungsform die gesamte Information der Impedanz, bei veränderlicher Frequenz. Als alternative

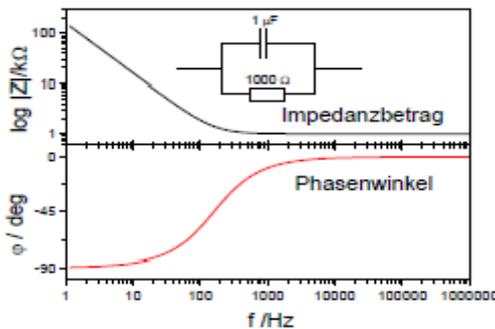


Abbildung 4: Bode Diagramm; dargestellt wird ein elektrischer RC-Hochpass [6] ;

$$|\underline{Z}(\omega)| = \sqrt{R^2 - \left(\frac{1}{\omega C}\right)^2}$$

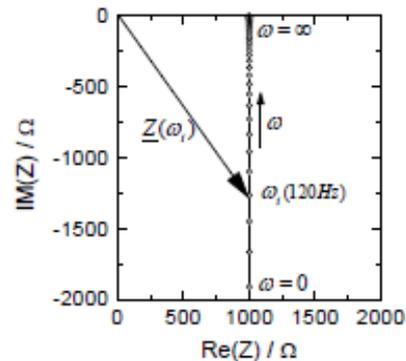


Abbildung 5: Nyquist Plot[6]

Darstellungsart zum Bode-Diagramm bietet sich zum bessern Verständnis der impedanzspektroskopischen Messwerte der Nyquist Plot an. Beim **Nyquist Plot** werden Real und Imaginärteil der Impedanz wie beim Zeigerdiagramm dargestellt. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einem Messwert bei bestimmter Frequenz. Bode-Diagramm und Nyquist Plot werden oft gegenübergestellt, um die Interpretation der Messergebnisse zu erleichtern. Grundsätzlich sind die beiden Darstellungsformen in ihrer Aussage jedoch völlig äquivalent.

1.3 Stromleitung in Elektrolytlösungen

Die Messungen an Zellkulturen finden in einer elektrolytischen Nährlösung, dem RPMI-Medium statt. Die Impedanz wird an metallischen Elektroden festgestellt, die in direktem Kontakt mit dem RPMI-Nährmedium stehen. Die im RPMI-Medium gelösten Ionen tragen den Mess- und Signalstrom zwischen den Elektroden. Deshalb ist die impedanzspektroskopische Messung des biologischen Zellgewebes entscheidend von den elektrischen Leiteigenschaften des RPMI- Nährmediums abhängig.

Die bisher genannten Gesetze wurden für Elektronenleitung (Kap.1-3) angesetzt. Bei elektrischem Stromfluss in einem Elektrolyt bewegen sich jedoch Ionen als „freie“ (besser: bewegliche) Ladungsträger entlang elektrischer Feldlinien. Elektrolyte (lat. Electrum = Bernstein (vgl. Elektrostatik), griech. Lytos = gelöst) sind im Allgemeinen Stoffe, bei denen in einem Lösungsmittel gelöste Salze wenigstens teilweise als dissoziierte Ionen vorliegen.

Der Übergang vom einfach messbaren Elektronenstrom zum Ionenstrom im Elektrolyten geschieht üblicherweise und so auch in dieser Arbeit über Metallelektroden, die in direktem Kontakt mit einem wässrigen Elektrolyten stehen. An der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt, wo Ladungen ausgetauscht werden, treten störende Grenzflächeneffekte (Polarisationen) auf, die eine genaue Messung der Leitfähigkeit nur unter bestimmten Rahmenbedingungen erlauben. So ist eine Gleichstromelektrolytleitfähigkeit grundsätzlich nur aus einer Wechselstrommessung zu extrapolieren. Die Leitfähigkeit σ eines Elektrolyts (Gl.13) ist mit dem Leitwert G über eine multiplikative Konstante, die sog. Zellkonstante K , verknüpft. Die Zellkonstante K berechnet sich aus dem Quotienten des Abstandes l der Elektroden und deren Fläche A , und wird im Allgemeinen aus den Messwerten von Elektrolytleitmessungen extrapoliert. Der Kehrwert des Leitwerts G ist die Impedanz Z (Gl.14)

$$\sigma = G \frac{l}{A} = G \times K$$

Gl. 13: Definition der Leitfähigkeit

$$Z = \frac{1}{G} = \frac{U}{I}$$

Gl. 14: Definition des Leitwerts

1.3.1 Gleichstromionenleitung in Elektrolytlösungen

In Elektrolytlösungen sind die elektrischen Ladungsträger die beweglichen dissoziierten Ionen. Bei Vorliegen eines Potentialunterschieds zwischen zwei Elektroden der Fläche A die in einem Abstand l in die Elektrolytlösung tauchen, wandern die Ionen gemäß ihrer Ladung in die bevorzugte Richtung. Die Reibungskraft, die der Bewegungsrichtung der Ionen dabei entgegen wirkt, ist proportional zu deren Geschwindigkeit. Über die Viskosität (Zähigkeit) des Mediums gelangt man zur Definition einer Beweglichkeit. Die Ionen werden solange beschleunigt, bis elektrostatische Anziehung und entgegengerichtete Reibungskraft sich zu 0 ausgleichen.

Für unendlich verdünnte Lösungen gilt:

$$\vec{K}_R = 6\pi\eta r\vec{v}$$

Gl. 15: Stokes'sche Reibungskraft

$$\vec{v} = \frac{e_0 \times z}{6\pi r} \times \vec{E} = u \times \vec{E} \rightarrow u\eta = \frac{e_0 \times z}{6\pi r}$$

Gl. 16: Walden'sche Regel

$$\vec{K} = z \times e_0 \times \vec{E}$$

Gl. 17: Definition der elektrostatischen Kraft

z...Wertigkeit des Ions
 η...Zähigkeit des umgebenden Mediums
 r...Ionenradius (inklusive Solvathülle)
 v...Geschwindigkeit

Setzt man die Kräfte in den obigen Gleichungen (Gl.15 und 17) gleich, ergibt sich die Walden'sche Regel (Gl. 16). Die Walden'sche Regel besagt, dass das Produkt von Beweglichkeit u mal Zähigkeit η eine Konstante ist. Die Zähigkeit nimmt mit steigender Temperatur ab und somit die Beweglichkeit der Ionen, und im gleichen Zug die elektrische Leitfähigkeit, zu. Die Temperaturabhängigkeit ist somit gerade umgekehrt wie in einem metallischen Elektronenleiter. Die Temperatur bleibt in dieser Arbeit, durch die Durchführung der Bioimpedanzmessung im Brutschrank, geregelt konstant, sodass der Einfluss der Temperatur auf die Impedanzmessung vernachlässigt werden kann.

In Elektrolytlösungen hängt die Leitfähigkeit, abgesehen von der Beweglichkeit,

1. von der Ladungsträgerdichte, also der Konzentration dissoziierter Ionen in Lösung und
2. von der Wertigkeit des Ions ab.

Der Beitrag von einem Mol (Na⁺) Ionen zur Gesamtleitfähigkeit ist $\sigma^* = u z F$ (= Beweglichkeit mal Wertigkeit mal Faradaykonstante). σ^* ist die molare Leitfähigkeit einer Ionenspezies. Sie ist für jede Ionenart in wässriger Lösung charakteristisch. Sie nimmt mit zunehmender Elektrolytkonzentration ab (vgl. Abb.10).

Ein Elektrolyt besteht aus Anionen und Kathionen, deren Leitfähigkeitsbeiträge sich addieren

$$\sigma_m = \sigma_A^* + \sigma_K^*$$

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{c}$$

Gl. 18: Beziehung zwischen molarer Leitfähigkeit und spezifischer Leitfähigkeit

Spezifische σ und molare Leitfähigkeit σ_m eines Elektrolyten sind über die jeweilige Ionenkonzentration im Elektrolyt wie in Gleichung 18 miteinander verknüpft. In der Literatur häufig genannt ist die

Äquivalentleitfähigkeit σ_{eq} . Sie bezieht sich zusätzlich zur molaren Leitfähigkeit σ_m noch auf den Leitfähigkeitsbeitrag der Einzelladung. So ergibt sich die Äquivalentleitfähigkeit σ_{eq} durch Division der molaren Leitfähigkeit σ_m durch die Wertigkeit z . Die Wertigkeit gibt die Zahl der pro Ion freigesetzten positiven und negativen Ladungen an.

$$\sigma_{eq} = \frac{\sigma_m}{z}$$

Gl. 19: Äquivalentleitfähigkeit

Gleichung 19 gilt streng nur für Lösungen, bei denen nur eine Ionensorte am Leitungsmechanismus beteiligt ist. Die Äquivalentleitfähigkeit einer unendlich verdünnten Lösung ($c \rightarrow 0$), wo die zwischenmolekularen Wechselwirkungen der sich in Lösung befindlichen Ionen, aufgrund der starken Verdünnung vernachlässigbar klein sind, wird molare Grenzleitfähigkeit σ_{∞} genannt. Sie entspricht dem Limes der molaren Leitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung. Dieser Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht experimentell einer Konzentration bei $c=0$ und ist für jede Ionensorte eine charakteristische Konstante. Die molare Grenzleitfähigkeit gilt streng nur für im Lösungsmittel vollständig dissozierende Ionen, wie Cl^- , SO_4^{2-} , Na^+ .

Kation	σ_{eq}^+ ($\text{S} \cdot \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)	Beweglichkeit $u / 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	Anion	σ_{eq}^- ($\text{S} \cdot \text{cm}^2 \text{mol}$)	Beweglichkeit $u / 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
H^+	349,8	3,6	OH^-	198,6	2
Li^+	38,7	0,4	F^-	55,4	k.A.
Na^+	50,1	0,52	Cl^-	76,8	0,79
K^+	73,5	0,76	Br^-	78,1	k.A.
Rb^+	77,8	0,8	I^-	76,8	k.A.
Ag^+	61,9	keine Angabe.	NO_3^-	71,5	0,74

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Beweglichkeit und der molaren Grenzleitfähigkeiten verschiedener Ionenspezies: Molare Grenzleitfähigkeiten von Ionen bei 298 K in destilliertem Wasser [7]

Vergleicht man die Äquivalentleitfähigkeit bzw. Beweglichkeit verschiedener, gleich stark geladener Ionen so fällt ins Auge, dass

- mit dem Radius, des (unhydratisierten (siehe Abb. 6 nach [8])) Kathions, die Beweglichkeit zunimmt. Das erklärt sich aus der unterschiedlichen Hydratation verschiedener Ionen, sodass kleinere Ionen aufgrund höherer lokaler elektrischer Feldstärke mehr H_2O -Dipole an ihrer Oberfläche anlagern, und dadurch der effektive Radius größer wird.



Abbildung 6: Hydratation des Na⁺ Ions [8].

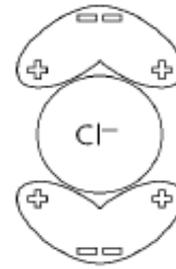


Abbildung 7: Hydratation des Cl⁻ Anions [8].

- die Angaben aus der Literatur zur Größe der Hydrathülle (Abb.6 und 7) unterschiedlich (vgl. Abb.8) sind. Das hängt hauptsächlich mit uneinheitlicher Definition und/oder mit der jeweils verwendeten Messmethode zusammen. So kann wahlweise die innere Hydrathülle als Anzahl der Wassermoleküle definiert werden, die ihre eigene Translationsfreiheit aufgegeben und mit den Ionen zusammen durch die Lösung wandern, oder als diejenige Hülle, deren Dipole sich entsprechend der Ladung des Ions ausgerichtet haben. Bei Angaben entsprechend ersterer Definition ist die Hydrathülle kleiner.[9]

Ion	r [nm]	V [10^{-3} nm ³]	q/V [10^{-17} C nm ⁻³]	N aus [5]	[8]	[6]
Li ⁺	0,06	0,9	17,8	5±1	5	14
Na ⁺	0,095	3,5	4,6	5±1	5	8,4
K ⁺	0,133	9,8	1,6	4±1	4	5,4
F ⁻	0,136	10,5	1,5	4±1		
Cl ⁻	0,181	24,8	0,65	1±1	1	<1
Br ⁻	0,195	31,0	0,52	1±1	1	<1
J ⁻	0,216	42,0	0,38	1±1	1	<1

Abbildung 8: Literaturangaben zur Größe der Hydrathülle: Radius r , Volumen V , Ladungsdichte q/V und Anzahl N der Wassermoleküle einer primären, inneren Hydrathülle aus verschiedener Literaturangaben ([5], [8],[6]; das sind keine Literaturangaben dieser Arbeit) zusammen gestellt. [9]

- die Beweglichkeit der Protonen (H⁺) bzw. der Hydroxidionen (OH⁻) etwa um den Faktor 5-10 größer ist, als die aller anderen Ionen. Dies ist auf einen besonderen Leitungsmechanismus in Verbindung mit Wasser als Lösungsmittel zurückzuführen.

Die Ladung des Protons bzw. des Hydroxidions wandert in Feldrichtung über einen Sprungmechanismus längs der Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermolekülketten, sodass im Gegensatz zum Leitungsmechanismus anderer Ionen kein Transport eines bestimmten Protons erfolgt. Die Extraleitfähigkeit des Protons ist eng an die Struktur zwischen H₃O⁺ -Ion und Wassermolekülen gebunden (vgl. Abb.9). In nicht-wässrigen Lösungsmitteln haben Protonen ähnliche Beweglichkeiten wie andere Ionen.

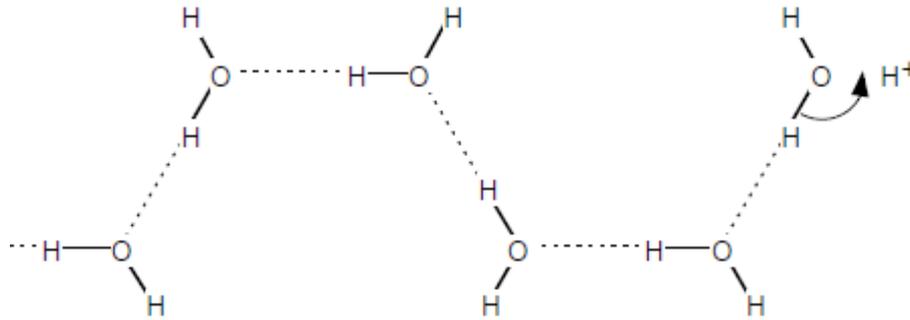


Abbildung 9: schematische Darstellung des Sprungmechanismus der H⁺-Ionen längs der Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermolekülketten [8].

1.3.1.1 Kohlrausch-Gesetz und Ostwald'sche Verdünnungsgesetz

Der in Kapitel 2 beschriebene Messaufbau wird anhand von Leitfähigkeitsmessungen einfacher Elektrolytlösungen charakterisiert. Wie bereits erwähnt bleibt die Temperatur während der Messung geregelt konstant und die Ionenspezies sowie deren Wertigkeit bleiben unverändert. In dieser Arbeit findet die Messung der Impedanz an metallischen Elektroden, die in die elektrolytische RPMI-Nährmedium tauchen, statt. Das RPMI-Medium ist aus verschiedenen Ionen zusammengesetzt (Kap.2.3.1), deren Beiträge zur Gleichstromleitfähigkeit sich einzeln im Kohlrauschgesetz und im Ostwald'schen Verdünnungsgesetz darstellen lassen. Es erfolgt eine Aufteilung der Beiträge zur Leitfähigkeit durch sogenannte starke und schwache Elektrolyte. Das Ziel ist die Erarbeitung einer theoretischen Basis um mit theoretischen Vorhersagen die in Kapitel 4 vorgestellte Charakterisierung des Messaufbaus zu bewerten.

Das von **Kohlrausch** empirisch gefundene Gesetz (Gl.20) beschreibt für so gennante **starke Elektrolyte** den Zusammenhang zwischen elektrischer Leitfähigkeit σ und der Ionenkonzentration c . Bei starken Elektrolyten sind die Ionen in der Lösung vollständig dissoziiert. Mit Hilfe der Äquivalentleitfähigkeit σ_{eq} (Gl.19) lässt sich für Salzkonzentrationen $<0,01$ [Mol/Liter] ein Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und der Wurzel der Konzentration darstellen. Bei höheren Konzentrationen treten Abweichungen in Richtung kleinerer Äquivalentleitfähigkeit auf (Debye-Hückel-Onsager Theorie).

$$\sigma_{eq} = \sigma_{\infty} - k\sqrt{c}$$

Gl. 20: Kohlrauschgesetz

Für **Schwache Elektrolyte**, die durch das **Ostwald'sche Verdünnungsgesetz** beschrieben werden, gilt, dass die Ionen auch bei relativ niedrigen Konzentrationen nicht vollständig dissoziiert in der Lösung vorliegen. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen nicht-dissoziierten und dissoziierten Ionen ein (vgl. Gl 21).

$$K_c = \frac{c(K^+) \times c(A^-)}{c(KA)} = \frac{\alpha^2}{1 - \alpha} \times c_0$$

Gl. 21: Ostwaldsches Verdünnungsgesetz

K_c	Dissoziationskonstante
α	Dissoziationsgrad
$c(A^-)$	Konzentration der Anionen
$c(K^+)$	Konzentration der Kationen
$c(KA)$	Konzentration des nicht dissoziierten Elektrolyts
c_0	Einwaagekonzentration (Verdünnungsgrad)

Das Verhältnis der Anzahl freier Ionen zur Gesamtanzahl der Ionen gibt den Dissoziationsgrad $\alpha(c)$ an (vgl. Gl.22).

$$\alpha(c) = \frac{\Lambda_{eq}(c)}{\Lambda_{\infty}}$$

Gl. 22: Dissoziationsgrad

Für kleine Dissoziationsgrade $\alpha \ll 1$ gilt:

$$\alpha(c) \sqrt{c} = \sqrt{K_e} \quad \text{bzw.} \quad \Lambda(c) \sqrt{c} = \sqrt{K_e} \cdot \Lambda_{\infty} = \text{const.}$$

Gl. 23: Kohlrauschgesetz

Daraus (vgl. Gl. 23) resultiert ein hyperbolischer Verlauf der Equivalentleitfähigkeit als Funktion der Wurzel aus c .

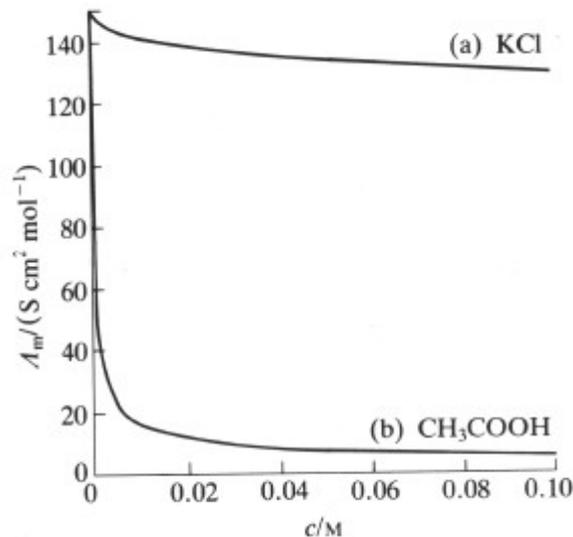


Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit von schwachen und starken Elektrolyten: starker Elektrolyt (a), schwacher Elektrolyt (b) [10].

Abbildung 10 zeigt das Verhalten der Ionenkonzentration gegenüber der Leitfähigkeit σ . Der Beitrag

schwacher Elektrolyte zur Gleichstromleitfähigkeit ist im Verhältnis zum Beitrag starker Elektrolyte vergleichsweise klein. Es wird daraus gefolgert, dass in dieser Arbeit die Gleichstromleitfähigkeit des RPMI-Mediums von starken Elektrolyten dominiert wird. Der Beitrag von schwachen Elektrolyten zur Leitfähigkeit wird somit vernachlässigt. Na^+ -Ionen haben im RPMI-Medium (Kap.2.3.1) eine 7-fach höhere Konzentration als alle anderen starken Elektrolyte und bestimmen deshalb im Wesentlichen die Gleichstromleitfähigkeit des RPMI-Mediums.

1.3.1.2 Gleichstromleitfähigkeit von Makromolekülen

Die impedanzspektroskopische Messung an Zellkulturen hängt wesentlich von den Leiteigenschaften des RPMI-Kulturmediums ab. Das RPMI-Medium (Kap.2.3.1) besteht aus verschiedenen Salzionen, Aminosäuren und Vitaminen. Auf den Gleichstromleitfähigkeitsbeitrag „einfacher“ Ionen wurde in Kap. 1.3.1 und Kapitel 1.3.2 eingegangen. Der Gleichstromleitfähigkeitsbeitrag von Makromolekülen (wie Aminosäuren, Vitaminen und Proteinen) wird durch die je nach pH-Wert unterschiedlich stark dissoziieren ionisierbaren Seitenketten bestimmt. Dem RPMI-Medium ist ein Puffer beigemischt, der den pH-Wert und somit den Gleichstromleitfähigkeitsbeitrag von Makromolekülen näherungsweise konstant hält.

Makromoleküle sind nach außen im Vergleich zur deren Beweglichkeit oft sehr schwach geladen. Da sie zusätzlich träge Barrieren für flink wandernde Ionen darstellen, können Makromoleküle den Stromfluss hemmen (vgl. Hüpfleitung).

1.3.2 Wechselstromleitung in Elektrolytlösungen: Hüpfleitung

Impedanzspektroskopie (IS) ist die Messung der Impedanz über einen Frequenzbereich. Die IS an Caco-2-Zellgewebe findet zwischen metallischen Elektroden im elektrolytischen RPMI-Nährmedium statt.

Bemerkung: Im Folgenden wird oft anstatt der Impedanz die Leitfähigkeit σ betrachtet. Ist die Geometriekonstante, die sogenannte Zellkonstante, gegeben, können sie einfach ineinander umgerechnet werden (vgl. Gl.15 und Gl.16).

Wechselstromleitung in einem Elektrolyten ist primär durch Hüpfleitung bestimmt. Wie für viele andere nicht elektronischen Leiter ergibt sich diese Leitfähigkeit aus dem Modell des „Universal Dielectric Response (UDR).“

$$\sigma' = \sigma_{DC} + \sigma_0 \omega^s \quad s < 1; \text{meist}; s \geq 0,5$$

Gl. 24:UDR-Leitfähigkeit [11]

Das UDR-Modell beschreibt eine Leitfähigkeit, die sich aus einem Gleichstromanteil σ_{DC} und aus einem frequenzabhängigen („power law“ ($\sigma_0 \omega^s$)) -Anteil über Addition zusammensetzt. Die Hüpfleitung beschreibt den frequenzabhängigen Strom im Elektrolyten. Bei hohen Frequenzen bewegt sich der Ladungsträger im

Wesentlichen zwischen zwei benachbarten Plätzen. Bei niederen Frequenzen werden dementsprechend große Distanzen zurückgelegt. Mit abnehmender Frequenz steigt die Wahrscheinlichkeit, auf hohe Energiebarrieren zu stoßen. Ziehen wir in Betracht, dass später in einem biologischen Kulturmedium gemessen wird, wo Proteine und andere Makromoleküle frei im Medium gelöst sind, dann kann gefolgert werden, dass Makromoleküle eine solche Barriere für flink wandernde Ionen darstellen können. Folglich erwartet man für das RPMI-Kulturmedium, im Vergleich zum einfachen Elektrolyten (z.B. NaCl-Lösung), eine niedrigere elektrische Elektrolytleitfähigkeit bei niederen Frequenzen und eine Höhere mit steigender Frequenz (vgl. Kap. 4.2.4).

Mit abnehmender Frequenz nähert sich laut dem Gesetz des UDR, $\sigma'(\omega)$ dem DC-Wert σ_{dc} . In realen Experimenten an Ionenleitern, wo Elektroden und Elektrolyt an der Grenzfläche Ladungen austauschen, beginnt bei niedrigen Frequenzen die Elektrolytleitfähigkeit jedoch weiter zu fallen und sich dem Wert $\rightarrow 0$ anzunähern. Im Realteil der Permittivität (vgl. Kap. 1.4) äußert sich dies in einem starken Anstieg. Dieses Phänomen ist auf die Ausbildung einer Raumladungszone durch schichtweiser Ansammlung von Ionen vor der Elektrode zurückzuführen und als Phänomen der „Blockierenden Elektroden“ bekannt [11].(vgl. Kap. 1.5.2).

1.4 Frequenzabhängige Leitfähigkeit verschiedener gelöster Ladungsträger

Der Maxwell'sche Verschiebungsstrom ist das Stichwort, wenn man in der Physik von frequenzabhängigen elektrischen Strömen spricht. Beim Maxwell'schen Verschiebungsstrom addieren sich die Beiträge der

I ... elektrischer Strom
 E ... elektrisches Feld [V/m]
 A... Fläche
 σ ... Leitfähigkeit
 ε ... Permittivität

$$I = \int_A \left(\sigma \vec{E} + \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \times d\vec{A}$$

Gl. 25: Maxwell'scher Verschiebungsstrom

Leitfähigkeit σ und die der sogenannten Permittivität ε zu einem Gesamtstrom. In dieser Theorie für frequenzabhängige elektrische Felder in Medien, wird das von außen angelegte Feld vom innen resultierenden Feld unterschieden. Voraussetzung für die Wechselwirkung eines Materials mit dem elektrischen Wechselfeld ist das Vorhandensein eines permanenten oder induzierten Dipolmoments und/oder von beweglichen Ladungen.

Das klassische Beispiel ist der Plattenkondensator. Ein äußeres Feld E polarisiert das zwischen den geladenen Platten liegende Material (Dielektrikum = elektr. DC-Isolator) und erzeugt somit ein in Stärke und Richtung von außen verschiedenes lokales mikroskopisches Feld E_l . Die makroskopische Auswirkung dessen, ist durch die Maxwellgleichung, beschrieben. Die Permittivität ε , (äquiv.; elektr. Suszeptibilität χ) ist hierbei ein Maß für die Durchlässigkeit eines Materials gegenüber elektrischen Feldern.

$$E = \frac{D}{\varepsilon} = \frac{D}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} = \frac{D}{(1 + \chi_e) \varepsilon_0}$$

Gl. 26: Maxwell'sches Verschiebungsgesetz

D... Dielektrische Verschiebung [C/m²]

ε ... Permittivität

χ ... Suszeptibilität

ε_r ... relative Permittivität

ε_0 ... Permittivität

Die Brücke zwischen makroskopischer Permittivität ε und mikroskopischer Polarisierbarkeit α schlägt die Clausius-Mossotti-Gleichung (Gl.27).

$$\chi = \varepsilon_r - 1 = \frac{N\alpha}{\varepsilon_0} \frac{E_l}{E}$$

Gl. 27: Clausius-Mossotti-Gleichung

Die Polarisierbarkeit α ist ein Maß für die Verschiebbarkeit der positiven zur negativen Ladung innerhalb eines (i) Moleküls (Ionale Polarisation) oder (ii) eines Atoms (elektronische Polarisation). Je höher die Polarisierbarkeit ist, desto leichter lassen sich die N Dipolmomente durch ein äusseres elektrisches Feld induzieren, umso größer ist das lokale mikroskopische Feld E_l und umso durchlässiger ist das Material für

elektrische Felder.

$$P = \epsilon_0 \chi E$$

Gl. 28: Polarisierung

Die Polarisation P (vgl. Gl.28), das aus permanentem und induziertem Dipolmoment resultierende mikroskopisch polarisierte Einheitsvolumen, ist wie auch die daraus makroskopisch resultierenden elektrische Feldgröße D materialabhängig und Frequenzabhängig.

$$\chi_e = \chi_{e1} + \chi_{e2} + \chi_{e2} + \dots$$

Gl. 29: Addition der Suszeptibilität des Einheitsvolumens

$$\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega)$$

Gl. 30: Dispersionsrelation der Permittivität

$$\chi_e = \chi_{er1} + i\chi_{ei1} + \chi_{er2} + i\chi_{ei2} + \dots$$

Gl. 31: Dispersionsrelation der Suszeptibilität

Stellt sich in einem Medium bei einer gewissen Frequenz eine Abweichung von $\epsilon(\omega=\infty)=\epsilon(\omega=\text{beliebig})=\epsilon(\omega=0)$ ein, so spricht man von Dispersion.

$$\frac{\partial \alpha(t)}{\partial t} = -\frac{1}{\tau} \alpha(t)$$

Gl. 32: Debey-Relaxation

Die Dispersion ist immer mit einer für den Prozess charakteristischen Relaxationszeit τ und einem notwendigen Energieaufwand verbunden um das betrachtete System vom anfänglichen Gleichgewichtszustand in den angeregten Zustand zu heben. Die Debey-Relaxation (vgl. Gl.32) beschreibt beispielsweise ein solches Verhalten. Die Auslenkung α ist proportional zur Zeit, die das System für die Rückkehr in den Anfangszustand braucht. Der Proportionalitätsfaktor bei der Debey-Relaxation ist die inverse Relaxationszeit [11]. Nimmt man ferner an, dass alle Auslenkungen und Relaxationszeiten unabhängig von den Nachbarn stets konstant bleiben, ergibt sich die Polarisation wie in Gleichung 33

$$P(T) = P_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Gl. 33: Polarisation (im Debey- Modell)

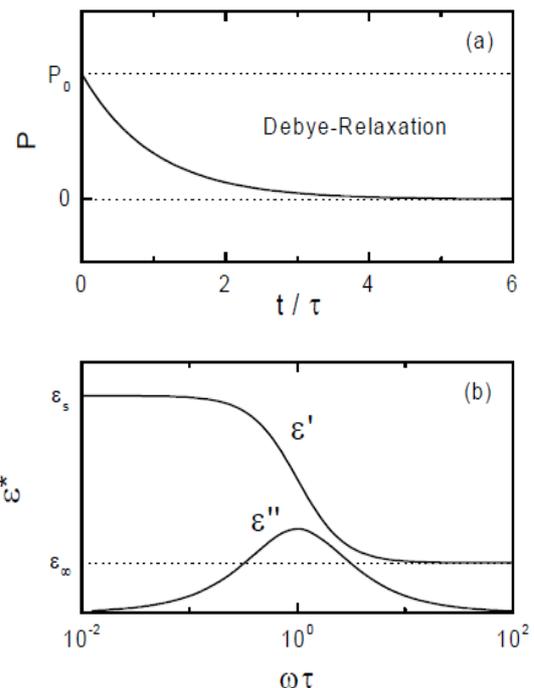


Abbildung 11: Debeyrelaxation [11];
 (a)Polarisation gegen die "Systemzeit"
 (b)Real und Imaginärteil der Permittivität gegen die "Systemzeit"(beachte Faktor 2π)

Über Fouriertransformation ($\tau \rightarrow \omega$) lässt sich nun die Frequenzantwort des Systems in Form der frequenzabhängigen komplexen Permittivität ermitteln.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau}$$

Gl. 34: Permittivität (im betrachteten Modell)[11]

Spaltet man diesen Ausdruck in Real und Imaginärteil auf,

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Gl. 36: Permittivität (im betrachteten Modell)[11]

$$\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Gl. 35: Permittivität (im betrachteten Modell)[11]

Wobei ε_∞ ...die Antwort auf ∞ Frequenz und ε_s ...die Feldantwort des statischen Feldes ist

so hat der Imaginärteil der Permittivität $\varepsilon''(\lg\omega)$ bei $\omega=1/\tau$ ein Maximum und der Realteil der Permittivität $\varepsilon'(\lg\omega)$ weist bei $\omega=1/\tau$ einen Wendepunkt auf. Die Halbwertsbreite der Verlustkurve $\varepsilon''(\omega)$ beträgt 1.144 Dekaden. Anschaulich heißt das, dass für $\omega \ll 1/\tau$ das lokale elektrische Feld dem äußeren folgen kann, was für $\omega \gg 1/\tau$ nicht mehr der Fall ist. In beiden Fällen ist der Verlust 0. Man vergleiche diesen Sachverhalt mit dem des harmonischen Oszillators, bei dem der Energieübertrag dann am höchsten ist, wenn Anregerfrequenz und Resonanzfrequenz übereinstimmen[11].

Relaxationszeiten sind temperaturabhängig. Außerdem treten bei realen Messungen asymmetrische Verbreitungen der Verlustkurven auf. Verschiedene theoretische Ansätze, wie die Verteilung der Relaxationszeiten, die darauf beruht, dass eben nicht alle benachbarten Moleküle unabhängig voneinander relaxieren, setzen hier mit Korrekturen an.

Die Tatsache, dass sich aus der Feldantwort Imaginär und Realteil der Permittivität berechnen lassen, ist Beleg dafür, dass diese nicht unabhängig voneinander sind und sich vielmehr über die Kramers-Kronig-Relation ineinander umrechnen lassen.

$$Z'(\omega) - Z'_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{uZ''(u) - \omega Z''(\omega)}{u^2 - \omega^2} du$$

$$Z'(0) - Z'_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{Z''(u)}{u} du$$

$$Z''(\omega) = -\frac{2\pi}{\omega} \int_0^\infty \frac{Z'(u) - Z'(\omega)}{u^2 - \omega^2} du$$

Gl. 37: Kramers-Kronig-Relation; Dabei stehen die Größen $Z'(\omega)$ und $Z''(\omega)$ für diverse komplexe Größen (ε^*, χ^*) mit der Kreisfrequenz ω als Argument, d.h. der Index ∞ steht für Kreisfrequenzen $\omega \rightarrow \infty$ [11]

In dem für diese Arbeit relevanten Bereich von 1Hz-100kHz sind bei Raumtemperatur weder ionische oder noch elektronische Dispersionen zu erwarten. Größere Moleküle wie Aminosäuren zeigen in wässriger Lösung bei 25°C Dispersion bis zu Frequenzen >1 GHz. Ein Beispiel dafür, ist die Dispersion, aufgrund von Rotation des Moleküls, bei Glycerin, die bei einer charakteristischen Frequenz von 3,3 GHz stattfindet.

Der obere Frequenzbereich der Messung (>10kHz) liegt an der unteren Grenze zur Beta-Dispersion. In den Bereich der Beta-Dispersion fallen die Maxwell-Wagner Effekte an Zellmembranen und die Rotation von proteinartigen Material (das möglicherweise an Wassermoleküle gebunden ist) [12]. Das für die Bioimpedanzmessung relevante Beispiel einer Proteinlösung, die keine Enzyme beinhaltet, so z.B. bovine serum albumin (BSA), zeigt dielektrische Dispersion bis zu niederen Frequenzen von 10kHz. Die Relaxationszeit ist dabei der Viskosität des Mediums proportional und hängt zudem von der Größe der Proteine ab, sodass die Beta-Dispersion in der Proteinlösung aus der durch die Drehung im elektrischen Feld entstehenden Reibung mit dem Lösungsmittel zurückgeführt wird [13].

Im biologischen Gewebe hingegen, wo eine Zelle oder ganze Zellverbände als dielektrischer Relaxator betrachtet werden, tritt ein als Alpha-Dispersion (>kHz) bekannter starker Anstieg der Permittivität auf, der bei homogenen Systemen eigentlich unbekannt ist. Beta- und Alpha-Dispersion können jedoch oft nicht klar abgegrenzt werden. Als mögliche Ursache der Alpha-Dispersion wird über Relaxation von Ionenflüssen entlang tangential geladener Membranoberflächen oder Diffusionseffekte von Gegenionen durch Zellmembranen spekuliert (erstmalig von Schwan 1981 beschrieben). Leider wird dieser Effekt oft von blockierenden Elektroden (vgl. Kap. Elektrodenpolarisation) überschattet. Zudem tritt Alpha-Dispersion in der Leitfähigkeit kaum in Erscheinung, denn wenn man ein dielektrisches Inkrement $\Delta\epsilon$ von 10^6 und eine Relaxationsfrequenz von 100Hz annimmt, dann ergibt sich aus der Kramers-Kronig-Relation, dass der Anstieg der Leitfähigkeit, der mit der Alpha-Dispersion zusammenhängt, nur etwa 0,005S/m beträgt. Im Vergleich ist die Ionenleitfähigkeit von typischem Gewebe ca. 200-mal höher. Folglich sind Gewebe bei niedrigen Frequenzen sehr hochohmig, trotz ihrer enorm hohen Permittivitätswerte [11].

1.5 Messtechnik

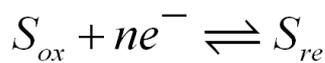
Im Rahmen dieser Arbeit wird die Impedanz von elektrolytischen Zellsuspensionen und Zellgeweben gemessen. Die 4-Punkt-Messung der Impedanz findet zwischen metallischen Elektroden statt, die direkten Kontakt zur Zellsuspension und/oder zum Zellgewebe haben. Bei der 4-Punkt-Messung wird der Strom durch zwei Stromelektroden eingeprägt und an zwei separaten Spannungselektroden die Spannung stromfrei gemessen. Die 4-Punkt-Messmethode vermeidet störende Grenzflächeneffekte, die an der Grenzfläche Elektrode/elektrolytische Zellsuspension auftreten [2]. Diese störenden Grenzflächeneffekte treten beim Ladungsübertritt von der Elektrode in die elektrolytische Zellsuspension auf. Die Beschreibung und Diskussion dieser Grenzfläche sind zentrale Bestandteile dieses Kapitels.

1.5.1 Elektroden

Zum Messen der Impedanz von Zellsuspensionen werden metallische Elektroden verwendet. Einerseits finden Platin- und Gold-Elektroden Anwendung, die flächig auf einem Chipdevice sitzen. Andererseits wird eine Edelstahlelektrode verwendet, (die den Chipelektroden im Messmodul gegenüberstehen). Beide Elektroden tauchen bei der Impedanzmessung in den Elektrolyt. Das Verhalten des Ladungsträgeraustausches in der Grenzschicht Elektrode/Elektrolyt hängt unter anderem von der Oberflächenbeschaffenheit der Elektroden und vom Elektrodenmaterial ab.

1.5.1.1 Inerte Redoxelektroden

Bei inerten Redoxelektroden bleiben Elektrodenmaterialien von Ladungsübertritten idealerweise unbeeinflusst und nehmen nicht, oder nur als Katalysatoren, an der Redoxreaktion teil. Diese Elektroden bleiben über lange Messzeiten stabil



S_{ox} : oxidiertes Stoff S

S_{red} : reduzierter Stoff S

An der Anode werden Elektronen von Ladungsträgern im Elektrolyten aufgenommen und die jeweiligen Stoffe oxidiert (z.B.: $2O^{2-} \rightarrow O_2 + 4e^{-}$) und umgekehrt werden an der Kathode Elektronen an den Elektrolyten abgegeben und die beteiligten Stoffe reduziert (z.B.: $2H^{+} + 2e^{-} \rightarrow H_2$). Hier ist nur die Bruttoreaktion dargestellt, auf Zwischenschritte die unter Umständen das elektrochemische Verhalten stark beeinflussen können ist in dieser stark vereinfachten chemischen Reaktionskette verzichtet worden. [11]

Materialien für inerte Redoxelektroden sind weitestgehend Edelmetalle wie Platin und Gold, aber auch Titan und Graphit. Obwohl die Elektroden chemisch nicht reagieren, kann sich das elektrochemische Verhalten der Elektroden während einer längeren Messung verändern. So kann sich beispielsweise in der Oberfläche von Platinelektroden verstärkt Sauerstoff einlagern, wodurch sich das Redoxpotential der Elektrode verändert. Auch die Absorption von Proteinen aus der Nährlösung stellt eine solche elektrisch relevante Elektrodenoberflächenveränderung dar.

1.5.1.2 Metall/Metallionen-Elektroden

Bei nicht-inerten Metall/Metallionen-Elektroden nimmt das Elektrodenmetall an der Redoxreaktion teil. Die Ladungsträger zwischen Elektrode und Elektrolyt sind die positiven Metallionen.



$Me^{z+}_{gelöst}$...gelöstes Metallion

Hierbei geht einerseits an der Anode ein geladenes Metallion in Lösung und andererseits lagert sich an der Kathode ein Metallion an der Elektrode an. An der Kathode scheidet sich das Metall ab, während an der Anode das Metall in Lösung geht. Die Elektrode besitzt keine Langzeitstabilität und löst sich durch den Ladungsaustausch auf. Die elektrolytische Abscheidung von Metallen ist neben der angelegten Spannung

auch von der Art des Elektrolyten abhängig.

Ein typisches Beispiel für eine Metallion-Elektrode ist die Eisenelektrode



Bei idealen Metall/Metallionen-Elektroden sind die Kationen die Ladungsträger [11].

1.5.2 Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt

An der elektrischen Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt wechselt der Strom seine Ladungsträgertransportart. Die freien Elektronen leiten den Strom in der metallischen Elektrode und die beweglichen Ionen den im Elektrolyten. Im Zuge der Messung kommt es an dieser Grenzfläche zum Austausch von elektrischen Ladungen. Wie in Abbildung 12 gezeigt wird, ist die Beziehung zwischen Strom und Spannung nicht linear.

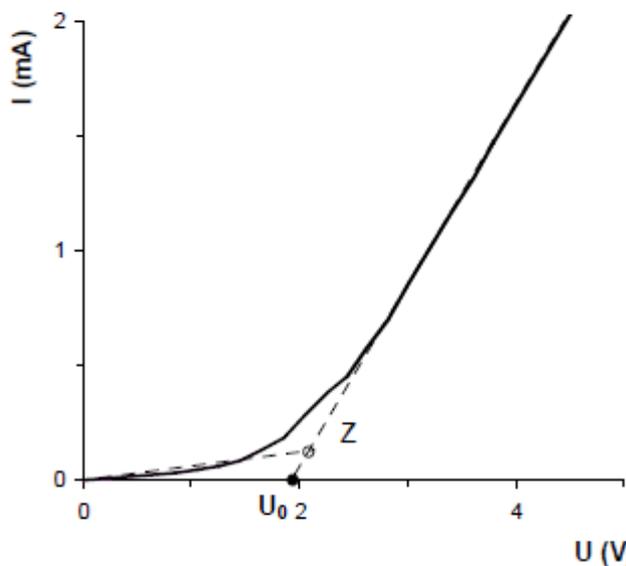


Abbildung 12: Strom-Spannungs-Diagramm: Zersetzungspunkt; Strom-Spannungskennlinie von Pt/schwarze-Elektroden in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)[14]

Bevor die Spannung U_0 in Abbildung 12 erreicht wird, fließt nur ein sehr geringer Strom. Dieser Strom ist ein Verschiebungsstrom der noch keine Redoxreaktion verursacht. Die von außen angelegte Spannung fällt fast vollständig als Potentialdifferenz in der Phasengrenze Elektrode/Elektrolytlösung ab. Die Grenzspannung ab der lineares Verhalten zwischen Strom und Spannung beobachtet werden kann, nennt man Zersetzungsspannung (in Abb.13; U_0) Dabei zersetzt sich die Elektrode und entlässt Metallionen in die Lösung.

U (V) Die Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt stellt für Leitfähigkeitsmessungen ein erhebliches Problem dar. Die an die Elektroden angelegte Spannung

stimmt nicht mit der tatsächlichen, rein in der Elektrolytlösung herrschenden Spannung überein, sondern fällt schon an dieser Phasengrenze erheblich ab. In der Fachwelt ist dieses oft unerwünschte Phänomen als Elektrodenpolarisation bekannt.

Elektrodenpolarisation:

Die Elektrodenpolarisation beschreibt ein oft unerwünschtes Phänomen, das beim Ladungsaustausch an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt auftritt. Da der Ladungsaustausch mit elektrochemischen Reaktionen einhergeht und diese träge bzw. begrenzt im zeitlichen Mittel, mit gewisser statistischer Wahrscheinlichkeit ablaufen, kommt es nahe der Elektrode zu schichtweisen Ionenansammlungen.

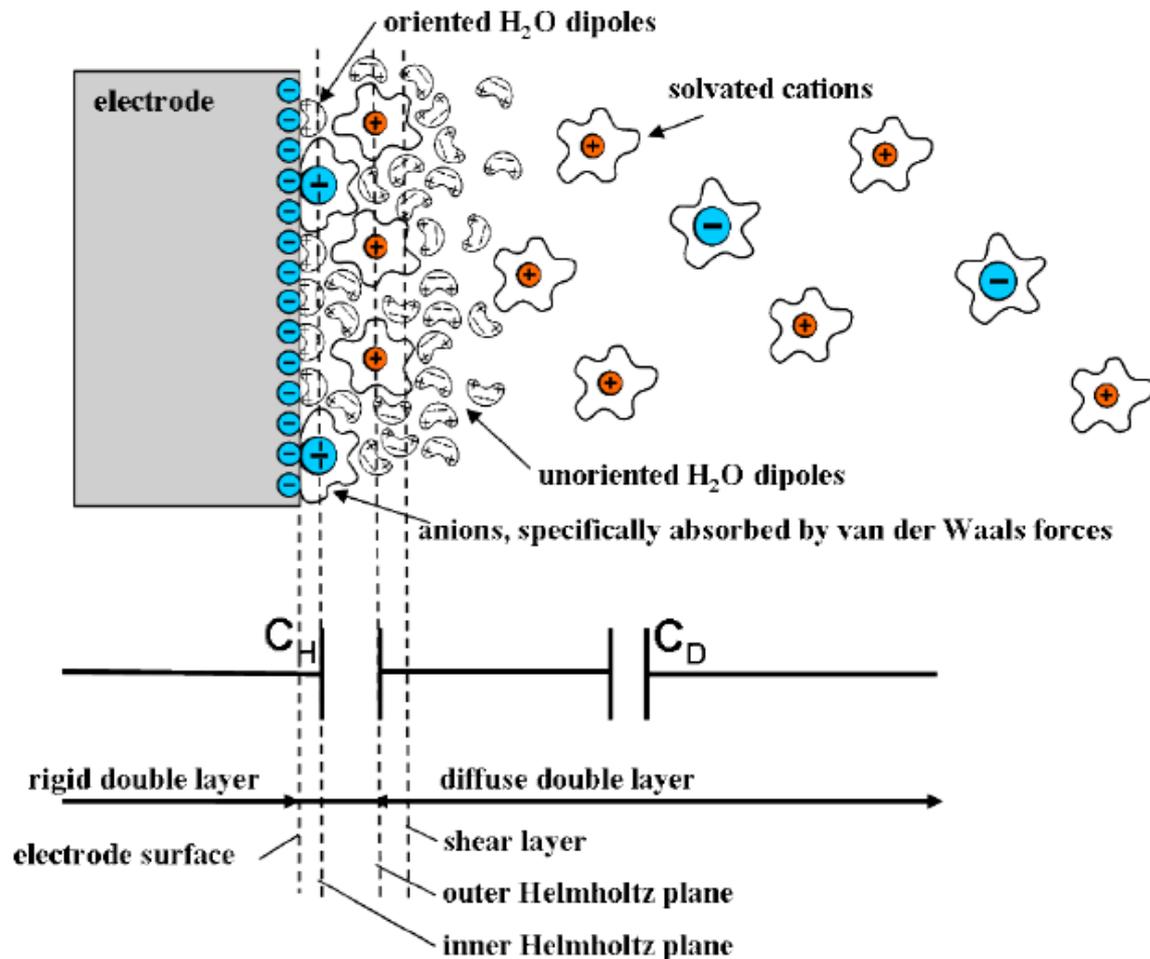


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt; Polarisation der Elektroden; eine starre Schicht von Ionen der Lösung heftet sich an die Elektrodenoberfläche (starre Helmholtzdoppelschicht; 0,1nm), diffuse hydratisierte Ionen behindern den Ladungsträgerfluß nahe der Elektrode (diffuse Doppelschicht;0,1nm-ca.10nm) Abb. nach [1]

Bekannte Modelle zur Beschreibung schichtweiser Ionenansammlungen an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt sind:

- a) Die Helmholtz-Doppelschicht: Sie ist gekennzeichnet durch eine starre Ionenschicht mit der Ausdehnung des unhydratisierten Ionenradius (ca.0,1nm).
- b) Die Gouy-Chapman-Doppelschicht: Sie die diffuse Doppelschicht (vgl. Abb.13), die sich nach der Helmholtz-Doppelschicht bis zu einer potentialabhängigen Grenze ausbildet. Sie bildet sich durch thermodynamisch aktivierte Molekülbewegungen aus und je höher das an der Grenzfläche anliegende Potential ist, desto kleiner ist sie.
- c) Die Stern-Doppelschicht: Sie fasst die Sachverhalte der Helmholtz-Doppelschicht und der Gouy-Chapman-Doppelschicht zusammen und hat eine charakteristische Ausdehnung (Abfall der Potentialdifferenz auf das 1/e fache) der Debye Länge. Für einen starke Elektrolyten, wie z.B. eine 0,001 molare Kochsalzlösung, hat sie eine Ausdehnung von etwa 10nm (potentialabhängig).

Im (thermodynamischen) Gleichgewicht sind die Austauschstromdichten j (Ladungsträgeraustausch pro Fläche) von Elektrode zu Elektrolyt und umgekehrt gleich groß.

$$\vec{j} = \sigma \vec{E} \stackrel{th.dyn.Ggw}{=} 0$$

Gl. 38: Leitfähigkeit

Legt man von außen eine zusätzliche Spannung an, erfolgt eine nicht lineare stromdichteabhängige Abweichung von dieser Gleichgewichtsspannung. Man nennt diese Überspannung und den Effekt Polarisation. Die Ausprägung der Polarisation ist vom Elektrodenmaterial, von der Stromdichte an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt und der Frequenz abhängig.

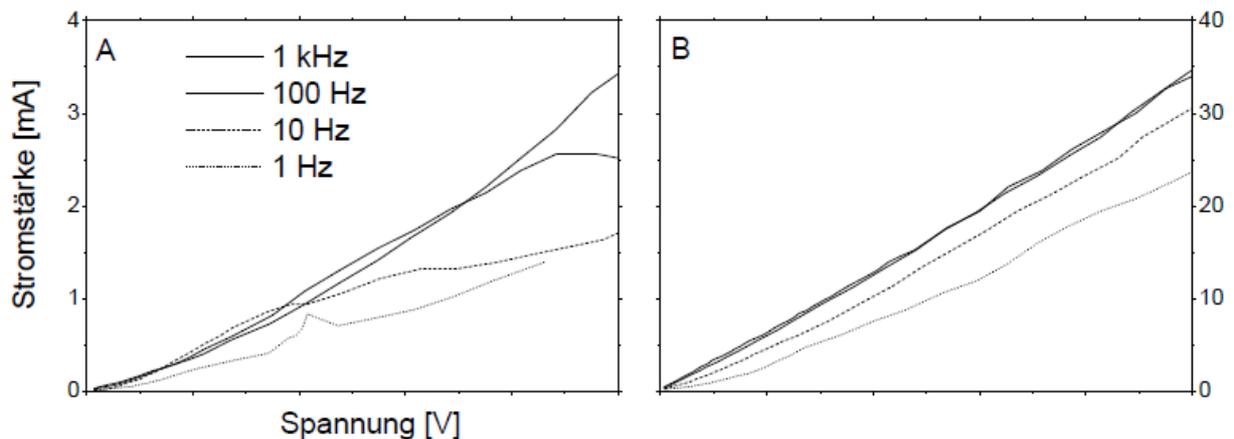


Abbildung 14: Frequenzabhängige Strom-Spannungskennlinien von Elektroden; verschiedene Elektroden in PBS + 10% FKS (Foetales Kälberserum). A: besputterte Ti/Pt-Elektroden, Elektrodenabstand 0.5mm, B: Pt/schwarz-Elektroden, Elektrodenabstand 1cm.[14]

Die Ursachen der Polarisation können weiter unterteilt werden. Zum Einen ändert sich mit dem durch die Grenzfläche fließenden Strom die lokale Konzentration der Ionen nahe der Elektrodenoberfläche (Konzentrationsüberspannung-reversibler Prozess). Zum Anderen sind besonders bei hohen angelegten Spannungen zusätzliche Spannungen notwendig, damit die Ladungsträger überhaupt erst durch die Phasengrenze treten können (Durchtrittspolarisation-irreversibler Prozess).

Folgen eines Konzentrationsgradienten nahe der Elektrode sind:

- Eine Diffusionsüberspannung, die auf einer Verarmung oder Anreicherung der an der Gesamtreaktion teilnehmenden Partner beruht.
- Eine Reaktionsüberspannung, welche aus der Hemmung einer vorangegangenen oder einer Folgereaktion resultiert (einschließlich Hydrations- und Dehydratationsvorgänge)
- Eine Kristallisationsüberspannung, die auftritt, wenn Ein- oder Ausbau der Metallionen in bzw. aus dem Kristallgitter gehemmt sind.
- Eine Widerstandsüberspannung (irreversibler Prozess), die dem ohmschen Spannungsabfall an der Elektrode entspricht, der z.B. durch eine Beschichtung entstehen kann [15].

Die Gesamtpolarisation lässt sich aus einem Modell, dem elektrischen Ersatzschaltbild (oder Äquivalenzschaltkreis), berechnen. Dieses ist wie, ein elektrisches Schaltbild, aus einer Kombination von ohmschen Widerständen und Kapazitäten zusammengesetzt. Werden viele Ursachen der Polarisation oder anderer störender Effekte unterschieden, wird das Ersatzschaltbild zunehmend komplizierter. So hängt das Ersatzschaltbild vom Elektroden-Material, der -Oberfläche (-struktur), der Zusammensetzung des Elektrolyten und der den Gleichgewichtszustand der Elektrode bestimmenden Redoxreaktion ab. Adsorption von Ionen oder von polarisierten Makromolekülen tritt an den Elektrodenoberflächen auf, (durch Reihenschaltung von Kapazitäten darstellbar) und verschiedene Redoxreaktionen und diffusionsabhängige Prozesse hängen nicht linear von der eingepprägten Frequenz ab. Die Elektroden selbst, bleiben über die Messzeit (aktive Elemente) oft nicht stabil. Man wählt deshalb bei Modellierung der Elektrodenpolarisation üblicherweise ein den realen Verhältnissen angepasstes virtuelles Schaltelement (CPE - Constant Phase Element, (powerlaw abhängig, siehe „UDR“) das wenigstens die frequenzabhängigen Reaktions- und Diffusions-Impedanzen empirisch beschreibt.

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q} (j\omega)^{-n}$$

Gl. 39: Leitfähigkeit

„Trotz der ausgeprägten Analogie bestehen einige Unterschiede zwischen einem elektrischen und einem elektrochemischen System, die gleichzeitig die Grenzen dieser Betrachtungsweise aufzeigen“ [15]. „Finally, we conclude that an all-encompassing theoretical framework, which is capable of accommodating all of the “impedance spectroscopies“ that may be defined, is currently lacking“ (auf dDeutsch: „es gibt noch kein alle Phänomene klärendes vereintes Modell“) [16].

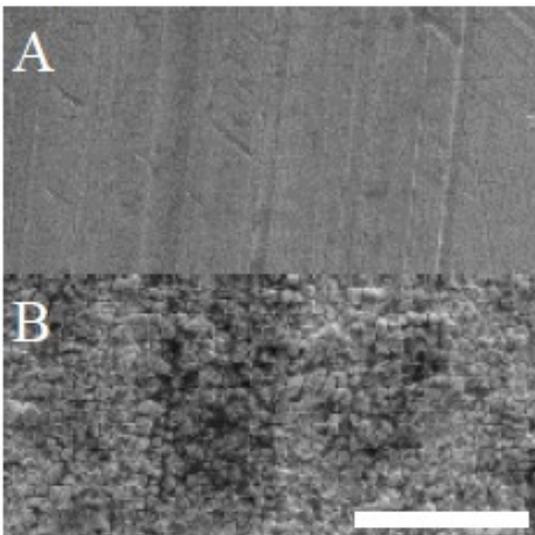


Abbildung 15: Pt-Oberfläche (weißer Balken = 20µm):
A: Polierte Pt-Oberfläche
B: Durch galvanische Abscheidung erzeugte fraktale Pt-Oberfläche, die etwa 10⁶-fach größer ist, als die des polierten Metalls [15].

In einer vereinfachten Betrachtung lässt sich dennoch einsehen, welche einfachen Anforderungen eine Impedanzmessung verbessern können. Einerseits ist die Phasengrenze teils durch Kapazitäten beschreibbar, die für den elektrischen Strom bei hohen Frequenzen keine Barriere mehr darstellen. Andererseits steigen die Widerstände nicht proportional mit der Stromdichte, solange diese aber näherungsweise konstant bleibt, ist die Beziehung zwischen Strom und Spannung - ähnlich wie beim Ohmschen Widerstand - annähernd linear.

Aus den dargelegten Gründen wählt man bevorzugt Platin als Elektrodenmaterial. Platin ist ein inertes Elektrodenmaterial (siehe Kap.1.5.1.1), das die Reaktivität der Wasserstoff- und Sauerstoffmoleküle durch deren Anlagerung an der

Oberfläche erhöht. Die Oberfläche sollte der Elektrode möglichst groß sein (vgl. Pt-Schwarz Elektroden), sodass auch bei hohen Spannungen kleine Stromdichten an der Grenzfläche resultieren. Die Elektrode selbst sollte möglichst klein sein, sodass sie nicht allzu träge gegenüber kapazitiver Aufladung reagiert.

„Insbesondere auch die Anwesenheit polarisierbarer Makromoleküle im Elektrolyten, z.B. durch Zugabe von Serum (FKS), setzt den Einfluss der Konzentrationspolarisation herab und es wird bereits bei niedrigeren Frequenzen ein lineares Strom-Spannungs-Verhalten beobachtet. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist die Bildung einer Proteinschicht vor bzw. auf der Elektrodenoberfläche, die den Aufbau oder Abbau einer Oxidschicht und damit das Entstehen einer entsprechenden Reaktionsüberspannung behindert“ [14].

Durch die Verkabelung der Elektroden steigt bei hohen Frequenzen durch kapazitives Übersprechen der Messfehler. Es gilt also einen Kompromiss zu finden. Häufig werden Leitfähigkeitsmessungen deshalb zwischen 10Hz und 10kHz durchgeführt und der Gleichstromanteil durch Extrapolation (vgl. „UDR“) bestimmt.

1.5.3 Die Vier-Punkt-Messtechnik

Bei der Vier-Punkt-Messung, oder auch 4-Spitzen-Messung genannt, werden Signal-zuführende und -messende Elektrode räumlich voneinander getrennt. Damit soll unter Anderem erreicht werden, dass die Signal-Elektroden-Umgebung die Mess-Elektroden-Umgebung nicht unmittelbar beeinflusst.

Abbildung 17 zeigt eine schematische Vereinfachung der Messsituation. Dabei wird der Spannungsabfall in der Messlösung an zwei Spannungselektroden gemessen, die als rote Flächen dargestellt sind und in die Elektrolytlösung (blau) tauchen. Der Strom wird über die Stromelektroden (weiß) zugeführt. Die Spannungsmessung erfolgt praktisch stromfrei. Die Spannungselektroden werden vom hochohmigen Voltmeter (Innenwiderstand $> 10^{10} \Omega$) nicht belastet und können sich daher auch nicht (oder zumindest deutlich weniger [11], [2]) polarisieren.

Ein Nachteil bei 4-Punkt Messungen ist, dass das Messgerät beispielsweise ein Stromsignal anlegt und gleichzeitig den resultierenden Strom und die resultierende Spannung misst, wobei die Stromdichte an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt möglicherweise variant ist. Vergleicht man diesen Sachverhalt mit der Problematik der Butler-Volmer-Gleichung bzw. mit dem Effekt blockierender Elektroden (vgl. Kap.1.5.2), folgen allein schon Messfehler dadurch, dass die Stromdichte nicht linear mit der Spannung über einen nicht ohmschen (stromdichteabhängigen) Widerstand verknüpft ist.

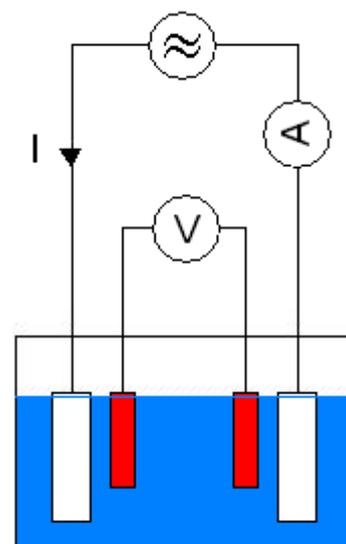


Abbildung 16: Vier-Punkt-Messung: 2 Elektroden (weiß) prägen das Signal ein; 2 andere Elektroden (rot) messen die Antwort

In dieser Arbeit wird mit niedrigen Spannungen (max. 0,1V (\leq Grenzspannung U_0 : vgl. Kap. 1.4.2)) und kleinen Stromstärken gearbeitet. Es tritt also zwangsläufig der Fall auf, dass Überspannungen an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt, die über Messung von Strom und Spannung ermittelte Impedanz des Elektrolyten verfälschen. Deshalb wird versucht, den Strom durch die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt so konstant wie möglich zu halten (vgl. Kap.2.4.2; LCR-Meter, constant current mode, constant voltage mode).

Das Messergebnis bei 4-Punkt-Messungen hängt von der Feldverteilung und somit von der Position der Elektroden zueinander (im Elektrolyten) ab. Die Messelektroden müssen geschickt zwischen die Signalelektroden positioniert werden, sodass beispielsweise ein mit dem Abstand möglichst einfach formulierbares Gesetz gefunden werden kann, bzw. geringfügige Änderungen im Aufbau nur zu vernachlässigbar kleinen Abweichungen des Messergebnisses führen. Im Verlauf dieser Diplomarbeit stellte sich die Anforderungen nach einer vernünftigen Feldverteilung bei 4-Punkt-Messungen als etwas grundsätzlich sehr wichtiges heraus.

1.6 Epithelzellen

Ziel dieser Arbeit ist die Messung der transepithelialen Impedanz von biologischem Gewebe. Zu diesem Zweck wurden Epithelzellen vom Typ Caco-2 ausgewählt. Im Folgenden werden die Caco-2-Zellen kurz beschrieben.

Das Epithel ist eine biologische Sammelbezeichnung für Deck- und Drüsengewebe. Es ist neben Muskel-, Nerven-, und Bindegewebe eines der vier Grundgewebearten. Das Epithel besteht seinerseits aus Epithelzellen, die im Verband das Epithelgewebe bilden. Alle eukaryotischen Zellen haben bezüglich ihrer Grundstruktur (prinzipiell) den gleichen Bauplan. Eine äußere Zellmembran trennt das Zellinnere, das Zytoplasma, von der Umgebung ab. Im Zytoplasma befinden sich weitere abgegrenzte Funktionsbereiche, wie beispielsweise Mitochondrien und der Zellkern, der seinerseits wieder durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma getrennt ist.

Die Zellen des Epithels liegen im Gewebe dicht beieinander und sind reich an Zellkontakten. Demzufolge besitzt das Gewebe nur kleine Interzellularräume mit entsprechend wenig Intrazellulärsubstanz. Epithelien haben keine Blutgefäße. Sie sind *in vivo* durch die Basalmembran vom Bindegewebe getrennt.

Eine allen Epithelzellen gemeinsame Eigenschaft ist ihre Polarität: Es kann eine obere so genannte apikale Seite, die z.B. der Haut oder dem Lumen (im Darm oder in Drüsen) zugewandt ist und eine untere so genannte basolaterale Seite, die über eine Basallamina mit dem darunter liegenden Gewebe verbunden ist, unterschieden werden. Die Polarität ergibt sich durch strukturelle und funktionelle Unterschiede von apikaler und basaler Membran. Epithelzellen besitzen einen Haftkomplex (Schlussleistenkomplex), bestehend aus Zonula occludens (Tight junction), Zonula adhaerens (Adhaerens junction) und Desmosom (Macula adhaerens), der angrenzende Epithelzellen miteinander verbindet. Epithelzellen im Gewebe bauen so eine physikochemische Barriere zwischen apikaler und basaler Gewebeseite auf. Es entsteht eine statische Spannung zwischen apikaler und basaler Gewebeseite.

1.6.1 Caco-2-Zellen

Epithelien sind auf vielfältige Weise und je nach Organ spezifisch differenziert. Bei Caco-2 Zellen handelt es sich um eine menschliche Kolonkarzinomzelllinie, welche aus einem primären Kolonkarzinom (Adenokarzinom) eines Kaukasiers im Jahre 1974 entnommen und als permanente Zelllinie etabliert wurde. Die Caco2-Zellen sind adhärenente, epitheliale Zellen, die sich ca. alle 20-80 Stunden teilen. Nach vollständiger Ausdifferenzierung zeigen Caco-2-Zellen sehr ähnliche morphologische Charakteristika wie Dünndarmenterozyten. Es entsteht eine polarisierte einzellige Schicht von Enterozyten (Darmzellen) mit Bürstensaummikrovilli [17]. Während der Polarisierungsphase kommt es zur spezifischen Expression von Lipid- und Enzymmustern an der apikalen Bürstensaummembran und der basolateralen Membran. Caco-2-Zellen exprimieren die wichtigsten Enzyme des Medikamentenmetabolismus, verschiedene Transporter für Glucose, Aminosäuren, Gallensäuren und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren [18].

Die Caco-2 Zellen haben sich deshalb über die letzten Jahre als zureichendes in vivo- Modell für oral eingenommene und im Darm absorbierte Medikamente erwiesen. Der Vergleich von Medikamententransport in Caco-2-Monolayern, mit dem Stoffwechsel des Darms im lebenden Organismus zeigt, dass der Caco-2-Monolayer zur Vorhersage des Medikamententransports über verschiedene Transportwege des Darmepithels geeignet ist. Die größte Übereinstimmung mit der Situation in vivo wird dabei von Medikamenten erreicht, die über den passiven transzellulären Weg über das Caco-2-Zellgewebe transportiert werden. Der passive parazelluläre Transportweg des Caco-2-Zelllayers in vitro ist weniger durchlässig als der in vivo. Es kann behauptet werden, dass der Caco-2-Monolayer in vitro es erlaubt, Medikamente bei denen eventuell Probleme bei Absorption über den Darm auftreten, schon vorzeitig zu erkennen. Außerdem lassen sich umgekehrt Medikamente ausfindig machen, die optimale passive Absorptionseigenschaften aufweisen [19].

Die Größe der Caco-2-Zellen reicht von 5-20µm, bei vereinzelt flächig, adhären Zellen bis zu 50µm. Die Zellen rücken im Zuge der Gewebekonstruktion enger zusammen. Sie wachsen bei vorhandener Zellnachbarschaft eher in die Höhe als in die Breite, sodass sie bei Aussaat (siehe später im Versuch) eher sphärisch mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 20µm und im dichten Gewebe in die Höhe (ca. 30µm) gezogen und in der Breite gestaucht (ca. 10µm) sind. Das Caco-2-Zellgewebe bildet, typisch für einschichtige Epithelplattengewebe, nur eine-Zelle hohe Zellschichten (Monolayer). Sie überwachsen wie ein Teppich den Untergrund, an den sie sich mit Glykoproteinen (sog. Integrine) binden.

1.6.2 Elektrische Eigenschaften von Caco-2-Zellen

Die elektrischen Eigenschaften der Zellen sind einerseits durch selektiven Ionen- und Molekültransport durch Zellmembran und Zellkontaktbereich und andererseits durch die kapazitiven Eigenschaften des Zellaufbaus bestimmt. Die äußere Zellmembran ist eine Doppellipidschicht, die für kleine, nach außen ungeladene Moleküle wie O₂, CO₂, H₂O, NO über Diffusion passierbar ist. Für Ionen wie Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ die im wässrigen Intrazellulärmedium eine Hydrathülle haben, ist das nicht der Fall. Diese werden vielmehr über Kanäle, Vesikeleinschlüsse und Transportproteine kontrolliert über die Membran ausgetauscht (vgl. Abb.18). Im Zellkontaktbereich im Gewebe findet der Ionen- und Molekültransport über den passiven parazellulären Transportweg, über die Tight Junctions, statt (siehe Abb.17: (2)). Die Tight Junctions (TJ)

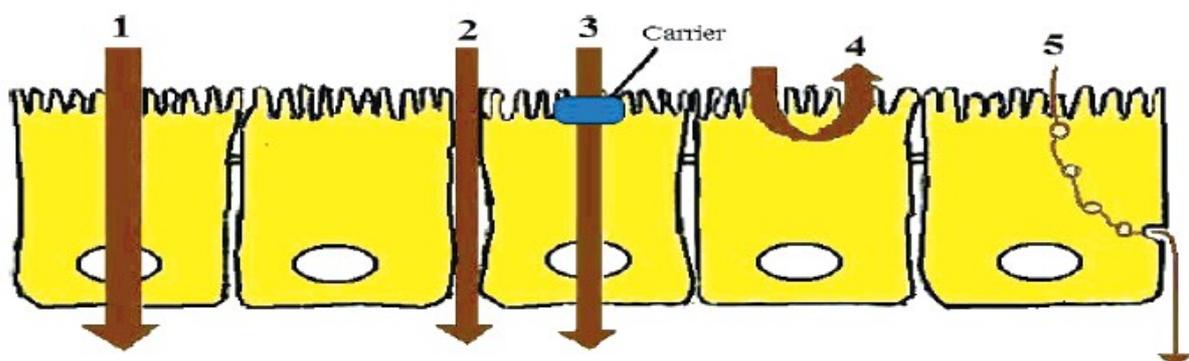


Abbildung 17: Schematische Darstellung verschiedener Transportmechanismen eines dichten Zellrasens: (1) passiver transzellulärer Transport; (2) passiver parazellulärer Transport; (3) auf sog. Carriern basierender Transport (4) auf Carriern basierender Ausfluss; (5) auf Vesikel basierender Transport [20]

umgeben netzförmig die apikale Zellmembran, die den interzellulären Spalt schließt, wodurch sich die epitheliale Polarität ausbildet [21]. Die Polarität äußert sich in einer statischen Spannung zwischen apikaler und basaler Gewebeseite des dichten Zelllayers. Sie lässt sich aus den beteiligten Ionensorten und den Konzentrationen aus der Nernst-Gleichung (Gl.40) bzw. Goldman-Gleichung berechnen. Die an der jeweiligen Membran auftretende Spannung zwischen Extra- und Intrazellärmedium addiert sich zu einer Gesamtspannung zwischen apikaler und basaler Seite der Zelle im Gewebe.

$$U_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{\#Ion_{extra}}{\#Ion_{intra}} \right) [V]$$

Gl. 40: Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Impedanz

R[J/Kmol]... Gaskonstante
 #Ionen Anzahl Ionen
 T[K]... Temperatur
 z... Wertigkeit
 F[C/mol] Faradaykonstante

In einer lebenden Zelle hat Kalium, im Vergleich zu allen anderen Ionen, die höchste intrazelluläre Konzentration. Berechnet man, das sich allein durch Kalium ergebende, Diffusionspotential mit Gleichung 40, zwischen Intra- und Extrazellulärseite ergibt sich eine Spannung von $U_{eq}(K^+ \text{ Ion})=70\text{mV}$. Insgesamt beträgt die Spannung zwischen apikaler und basaler Gewebeseite etwa -130mV [22].

Ion	Zytoplasma c[mmol/l]	Extrazellular Medium c[mmol/l]
Na ⁺	10	150
K ⁺	140	5
Ca ²⁺	0	1
Cl ⁻	5	100
H ⁺ bzw. H ₃ O ⁺	6,3*10 ⁻⁵ oder ph 7,2	4*10 ⁻⁵ oder ph 7,4

Tabelle 2: Typische Ionenkonzentration von Säugetier-Zytoplasma und Extrazellulärmedium; Die wahren Konzentrationen im Zytoplasma variieren mit den Konzentrationen des Extrazellulärmediums und dem Lebenszyklus der Zelle.[23]

Äquivalenzschaltkreis der Zelle:

In dieser Arbeit werden vorerst vereinzelt Caco-2-Zellen ausgesät, die sich im Laufe der (Mess-)Zeit vermehren bis sie einen konfluenten Zellmonolayer bilden. Während der gesamten Zeit werden kontinuierlich impedanzspektroskopische Messungen gemacht.

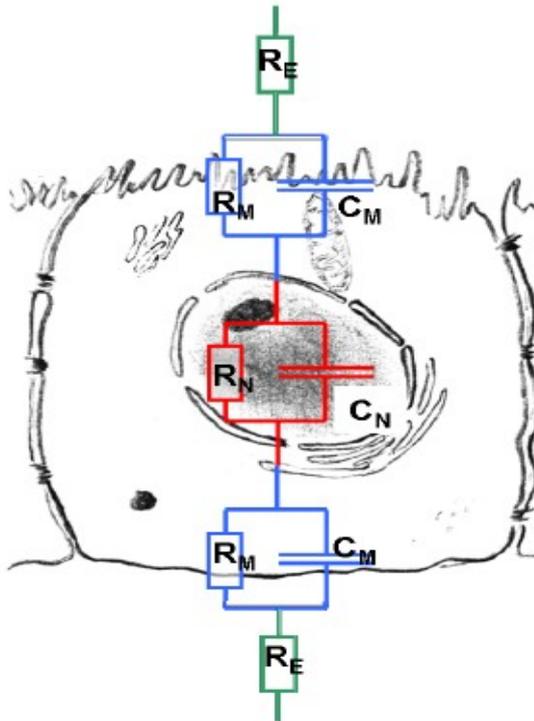


Abbildung 18: Beispiel eines Äquivalenzschaltkreises einer einzelnen Epithelzelle; tiefgestellte Indizes bedeuten: M...Membran, N...Nukleus, E...Elektrolyt [1]

Das elektrische Verhalten von Caco-2-Einzelzellen wie auch das eines konfluenten Caco-2-Zellmonolayers kann über einen sogenannten Äquivalenzschaltkreis modelliert werden. Dabei werden unterscheidbaren Ladungsflüssen und/oder Verschiebungsströmen durch die Zelle bzw. das Zellgewebe, die von selbst oder durch ein von außen angelegtes Wechselfeld hervorgerufen werden, einfache elektrische Bauteile zugeordnet. So können die elektrischen Eigenschaften von Epithelzellen durch eine Reihung von Ohmschen Widerständen und Kapazitäten wie in einem Schaltplan modelliert werden (vgl. Abb.18).

Die Zellmembran ist eine Doppellipidschicht. Sie ist fluide und trotzdem stabil, sie dient allen eukaryotischen Zelltypen als abgrenzende Membran. Elektrisch verhält sie sich aufgrund der spezifischen Anordnung der Lipide, wie ein Kondensator. Der

Widerstand der den Ionenströmen durch die Zellmembran entgegenwirkt kann in erster Näherung als ohmscher Widerstand angenommen werden [24].

Abbildung 19 zeigt das Äquivalenzschaltbild des transzellulären Anteils einer Caco-2-Einzelzelle nach [1].

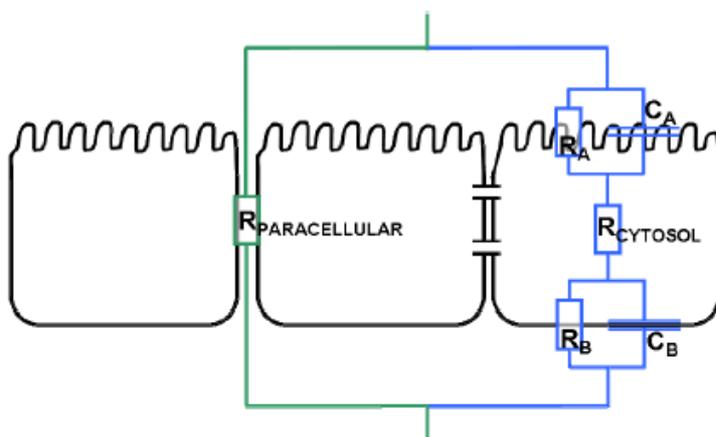


Abbildung 19: Äquivalenzschaltkreis eines Caco-2-Monolayers; nach [1]

Bei genauerer Betrachtung müßten die elektrischen Eigenschaften der apikalen von der basalen Zellmembran unterschieden werden, da die Ionenströme entlang den entsprechenden ohmschen Widerständen jeweils verschieden ausgeprägt sind.

Im Epithelgewebe reihen sich die einzelnen Zellen dicht aneinander und bilden so einen konfluenten Zellrasen. An

den Kontaktstellen verbinden sich Einzelzellen an ihren Rändern über verschiedene Kontaktarten mit Nachbarzellen. Diese verschiedenartigen Kontakte, wie z.B. Tight Junctions, regeln den Ionenstrom über den parazellulären Transportweg. Zwischen apikaler und basaler Gewebeseite entsteht eine solide Barriere, sodass Ionen nicht mehr wahllos die Gewebeseite wechseln können, sondern nur mehr kontrolliert ausgetauscht werden. Die Polarisation tritt bei konfluentem Gewebe durch eine elektrische Spannung zwischen der apikalen und der basalen Gewebeseite in Erscheinung. Im Gegensatz zur Einzelzelle, besteht der Äquivalenzschaltkreis eines Zellgewebes nun aus einem transzellulären und einem parazellulären Anteil. Die von den Zellkontaktstellen kontrollierten Ionenströme des parazellulären Transportweges können in erster Näherung durch ohmsche Widerstände modelliert werden (vgl. Abb.20).

Wie dieser Äquivalenzschaltkreis genau aussieht, ist meistens der Realität der Messergebnisse angepasst. Im frequenzabhängigen Impedanzspektrum zeigt sich für ein Schaltbild, wie in Abbildung 20, gesamtlich ein Hochpassverhalten. Dies ist hauptsächlich auf die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran zurückzuführen. Das frequenzabhängige elektrische Verhalten von Caco-2-Einzelzellen und Caco-2-Gewebe wird in dieser Arbeit untersucht, sodass (in weiterer Folge) der Transport über verschiedene Transportwege mit elektrischen non-destruktiven Methoden untersucht werden kann.

1.6.3 IS an lebenden Caco-2-Zellkulturen in vitro

In vielen technischen Bereichen findet die Impedanzspektroskopie (IS) Anwendung. Sie stellt ein leicht zugängliches Instrument zur Charakterisierung elektrischer und elektrochemischer Systeme dar. Die IS lässt Aussagen über im Inneren ablaufende Prozesse zu, wie z.B. über Stoffumsätze bei Korrosion oder Bauteilbestimmung eines vorerst unbekanntem elektrischen Schaltkreises. Anwendungen mit biologischem Hintergrund finden sich seit H. P. Schwans (ca. 1960) dielektrischen Gewebeuntersuchungen umso mehr heute. Der in dieser Arbeit interessierende Aspekt befasst sich mit dem Aufwachsen von Zellen auf Micro-Chip-Devices. Dabei werden Leiterbahnen und Elektroden von maximal 200nm Dicke lithographisch auf ein Glassubstrat aufgebracht. Eine im Dezember 2009 veröffentlichte Studie vergleicht die Sensibilität der Impedanzmessung bei 4kHz in Abhängigkeit des Elektrodenradiuses. Dabei wurden auf kreisrunde Pt-Elektroden Caco-2-Zellgewebe aufgewachsen und als Ergebnis wurde ein optimaler Elektrodenradius von 200µm [25] bestimmt.

In den Arbeiten von M. Hufnagel [1] und M. Fischender [2] wurden Caco-2-Zellen auf Micro-Chip-Devices aufgewachsen und IS-Messungen durchgeführt. In beiden Arbeiten zeigte sich zeitliche Änderungen im Impedanzspektrum mit zunehmender Zellbedeckung der Mikrochipoberfläche

Die Messung der Impedanz von Zellkulturgewebe hat sich in der Pharmazie zur Analyse der Konfluenz einer Zellschicht schon in Form der Messung des TEER (transepithelial electrical resistance)-Werts etabliert. Er ist der transepithelial gemessene Absolutbetrag der Impedanz bei 12,5Hz. Ein hoher TEER-Wert ($>400 \Omega \times \text{cm}^2$) indiziert dabei eine konfluente Zellschicht [17]. Man geht davon aus, dass mit dem Zusammenwachsen der Zellen zu einem konfluenten Gewebe die Tight Junctions zunehmend den freien Ionenstrom zwischen

apikaler und basaler Gewebeseite hemmen bzw. kontrollieren und somit die Impedanz der Gewebeschicht steigt. Im höheren Frequenzbereich, dort wo die Strecke der Ionen, die sie pro Halbperiode zurücklegen kurz ist (vgl. Hüpfleitung), fällt die Impedanz ab. Die Ursache für das Hochpassverhalten sind die hohen Kapazitätswerte der Zellmembran.

1.7 Permeation Enhancer in der IS

Mit den Ionenströmen durch das Zellgewebe studiert man gleichzeitig deren Stoffwechsel und somit auch den Transport von pharmazeutischen Wirkstoffen. Mit „Ussing Chambers“, lässt sich neben der IS-Messung auch die Membranspannung zwischen apikaler und basaler Gewebeseite bestimmen. Inzwischen gelingt es Forschergruppen verschiedene Transportwege der Zelle (vgl. Abb.17) mit der „high-resolution conductance scanning technique“[26], der sogenannten 2-Weg-Impedanzspektroskopie, zu unterscheiden. In der Arzneimittelpalette findet man Wirkstoffe, so genannte Permeation Enhancer (PE), die bekanntermaßen die Tight Junctions öffnen und so allein den parazellulären Ionenstrom erhöhen. PE werden in der 2-Weg-IS eingesetzt um verschiedene Transportwege durch das Gewebe zu stimulieren und so für die Messung unterscheidbar zu machen. In dieser Arbeit werden PE eingesetzt, um die IS-Messergebnisse direkt auf die Morphologie der Caco-2-Zellgewebeschicht zurückführen zu können (vgl. Kap.4.4.4.4). Dabei wird ein PE der RPMI-Nährlösung beigemischt, der Caco-2-Zellkultur zugeführt und die Auswirkungen im Impedanzspektrum beobachtet. Neben der Beobachtung mit Hilfe von elektrischen Messmethoden werden mikroskopische (optische)Aufnahmen gemacht.

2. Experimenteller Aufbau

Das Hauptthema dieses Kapitels ist die Darstellung des Messsystems. Daneben wird die Zusammensetzung, der für das Kultivieren von Caco-2-Zellkulturen benötigten RPMI-Nährlösung angeführt. Es werden die einzelnen Systembestandteile des Messsystems beschrieben und deren Verwendungsweise erklärt. Der Messaufbau knüpft an ein bereits bestehendes System an, daher werden manche Systembestandteile nur im Überblick behandelt und an der jeweiligen Textstelle eine genauere Beschreibung referenziert.

Der experimentelle Aufbau dient im Weiteren zur kontinuierlichen Feststellung der Impedanz, von auf der Chipoberfläche adhärend haftenden und sich im Zuge der Zellvermehrung zu einem konfluenten Gewebe verdichtenden, Caco-2-Zellen. Das elektrische Messsystem arbeitet die Aufgaben während der Messtätigkeit völlig automatisch ab, während eine integrierte Nährlösungsversorgung die Zellkulturen kontinuierlich mit Nährstoffen versorgt. Der Aufbau ermöglicht eine vollständig automatisierte Aufnahme transepithelialer Impedanzspektren von Caco-2-Einzellen und des entlang der Zellvermehrung konfluenter werdenden Caco-2-Gewebes über zumindest 24 Messtage.

2.1 Struktureller Aufbau des Messsystems

Abbildung 21 gibt einen schematischen Überblick über den gesamten experimentellen Aufbau. Dieser besteht aus 5 Komponenten, die über verschiedenartige Schnittstellen miteinander in Verbindung stehen. Die erste Komponente ist ein PC. Auf dem PC arbeitet ein LabVIEW-Programm, das eine Steuersoftware für die Funktionen des MUX und des LCR-Meters beinhaltet. LabVIEW greift über eine digitale USB- bzw. GP-IP-Schnittstelle auf diese (Komponenten) zu. LabVIEW automatisiert den Ablauf der elektrischen Messung und übernimmt die Messdatenspeicherung. Die zweite Komponente ist das LCR-Meter, das das Messgerät und der Signalgenerator der impedanzspektroskopischen Messung ist. Für den 4-Punkt-Messbetrieb hat es 4 BNC-Buchsen die Signal/Mess - Aus/Eingänge bilden. Über eine analoge Signalweiterleitung durch 4 Koaxialkabel ist das LCR-Meter mit der dritten Komponente, dem Multiplexer (MUX), verbunden. Der MUX ist ein von LabVIEW über eine USB-Schnittstelle gesteuerter Relais-tower. Die Aufgabe des MUX ist

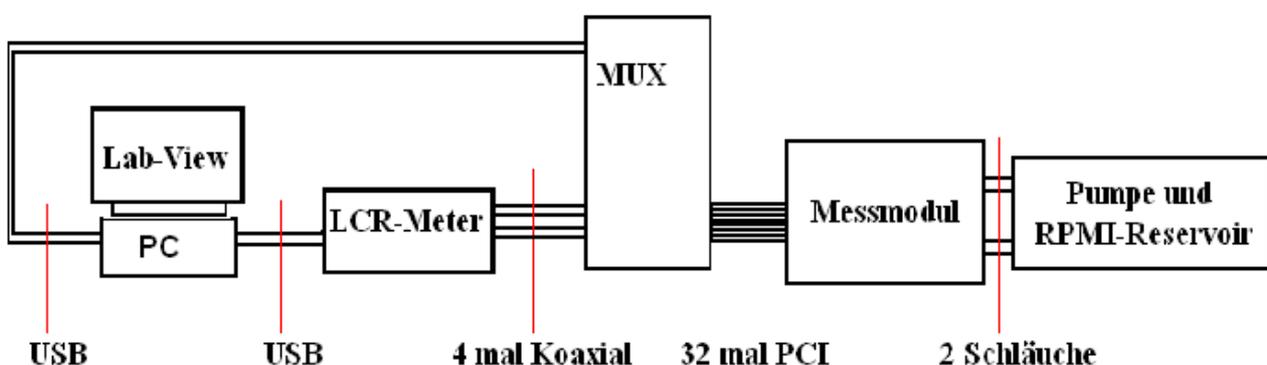


Abbildung 20: Schematische Darstellung des gesamten Messsystems. Dargestellt sind die fünf funktionellen Komponenten, die über verschiedenartige Schnittstellen miteinander verbunden sind.

das Umschalten der Signalleitungen auf die Elektroden im Messmodul. Die vierte Komponente ist das Messmodul. Das Messmodul besteht im Wesentlichen aus 8 Zellkulturkammern, die jeweils mit 4 Elektroden ausgestattet sind. In jeder dieser Zellkulturkammern können transepitheliale Gewebeimpedanzen an den Elektroden festgestellt werden. Durch Zellkulturkammern des Messmoduls strömt kontinuierlich RPMI-Nährmedium. Dabei wird das RPMI-Medium durch Kanäle in die Zellkulturkammern gepresst und mit einem RPMI-Nährlösungs-Reservoir über Schläuche ausgetauscht. Die Schlauchquetschpumpe und das Nährlösungsreservoir bilden die letzte Komponente.

2.2 Das Messmodul

Das Messmodul dient dem Kultivieren von Caco-2-Zellen. Andererseits befinden sich im Messmodul Elektroden, an denen die Caco-2-Gewebeimpedanz festgestellt werden kann. Das Messmodul ist die Komponente des Messsystems, welche Kontaktflächen zur Zellsuspension hat und deren Baumaterialien somit den biologischen Ansprüchen (Biokompatibilität) genügen müssen. Das Messmodul besteht aus drei grob abgrenzbaren Bauteilen. Diese sind ein Chip, das FlexiPERM und die Topielektroden-Decke. Diese Abgrenzung ist unter anderem bei der Reinigung des Messmoduls vor einer Messung an biologischen Proben (Bioimpedanzmessung; vgl. Kap.4) hilfreich. Im Folgenden wird die Funktion dieser 3 Bauteile kurz umrissen und in darauf folgenden Unterkapiteln genauer beschrieben.

Ein Chip kann als der Boden des Messmoduls betrachtet werden. Ein Chip besteht aus einem Glasuntergrund auf dessen Oberfläche metallische Mikrostrukturen erzeugt wurden. Die Herstellung der Mikrostrukturen

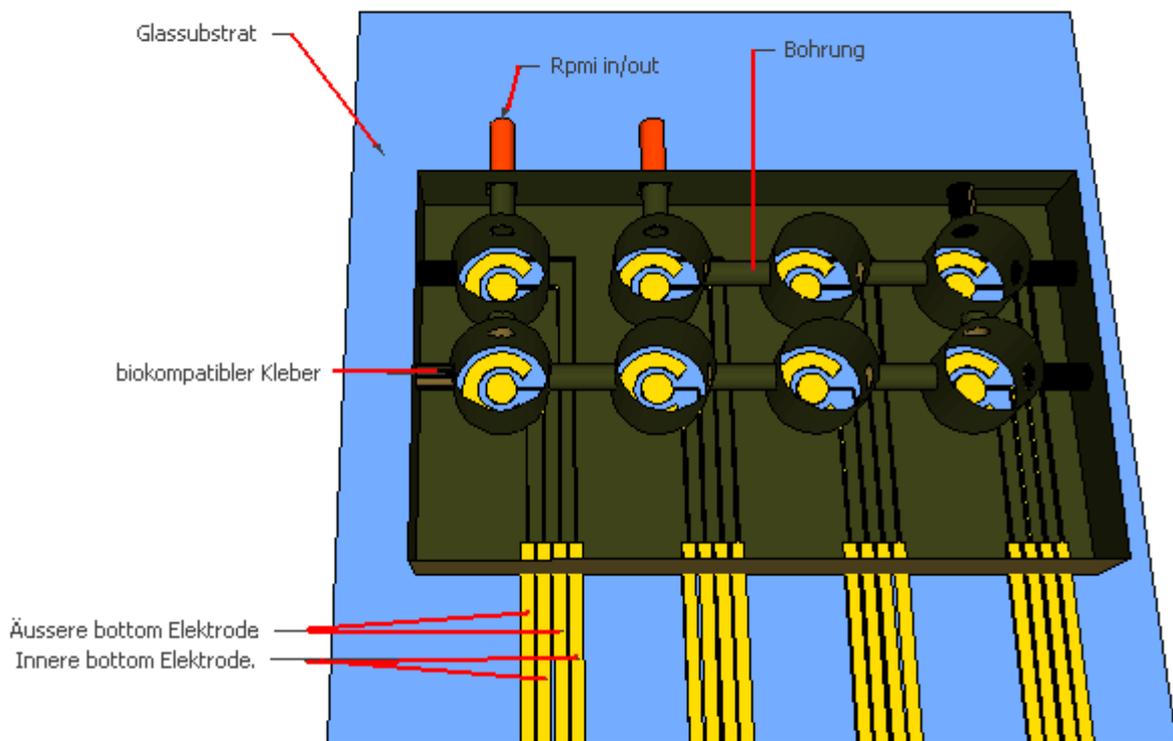


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines horizontalen Schnitts durch das Messmodul. Die grünen Abgrenzungen schematisieren das FlexiPERM. (Die Top-Elektroden-Decke des Messmoduls ist nicht dargestellt.)

findet im Reinraum statt. Dabei werden mit einem fotoempfindlichen Lack Elektroden und andere Leiterstrukturen auf einem Borosilikat-Glassubstrat (Fläche: 5cm mal 5cm) erzeugt. Diese Strukturen von einer Dicke von 200nm (über der Glasoberfläche) können von Caco-2-Zellen überwachsen werden. Im Rahmen der Messtätigkeiten dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Chiptypen verwendet der „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ und der „IDES-Chip“ genannt werden. Sie unterscheiden sich durch die räumliche Anordnung der Elektroden voneinander. Mit beiden Chiptypen können im Messmodul 4-Punkt-Messungen durchgeführt werden. Ein Chip stellt 8 unabhängige Sensorflächen bereit, die von je zwei Bottom-Elektroden gebildet und von den Zellkulturkammern des FlexiPERMs begrenzt werden.

Auf der Chipoberfläche haftet das FlexiPERM. Das FlexiPERM ist eine Zellkulturkammer aus Silikon. 8 dieser Zellkulturkammern begrenzen die 8 Sensorfelder auf der Glasoberfläche des Chip. Abbildung 21 zeigt einen ein Schnitt durch das Messmodul. Gezeigt werden die Zellkulturkammern des FlexiPERMS und der Chip. Die Seitenwände der Zellkulturkammern des FlexiPERMS werden von Bohrungen durchstoßen. Diese Bohrungen bilden Kanäle durch die das Kulturmedium zirkulieren und mit einem externen (RPMI-) Reservoir, das über RPMI-In/Out-Düsen und zwei Schläuche erreicht wird, ausgetauscht werden kann.

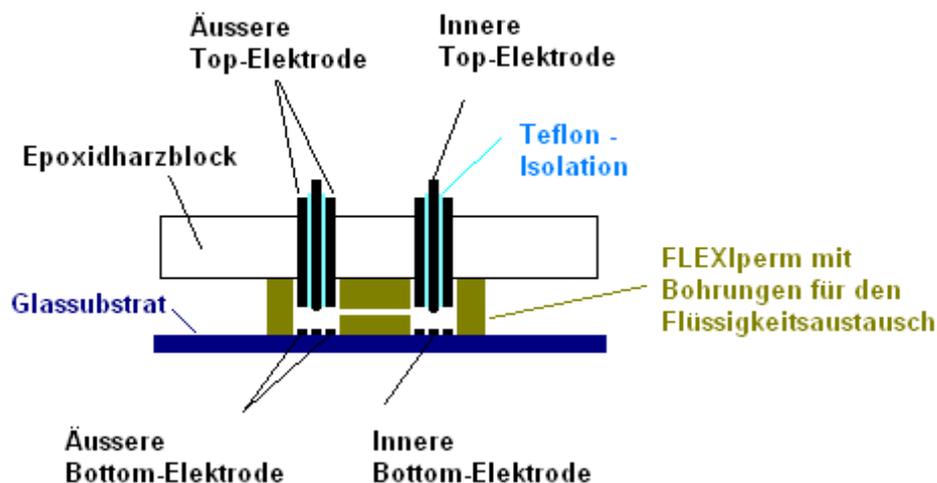


Abbildung 22: schematische Darstellung eines vertikalen Schnitts durch das Messmodul. Die eingezeichneten Bottom-Elektroden sind Bestandteile des „Chips mit ringförmigen Elektroden“.

Das dritte und letzte Bauteil des Messmoduls, ist die so genannte Top-Elektroden-Decke. Sie besteht aus den so Top-Elektroden, die in einem Epoxidharzblock fixiert sind (vgl. Abb.22). Den kreisförmigen Querschnittsflächen der zylinderförmigen zweipoligen Top-Elektrode(n) stehen die Sensorflächen auf dem Chip, die je von zwei Bottom-Elektroden gebildet werden, in 2mm Abstand gegenüber. Die Top-Elektroden-Decke schließt die Zellkulturkammern des FlexiPERMs oberhalb und stellt damit anschaulich die Decke des Messmoduls dar.

Der Chip, das FlexiPERM und die Top-Elektroden-Decke werden durch eine Halterung zueinander fixiert und teilweise an deren Berührungsflächen mit Mikroset [27] miteinander verklebt.

2.2.1 Der Elektroden-Chip

Der Chip ist wesentlicher Bestandteil des Messmoduls und damit der Messung der Gewebeimpedanz. Auf seiner Oberfläche befinden sich die Bottom-Elektroden. Die Chip-Herstellung findet im Reinraum statt. Ein Chip besteht aus einem Glassubstrat-Untergrund auf dessen Oberfläche mit einem lichtempfindlichen Lack feinste planare metallische Strukturen erzeugt wurden. Im Vorfeld der Herstellung der Mikrostrukturierung auf der Glasoberfläche werden die Elektroden- und Leiterbahnstrukturen am Computer im Programm AutoCAD entworfen und die entsprechende Lithographie-Maske hergestellt. Die Masken bestimmen die Struktur der Elektroden und anderer Leiterstrukturen (sowie die einer Isolationsschicht) auf der Chipoberfläche.

Im Folgenden wird die Herstellung des Chips beschrieben und die zu seiner Herstellung notwendigen Prozesse, Materialien und Geräte werden vorgestellt. Diese Anleitung gilt streng nur für den „Chip mit den ringförmigen Elektroden“. Die Herstellung des IDES-Chip wird in der Arbeit von [2] ausführlich behandelt. Eine Beschreibung des IDES-Chip ist diesem Kapitel angehängt. Die metallischen Elektroden des „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ werden entweder aus Gold oder aus Platin gefertigt.

2.2.1.1 Materialien zur Mikrostrukturherstellung

Im Folgenden sind die Materialien, die in dieser Arbeit zur Herstellung der Chips verwendet werden, kurz beschrieben.

- AZ5214 ist ein lichtempfindlicher Lack, der abhängig von der Art des Prozesses als positiv Lack, wie auch als Umkehrlack („image reversal“) verwendet werden kann.
- MIF726: Ein Entwickler für Fotolacke, der nach Belichten des Lackes im Maskalinger (siehe Kap. 2.2.1.2) zur Strukturierung der Lackoberfläche verwendet wird. Damit werden jene Lackbereiche im Entwickler selektiv gelöst, die durch den Belichtungsprozess definiert wurden.
- Aceton: Ein Lösungsmittel, dass für den Liftoff- sowie für Reinigungsprozesse der Substrate verwendet wird.
- Isopropanol: Ein einwertiger Alkohol, der als Lösungsmittel dient. Nach Reinigungsprozessen mit Aceton wird Isopropanol verwendet, um Acetonrückstände zu entfernen.
- Destilliertes Wasser - dient als Reinigungsmittel und wird auch zum Spülen nach dem Entwickeln verwendet, um Entwicklerreste zu entfernen.
- Stickstoff wird verwendet um Oberflächen nach einem naßchemischen Prozess staubfrei zu trocken.
- Cr-Ätze: Eine anorganische Ätz-Mischung, die verwendet wird, um Chrom naßchemisch zu entfernen.

Reaktive Gase werden beim Trockenätzen (RIE), sowie bei der Abscheidung (PECVD) von Isolatorschichten eingesetzt. Beim Sputtern wird ein Inertgas verwendet. Als Prozessgase werden folgende Gase verwendet:

- Argon: Ein Inertgas, das zum Zünden des Plasmas in der Sputteranlage verwendet wird.
- Silan und Ammoniak: 2 Gase, die als Precursor bei der CVD-Abscheidung eingesetzt werden. Sie dienen der Herstellung des Siliziumnitrids beim PECVD-Prozess.
- Schwefelhexachlorid, wird als Lieferant für das trockenchemische Fluor-Ätzen eingesetzt. SF_3 wird als Gas für das (RIE-) Ätzen von Siliziumnitrid eingesetzt.

2.2.1.2 Geräte zur Mikrostrukturherstellung

Im Folgenden sind die Geräte, die in dieser Arbeit zur Herstellung der metallischen Mikrostruktur der Chips verwendet werden, kurz beschrieben.

- Spinner: Der Spinner besteht aus einer Metallplatte, auf der eine Probenplatte angesaugt und somit fixiert werden kann. Die Metallplatte bzw. die Probenplatte dreht sich unter vorher definierter Drehzahl für eine bestimmte Dauer um die Mittelpunktsachse. Mit dem Spinner werden durch schnelles Drehen die zur Lithographie benötigten Lacke dünn auf die Probenoberfläche aufgebracht.
- Maskalinger (Karl Süss MJB3 Maskaligner): Der Maskalinger besteht aus einem Mikroskop und einem Belichtungsgerät. Die mit dem Spinner dünn mit Lack überzogene Probenoberfläche wird unter dem Mikroskop positioniert. Nach Festlegen der Belichtungszeit, der Leistung der Belichtung [W] und dem Einbringen der die Mikrostruktur bestimmenden Maske, wird UV-Licht durch die Maske auf den UV-Licht empfindlichen Lack gestrahlt. Der Lack reagiert mit dem einfallenden UV-Licht und ist nun von den nicht belichteten Stellen chemisch unterscheidbar.
- Sputterer (Ardenne LS 320 S Sputter System): Beim Sputtern werden dünne Schichten aus Metall auf eine Probenoberfläche aufgebracht. Bei diesem Prozess werden durch Edelgasplasma Argon-Ionen gegen ein Metalltarget beschleunigt und die aus dem Target geschlagenen Metallatome auf der Probenoberfläche deponiert.
- „Plasma enhanced chemical vapour deposition“ (PECVD): Wird auch als plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung bezeichnet. Durch Zersetzung in einem HF-Plasma können aus verschiedenen Gasen feste Materialschichten auf eine Oberfläche abgeschieden werden. Um in dieser Anlage Nitrid als Isolationsschicht abscheiden zu können, müssen Silan und Ammoniak als Prozessgase verwendet werden.
- „Reactive ion Etching“ (RIE): Beim plasmaunterstützten Ätzen werden mit Hilfe von Argon und Schwefelhexafluorid Materialien mit Siliziumgehalt (Si_3N_4 und auch das Borosilikatglassubstrat) die nicht mit Lack bedeckt sind, geätzt. Die Ätzprodukte sind auch gasförmig.

2.2.1.3 Prozess zur Mikrostrukturherstellung

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene mikro-strukturierte Elektrodenanordnungen verwendet. Der nun im Folgenden beschriebene Herstellungsprozess gilt streng nur für die ringförmigen Chip-Elektroden. Die für die Mikrostrukturierung des IDEs-Elektroden-Chip benötigten Masken werden der Vollständigkeit halber in Abbildung 25 und Abbildung 26 illustriert. Im Folgenden wird der Prozess, der im Großen und Ganzen von [28] übernommen wurde, in chronologischer Reihenfolge dargestellt. Zur Veranschaulichung wird der Prozessfortschritt von schematischen Graphiken mit Höhenschichtlinien begleitet, wobei die jeweils neu hinzukommende Schicht im dazugehörigen Text unterstrichen wurde.

- (1) Vorreinigung: Das Glassubstrat wird mit destilliertem Wasser gewaschen und mit N₂ getrocknet



- (2) Haftbeschichtung: Chrom wird aufgesputtert; 15sek. bei 100W (das ergibt eine 16-20nm dicke Cr-Schicht; so haftet der Fotolack, wo er sonst auf der reinen Glasoberfläche nicht haften würde.

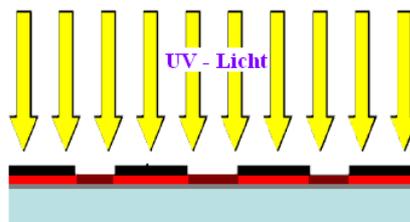


- (3) Belackung: Lack AZ 5214E wird aufgesponnen; Risetime=4sek., Dauer=25sek. bei 3500rpm; resultierende Dicke der Lackschicht (gemäß dem Datenblatt) =1,5µm



- (4) Softbake auf Heizplatte; 50sek. bei 120°C, zur Entfernung der Lösungsmittelreste.

- (5) Strukturbelichtung durch MJB3 Maskalinger mit 200W für 7,25sek.; Bei Anpressen der Maske (vgl. Abb.23) sollten die sich an der Grenzfläche Lack/Maske bildenden Fresnellringe einen Abstand von 1-2mm haben.



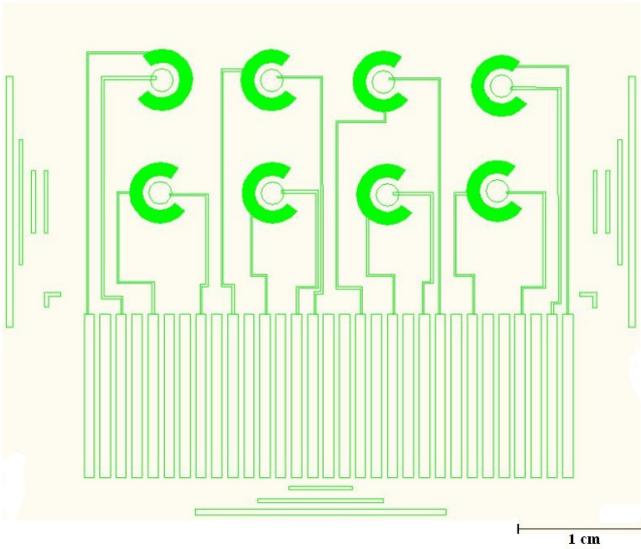


Abbildung 23: Kopie des AutoCAD-Files der Maske für die ringförmigen-Bottom-Elektroden; Die äussere der Bottom-Elektroden ist jeweils voll eingefärbt. Die Linien am Rand helfen beim Positionieren der Maske über der Probenplatte (unter dem Mikroskop des Maskalingers).

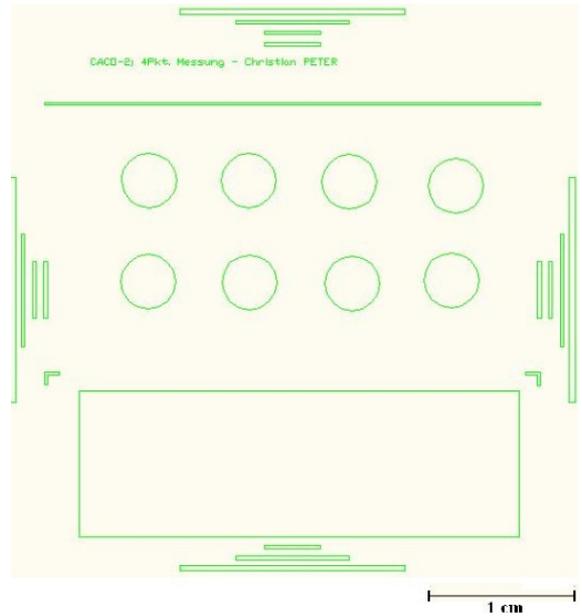


Abbildung 24: Kopie des AutoCAD-Files der Maske der Isolationsschicht, der ringförmigen Elektroden.

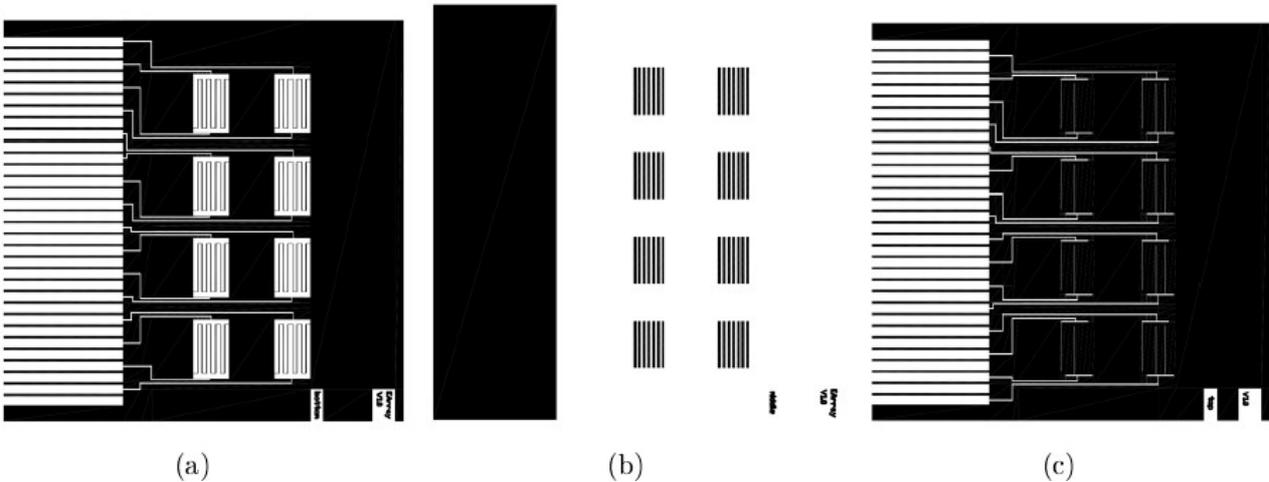


Abbildung 25: Maske für den IDES-Elektroden-Chip: (a) Messelektroden (b) Isolationsschicht und (c) Signalelektroden [2]

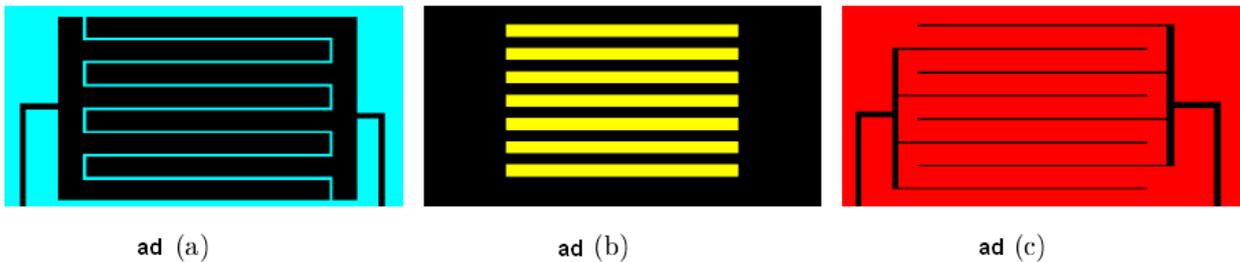
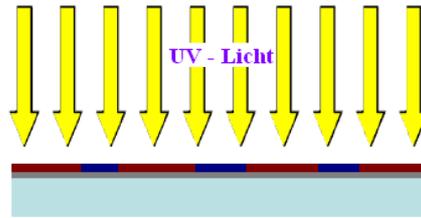


Abbildung 26: Detaillierte Ansicht (von Abb.25) der Sensorfläche des IDES-Elektroden-Chip mit den Schichten der Messelektrode (a), der Isolationsschicht (b) und der Signalelektrode der Probenplatte (c) [2].

(6) Reversalbake auf der Heizplatte; 50sek. bei 120°C

(7) Flutbelichtung mit MJB3 Maskalinger (200W) ohne Maske für 60sek.



(8) Entwicklung im Entwicklerbad MIF 726, bis nur mehr der durch Strukturbelichtung entstandener Teil übrig bleibt; Dauer zwischen 40-100sek.

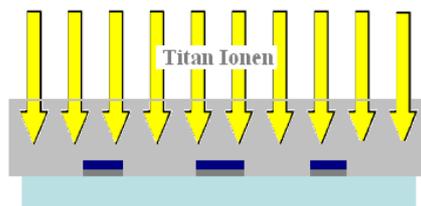


(9) Mikroskopische Qualitätskontrolle der Leiterbahnen

(10) Ätzung der Metallbahnen: Chrom ätzen, solange bis nur mehr die Leiterbahnen auf dem Glassubstrat sichtbar sind. Anschließend mit deionisiertem Wasser spülen und mit Stickstoff trocknen.



(11) Metallhaftschiicht: Sputtern der Ti-Schicht; 50sek. bei 100W (resultierende Schichtdicke ca. 100nm)



(12) Metallisierung: Sputtern der Goldsicht; 30sek. bei 100W (Schichtdicke ca. 100nm) oder von Platin; 2 mal 45sek. bei 50W (resultierende Schichtdicke: 90nm)



(13) Lift-Off des Resists im Acetonbad (Ultraschall darf bei der gegebenen Schichtdicke nicht verwendet werden); danach Reinigung im Isopropanolbad und abschließende Trocknung mit Stickstoff.



(14) Chromschicht-Ätzung: Entfernung des freiliegenden Chroms; dann Spülung mit deionisiertem Wasser und Trocknung mit Stickstoff.

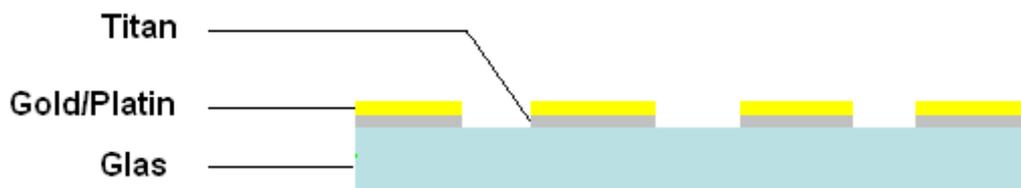


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Chips mit den ringförmigen Elektroden: Schnitt durch das Glassubstrat mit lithographisch erzeugten Goldelektroden. Schichtdicken: Pt:90nm, Au:100nm, Ti:100nm und Glassubstrat: 1mm

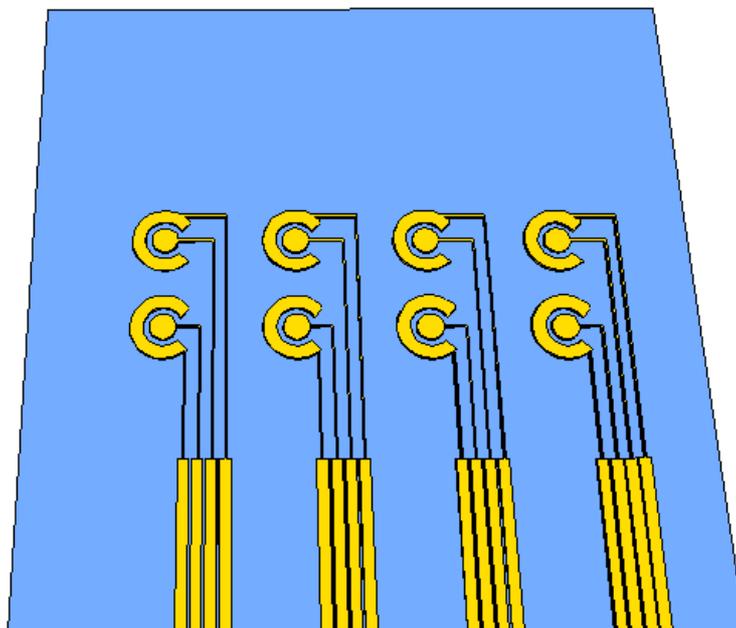


Abbildung 28: Schematische Darstellung eines Chips mit ringförmigen Goldelektroden (keine Isolationsschicht).

(15) Falls auf eine Isolationsschicht verzichtet wird, ist die Mikrostrukturherstellung nun beendet.

Isolationsschicht, des Chip mit den ringförmigen Elektroden: Der ganze Chip (siehe Abb.28) wird mit einer SiN_x-Isolationsschicht überzogen, nur die Elektroden und die Pins werden von der Isolationsschicht durch reaktives Ätzen und durch Verwenden der Maske, die in Abbildung 24 dargestellt ist, wieder befreit. Die Isolationsschicht wurde aber beim Chip mit den ringförmigen Elektroden weggelassen. Beim Chip mit den IDEs-Elektroden (siehe Kap.2.2.9), ist die Isolationsschicht ein fixer Bestandteil des Prozesses.

Im Folgenden wird die Herstellung der Isolationsschicht beschrieben:

- (16) Abscheidung der Si-Nitrid-Schicht mittels PECVD; Prozessparameter: SiH₄=700sccm, NH₃=18sccm, Dauer=32min., Leistung=11W, T=300°C, p=1torr; resultierende Schichtdicke=340-400nm
- (17) Analog zu Prozessschritten (3) bis (8) jedoch mit der Maske für die Isolationsschicht.
- (18) Ätzung: RIE; Prozessparameter: Ar=10sccm, SF₆=20sccm, Leistung=50W, p=50mtorr, p_{base}=5e⁻⁵, Dauer=10min.
- (19) Acetonbad, anschließend ins Isopropanolbad und schlussendlich Trocknung mit Stickstoff

Damit ist der Herstellungsprozess der Isolationsschicht und somit der gesamte Mikrostrukturierungsprozess beendet.

- (20) Schnittkanten schleifen, um den Chip besser in den PCI-Stecker einstecken zu können.

	Glassubstrat	Titan	Gold	Platin
Schichtdicke:	1mm	100nm	100nm	90nm
	Innere (Bottom) -Elektrode		Äußere (Bottom) -Elektrode	
Flächige Ausdehnung:	Durchmesser Kreis: 900µm		Durchmesser innerer Ring: 3mm ... äußerer Ring: 4mm	

Tabelle 3: Abmessungen und Schichtdicken beim „Chip mit den ringförmigen Elektroden“: Die Angaben gelten für Platin- sowie für Goldelektroden

Nach all diesen Prozessschritten kann der Chip in die Halterung eingelegt und durch einen PCI-Stecker kontaktiert werden. Neben dem eben beschriebenen Chip mit den ringförmigen Elektroden (vgl. Abb.28), findet noch der IDEs-Chip bei Bioimpedanzmessungen Verwendung.

2.2.1.4 Der IDES-Chip

Der zweite Chiptyp der im Rahmen dieser Arbeit zu Messung der Gewebeimpedanz verwendet wird ist der so genannte IDES-Chip. Der Interdigitated Electrical Sensor-Chip besteht wie der Chip mit den ringförmigen

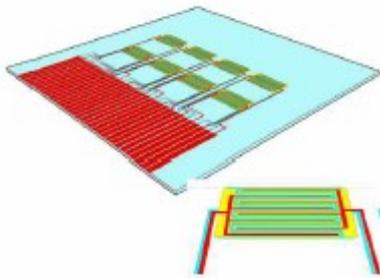


Abbildung 29: Schematische Darstellung des IDES-Chip; Im Vordergrund ist eine der 8 Sensorflächen vergrößert dargestellt. [2]

Elektroden aus 8 Sensorflächen. Jede Sensorfläche hat 2 kämfförmige übereinandergeschichtete Strukturen, die von der jeweils gegenüberliegenden Seite ineinander greifen. Jeder Kamm besteht aus 2 Elektroden, die übereinander geschichtet sind und durch eine SiN_x-Isolationsschicht voneinander getrennt sind.

Der Abbildung 30 sind in der Tabelle 4 die Abmessungen des IDES-Chips angehängt. Sie zeigt schematisch den schichtweisen Aufbau der IDES-Struktur. Anhand Abbildung 30 kann auf den lithographischen

Herstellungsprozess geschlossen werden, der sich nicht grundlegend von dem der ringförmigen Elektroden unterscheidet und auch in [2] genau nachgelesen werden kann.

Mit dem IDES-Chip werden 4-Punkt-Messungen in dieser Arbeit derartig durchgeführt, dass je nur ein Kamm einer Sensorfläche am Messvorgang beteiligt ist. Je eine untere Elektrode der IDES-Struktur wird als Signalelektrode und die obere Elektrode des gleichen Kamms als eine Messelektrode geführt. Anschaulich bedeutet das, dass jeweils nur jeder zweite Finger der, in Abbildung 29 im Vordergrund gezeigten, Sensorfläche am Messvorgang beteiligt ist.

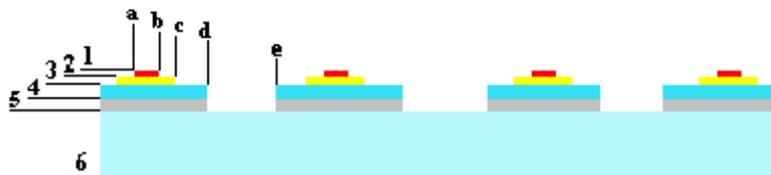


Abbildung 30: Schematische Darstellung eines Schnitts (Höhenschichtlinien) durch den IDES-Chip.

	Material/Verwendung	Schichtdicke [nm]	Breite [µm]	
6 - 5	Glassubrat	~1000.000	e-d	50
5 - 4	TiO _x / Haftsicht	511	d-c	100
4 - 3	Pt / Elektrode			
3 - 2	SiN _x / Isolation	270	c-b	100
2 - 1	Pt / Elektrode	310	b-a	50

Tabelle 4: Abmessungen des IDES-Chip

2.2.2 FlexiPERM (mit Kanalsystem)

Das „FlexiPERM (siehe Abb.32) ist eine wiederverwendbare, autoklavierbare Zellkulturkammer aus Silikon. Aufgrund ihrer hochadhäsiven Unterseite ist FlexiPERM auf allen glatten Flächen (Glas, Kunststoff, Folie) einsetzbar [29].

Das FlexiPERM wird im Rahmen dieser Arbeit mit Flüssigkeitskanälen ausgestattet. So werden die Zellkulturkammernseitenwände durch Bohrungen von einem Durchmesser von 4,5mm durchstoßen. Die Bohrungen bilden Kanäle, durch die das RPMI-Medium zirkulieren und über „Düsen“ mit einem externen RPMI-Reservoir ausgetauscht werden kann. Plastikdüsen (RPMI-In/Out-Düsen; vgl. Abb.21) durchstoßen die Außenwände des FlexiPERMS derartig, dass sie die Schnittstelle des RPMI-Flüssigkeitsstroms zwischen Außenraum und Innenraum des Messmoduls bilden. An die RPMI-In/Out-Düsen können Schläuche angeschlossen werden, die im RPMI-Reservoir enden und durch die mit Hilfe der Schlauchquetschpumpe das RPMI-Medium gepresst werden kann. Die Plastik-Düsen werden mit Microset [27] eingeklebt. Nicht alle vom FlexiPERM ausgebildeten Zellkulturkammern (vgl. Abb.31 bzw. Abb.32) werden verwendet, ein sondern nur 8 und der Rest wird abgetrennt.

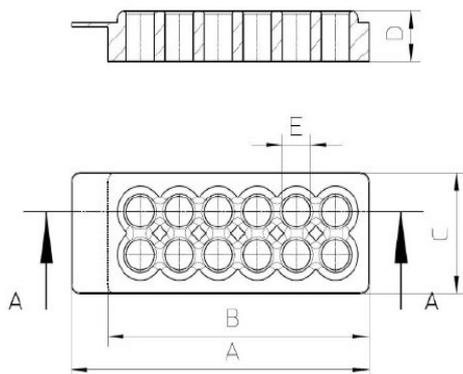


Abbildung 32: Abmessungen des FlexiPERM im Originalzustand [29]

	[mm]
A	68,0
B	60,0
C	25,0
D	10,0
E	6,5



Abbildung 31: Foto des FlexiPERMs im Originalzustand

2.2.3 Top-Elektroden und Top-Elektroden-Decke

Im Messmodul stehen sich die Chipelektroden und die Top-Elektroden in 2mm Abstand gegenüber. Durch die Anwesenheit von Top- und Bottom-Elektroden (Chipelektroden) können mit dem Messmodul transepitheliale Impedanzmessungen durchgeführt werden. Dabei sind die Top-Elektroden auf der apikalen Gewebeseite untergebracht.

Die Top-Elektroden werden aus medizinischem Stahl gefertigt. Dabei entsteht eine zwei polige Elektrode deren Bauform die bipolar genannt wird. Eine bipolare Top-Elektrode besteht aus einem metallischen Stift (Innere Elektrode), der in ein Teflon-Röhrchen gleichen Innen-Durchmessers gedrückt wird. Der Stift mit Teflon Mantel wird dann in einen metallischen Zylinder (äußere Elektrode) mit größerem Innendurchmessers geschoben. Teflon dient dabei der elektrischen Isolation.

In Abbildung 33 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der dem Zellgewebe zugewandten Seite, einer solchen bipolaren Top-Elektrode abgebildet. Das Problem das sich ergibt ist in Abbildung 33 gut zu erkennen. Die Teflonisolation dichtet nicht gegen den Innenrand der äußeren Elektrode ab, sodass bei laufendem Experiment, Nährmedium zwischen Teflonröhrchen und äußeren Zylinder eindringen konnte. Deshalb wurden (vgl. Kap. 4.1.3) die inneren Stift-Elektroden in flüssiges Sylgard [30] eingetaucht und nochmals in den Zylinder eingeschoben.

Sylgard besteht anfangs aus 2 flüssigen Komponenten, die nach dem Härten ein Silikonelastomer bilden. Bei 120°C im Ofen härtet Sylgard innerhalb einer halben Stunde aus und das Leck kann so geschlossen werden. In weiterer Folge wurden die Elektroden abgeschliffen.

Eine Analyse der Sekundärelektronen im SEM (Scanning Electron Microscope), ergab eine Zusammensetzung des Stahls von: in Gewichtsprozent: Fe~61%, Cr~15%, Ni~7%, C~7%.

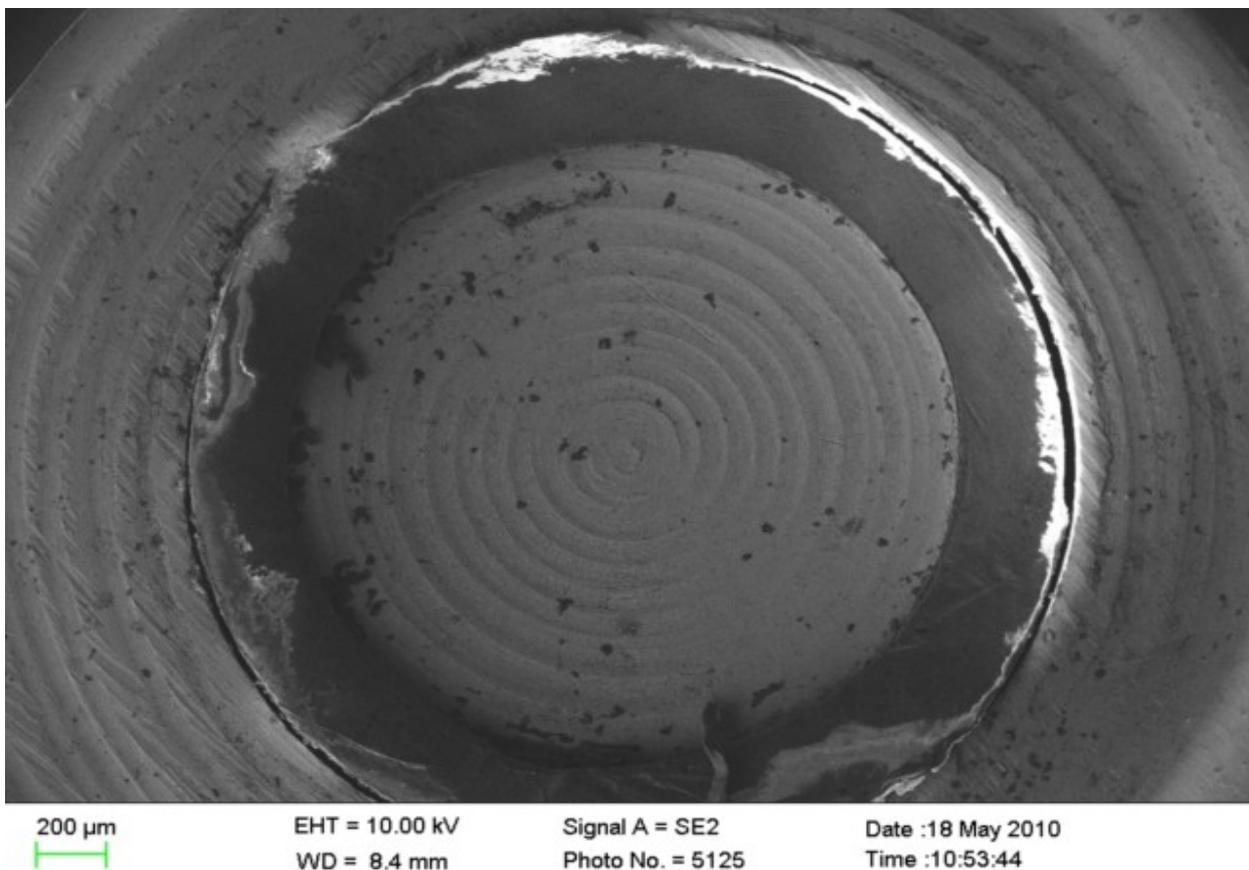


Abbildung 33: SEM-Aufnahme der Top-Elektroden („bipolaren Elektrode“); Zu sehen ist die der Zellkultur zugewandte Seite der Top-Elektrode(n): Ein Edelstahl-Hohlzylinder(äußere Top-Elektrode) umfasst einen zylindrischen Edelstahl-Stift (innere Top-Elektrode), dazwischen befindet sich zur elektrischen Isolation Teflon. Die Leckstelle zwischen äußerer Elektrode und Teflonisolation wurde mit Sylgard geschlossen.

In Tabelle 5 werden die Abmessungen der Top-Elektroden übersichtlich aufgelistet.

	Innendurchmesser [mm]	Außendurchmesser [mm]
Innere Top-Elektrode	-	1,5
Äußere Top-Elektrode	2	3,2

Tabelle 5: Abmessungen der Top-Elektroden

Top-Elektroden-Decke

Die Top-Elektroden werden in einem Epoxidharzblock fixiert. Top-Elektroden und der Epoxidharzblock bilden gemeinsam mit der Sylgard-Abdichtung (vgl. auch mit Kap. 4.1.3) die Top-Elektroden-Decke. In die äußeren Top-Elektroden wird im oberen Teil ein Gewinde in den Stahl-Zylindermantel geschnitten (vgl. Kap. 4.1.3: Abb.49) Der Epoxidharzblock dagegen wird von Bohrungen durchstoßen in deren Wände Gewinde gedreht sind. Diese Bohrungen müssen den Abständen der 8 Sensorfelder auf der Oberfläche des Chips entsprechen, denn in diese Bohrungen werden die Top-Elektroden eingeschraubt, damit sie zentral den Sensorfeldern des Chips oberhalb gegenüberstehen. Der Abstand zwischen den Sensorfeldern und den Top-Elektroden wird durch das Einschrauben der Top-Elektroden in den Epoxidharzblock vorerst festgelegt, kann aber mithilfe der Halterung nachjustiert werden. Der im Zwischenraum der Schraubenverbindung zwischen äußerer-Top-Elektrode befindliche Spalt, wird durch ein Teflonband und zusätzlich durch mit Sylgard abgedichtet. Die genaue Abdichtung des Messmoduls, um unkontrollierten Flüssigkeitsaustritt zu verhindern wird im Methodenkapitel und im Ergebniskapitel nochmals aufgegriffen und Beschreibungen ergänzt.

2.2.4 Kontaktierung der Elektroden

Auf einem Chip sind die Bottom-Elektroden untergebracht. Die Bottom-Elektroden werden über Pins an der Glassubstratkante des Chips kontaktiert. Wenn die Glassubstratkante vorher durch Abschleifen „abgewinkelt“ wird, kann der Chip problemlos in einen PCI-Stecker (siehe Abb.36) eingesteckt werden. Dabei drücken die PCI-Kontakte auf die Pins und verbinden so die Bottom-Elektroden mit dem PCI-Stecker elektrisch. Durch Lötten der dazwischenliegenden Kontakte, wird der PCI-Stecker mit Hilfe von Kupferkabeln mit den Lötkelchen eines 37-Pol-PCI-Steckers verbunden. Der PCI- und der 37-Pol-PCI-Stecker sind Bestandteile der Halterung.

Vom 37-Pol-Stecker werden auch die Top-Elektroden kontaktiert. Dabei werden Kupferkabel mit Schraubenverbindungen an den Elektroden verklemt und wiederum mit den Lötkelchen des 37-Pol-PCI Steckers verlötet. Der 37-Pol-Stecker hat damit 32 belegte Pins/Kontakte die in 8 Zellkulturkammern je 2 Top- und 2 Bottom-Elektroden kontaktieren. Der 37-Pol-Stecker ist mit einem geschirmten Flachbandkabel mit dem MUX somit mit den Signalpolen des LCR-Meters verbunden.

An dieser Stelle muss das elektromagnetische Übersprechen der Signalgänge von den Polen des LCR-Meters, zu den Elektroden diskutiert werden. Bei Messaktivität laufen 4 Signale vom LCR-Meter über BNC-Koaxialkabel zum MUX und weiter über elektromechanisch gesteuerte Relais und den Ausgang des MUX in ein geschirmtes Kabel zum 37-Pol-PCI-Stecker. Entlang der beschriebenen Signalausbreitung wurde das Übersprechen in der Arbeit von [2] untersucht und hin zur Minimierung von Störfeldern optimiert. Vom 37-Pol-PCI-Stecker zu den Elektroden können Störfelder durch die Durchführung der Messung im Brutschrank vermeiden werden, da durch dessen metallisches Gehäuse eine Feldabschirmung von außen erreicht wird. Außerdem finden Messungen in verschiedenen Zellkulturkammern hintereinander statt, sodass

jeweils nur die Elektroden einer Zellkulturkammer gleichzeitig aktiv sind. Das kapazitive Übersprechen entlang der Messleitungen vom 37-Pol-PCI-Stecker zu den Elektroden kann nicht ausgeschlossen werden. Es wird jedoch angenommen, dass die Auswirkungen des Übersprechens entlang langer Messzeiten nahezu konstant bleiben. Der Grund dafür ist die vollständige Automatisierung des Messsystems und die dadurch entstehende Ruhe die in der Messumgebung vorherrscht. Mit Ruhe ist gemeint, dass die räumliche Ausbreitung der Kabel nicht verändert wird.

2.2.5 Die Halterung für das Messmodul

Die Aufgabe der Halterung besteht einerseits darin, die Bauteile des Messmoduls zu fixieren und andererseits dient die Halterung als ein kompakter Zusammenschluss von Steckern und Kabeln dem Signaltransfer vom 37-Pol-Stecker zu den Elektroden im Messmodul. Der Boden der Halterung ist den Abmessungen des Chip angepasst, sodass er passgenau eingelegt, kontaktiert und fixiert werden kann. In den Boden ist ein „Fenster“ gesägt worden, durch welches der von Caco-2-Zellen bedeckte Anteil des Glassubstrats während des Versuchs von unter her betrachtet werden kann. Zur Positionierungen und Fixierung der Bauteile des Messmoduls stehen vier Gewindestangen senkrecht auf dem Boden der Halterung. Mit vier Flügelmuttern kann entlang dieser Gewindestangen die Top-Elektroden-Decke gleichmäßig gegen das FlexiPERM und den Chip geschraubt werden. Das Messmodul kann so, nach zusätzlichem Abdichten mit Mircoset-Kleber [27], dicht (vgl. Kap.4.1.3) geschlossen werden. Über dieses Gewinde wird außerdem der Abstand zwischen Top- und Bottom-Elektroden eingestellt, der mit einem Abstandshalter in Form eines „Spacerplättchens“, auf 2mm eingestellt wird.

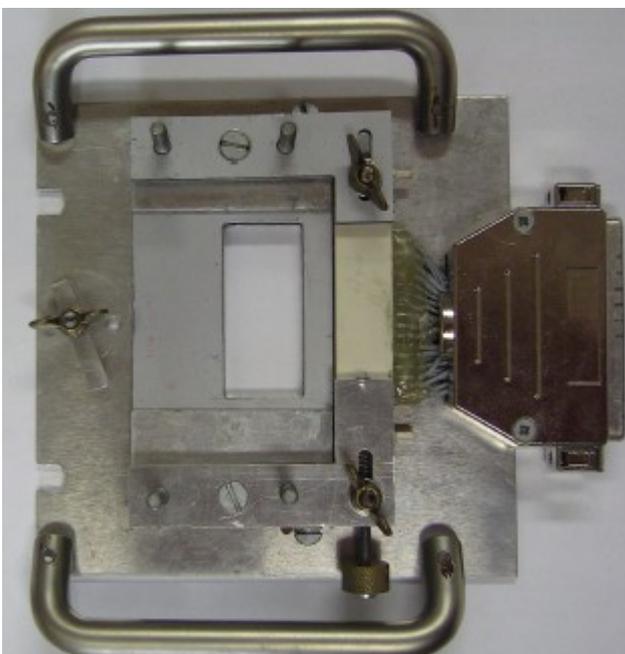


Abbildung 34: Foto des Bodens der Halterung. Vom 37-Pol-PCI-Stecker im metallenen Gehäuse führen Kupferkabel zum PCI, der den Chip (hier nicht abgebildet) kontaktiert.



Abbildung 35: Foto der Flügelmuttern



Abbildung 36: Foto des PCI-Steckers; dient zur Kontaktierung von Pins der Chipoberfläche)



Abbildung 37: Foto des 37-Pol-PCI-Steckers: Auf der Rückseite sind Lötkelchen untergebracht.

2.3 Schlauchquetschpumpe und RPMI-Reservoir

In den Versuchsaufbau ist ein Fluidik-System integriert. Es wird von Kanälen im Messmodul, Schläuchen, RPMI-In/Out-Düsen, einem RPMI-Reservoir und einer Schlauchquetschpumpe gebildet. Durch das Fluidik-System (oder auch RPMI-Kanalsystem genannt) können die Zellkulturen kontinuierlich mit frischem Nährmedium versorgt werden, während gleichzeitig die Impedanz an den Elektroden festgestellt wird. Die Schlauchquetschpumpe quetscht den gefüllten Schlauch und presst damit RPMI-Flüssigkeit aus einem RPMI-Reservoir durch den Schlauch und dadurch durch die RPMI-In-Düse in das Messmodul. Im Messmodul werden nacheinander die untereinander durch Kanäle verbundenen Zellkulturkammern durchströmt und über die RPMI-Out-Düse und einen anderen Schlauch in das RPMI-Reservoir abgeführt. Es entsteht ein steter Nährlösungswechsel zwischen den mit RPMI-Nährlösung gefüllten Zellkulturkammern und dem RPMI-Reservoir.

Das RPMI-Reservoir besteht aus einem Plastiktube mit einem Volumen von 100ml. Im Deckel des Plastik-Tubes befinden sich zwei Bohrungen. In diese Bohrungen werden Plastik-Düsen mit Sylgard eingeklebt. Über die Enden der Düsen werden Schläuche gestülpt, über die das RPMI-Medium durch den Deckel hindurch dem RPMI-Reservoir zu- oder davon abfließen kann.

2.3.1 RPMI-Nährmedium

Das RPMI-Medium ist die durch den Versuchsaufbau zirkulierende Nährlösung, die das heranwachsende Zellgewebe mit Nährstoffen versorgt. Ein dem Nährmedium beigefügter Indikator färbt das RPMI-Medium von rot nach gelb, sobald es droht aufgebraucht zu sein. Dieser Indikator spricht auf den pH-Wert im Nährmedium an, sobald dieser den Bereich zwischen pH 8,2 und 6,8 verlässt. Der pH-Wert im Medium ändert sich durch den stetigen Stoffwechsel der Zellen mit der Nährlösung. Dem Medium ist ein Puffer beigefügt der durch Austausch von CO₂ mit der Umgebungsluft den pH-Wert bei Verbrauch über einen begrenzten Bereich konstant hält [1]. Das Nährmedium bleibt durch den Austausch mit der CO₂ haltigen Atmosphäre des Brutschrank über mehrere Wochen stabil. Das heißt, dass die im RPMI-Medium enthaltenen Stoffe für mehrere Wochen die Versorgung der Zellen gewährleisten, bevor die Farbe des RPMI-Mediums aufgrund des pH-Indikators umschlägt.

INORGANIC SALTS	g/L	AMINOACIDS	g/L	VITAMINS	g/L
<i>Ca (NO₃)₂ 4H₂O</i>	0,1	L-Glutamine	0,3	D-Biotin	$2 \cdot 10^{-4}$
<i>MgSO₄</i>	0,04884	L-Arginine	0,2	Choline Chloride	0,003
<i>KCl</i>	0,4	L-Cystine 2 <i>HCl</i>	0,0652	Folic Acid	0,001
<i>NaCl</i>	6	L-Isoleucine	0,05	myo-Inositol	0,035
<i>Na₂HPO₄</i>	0,8	L-Asparagine	0,05	Niacinamide	0,001
		L-Leucine	0,05	p-Amino Benzoic Acid	0,001
OTHERS		L-Lysine <i>HCl</i>	0,04	D-Pantothenic Acid	$2,5 \cdot 10^{-4}$
D-Glucose	2	L-Serine	0,03	Pyridoxine <i>HCl</i>	0,001
Glutathione	0,001	L-Tyrosine	0,02883	Riboflavin	$2 \cdot 10^{-4}$
Phenol Red Na	0,0053	L-Glutamic Acid	0,02	Thiamine <i>HCl</i>	0,001
<i>NaHCO₃</i>	2	L-Aspartic Acid	0,02	Vitamin B-12	$5 \cdot 10^{-6}$

Abbildung 38: Zusammensetzung der RPMI- Nährlösung.

2.4 Der Multiplexer (MUX)

Der Multiplexer (MUX) hat die Aufgabe, die 4 Signal Aus- bzw. Eingänge (A,B,C und D: vgl. Abb.41) des LCR-Meters passend auf die Elektroden einer Zellkulturkammer zu verteilen. Das geschieht im Betrieb durch das von LabVIEW koordinierte Schalten von elektromechanischen Relais.



Abbildung 39: Foto des Gehäuses des MUX

Der MUX ist ein Relais-tower, der aus 8 zusammengeschalteten Relaiskarten (Conrad. 8-Way Relay Board Item No. 19 77 20, 09 2010) besteht. Jede Relaiskarte besteht aus 8 einzeln von LabVIEW steuerbaren elektromechanischen Relais. Eine schematische Darstellung des Funktionsprinzips ist in Abbildung 41 für zwei Relaiskarten dargestellt. 2 Relaiskarten würden genügen, um die Elektroden von 2 Zellkulturkammern anzusteuern.

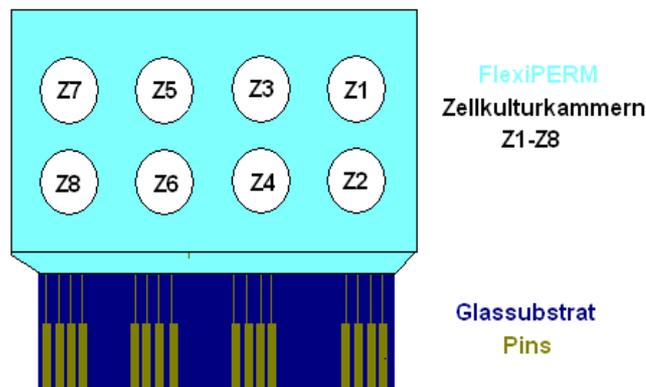


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Anordnung der messtechnisch unabhängigen Zellkulturkammern Z1-Z8; auf dem Glassubstrat bilden 16 lithographisch aufgetragene (goldene) Pins die Kontakte, deren Leiterbahnen weiter zu den Elektroden in den Zellkulturkammern führen; Das (türkise) FlexiPERM bildet die 8 Zellkulturkammern aus.

In Abbildung 39 wird schematisch dargestellt, wie ein solcher Ansteuermechanismus, bei dem 2 Relaiskarten beteiligt sind, die Elektroden einer Zellkulturkammer belegen. Insgesamt werden jeweils 2 Bottom- und 2 Top-Elektroden in jedem der 8 messtechnisch unabhängigen Zellkulturkammern angesteuert. Die Nummerierung dieser Zellkulturkammern (Zellkulturkammer 1 bis 8) folgt dem System, wie es in Abbildung 40 dargestellt ist.

Abhängig vom Chiptyp und der Art der Messung werden die Relais des MUX unterschiedlich angesteuert bzw. die Verbindungen zwischen 37-Pol-Stecker und PCI-Stecker angepasst. (Vgl. Kontaktierung der Elektroden).

Der MUX ist über eine analoge USB-Schnittstelle mit dem PC verbunden, auf dem eine Bediensoftware zur Steuerung der Relaiskarten in LabVIEW implementiert ist. Von LabVIEW koordiniert, enden die 4 Signal-/Mess- Pole des LCR-Meters im Ausgang des MUX in einen 37-Pol-Stecker (vgl. Abb.39), wobei die Signal und Messströme in beide Richtungen, vom Messmodul zum LCR-Meter und zurück, laufen. Die

Funktion des MUX kann mit Hilfe des LabVIEW Programms getestet werden. Der genaue Aufbau des MUX, die genaue Verdrahtung der Relaiskarten, sowie die Pläne für das Gehäuse können in der Arbeit von [2] nachgelesen werden, da der MUX für die Anwendungen dieser Arbeit nicht geändert wurde.

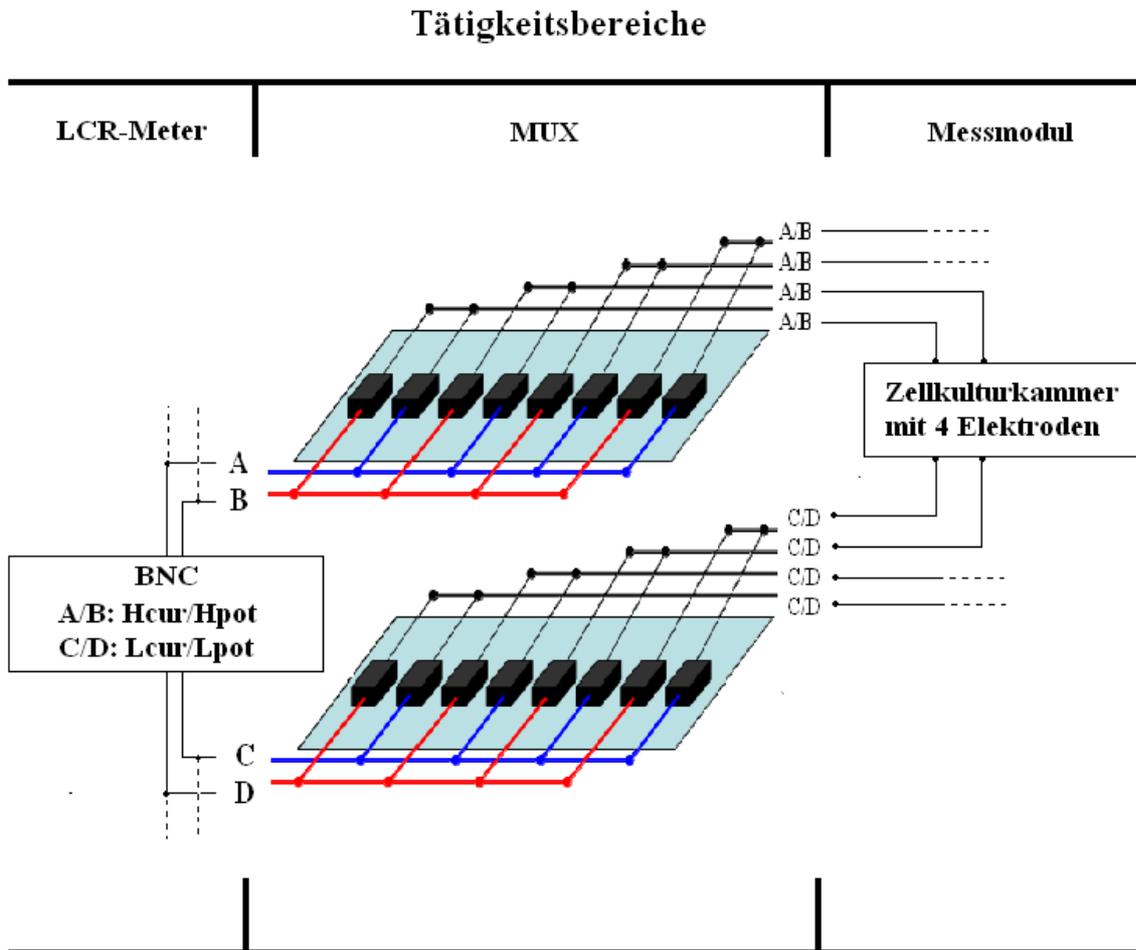


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des MUX; exemplarisch dargestellt für eine mit Elektroden ausgestattete Zellkulturkammer.

2.5 HIOKI LCR-Meter 3522-50

Der „HIOKI-**LCR-Meter 3522-50 (LCR-HiTESTER)**“ ist das Impedanzmessgerät und der Signalgenerator des Messaufbaus. Seine Bedienung kann wahlweise über ein Touchpanel oder über eine USB-, GP-IB-Schnittstelle in LabVIEW erfolgen. Im Vier-Punkt-Messbetrieb kann entweder der Strom konstant und die Spannung begrenzt (constant voltage mode), oder die Spannung konstant und der Strom begrenzt (constant current mode) werden. In Abbildung 42 werden die 4 BNC Buchsen mit den Ausgängen L_{CUR} , L_{POT} , H_{POT} und H_{CUR} auf der Vorderseite des HIOKI 3522-50 gezeigt, die mit den BNC-Buchsen des MUX verbunden werden. Auf der Rückseite des LCR-Meters (vgl. Abb.42) befindet sich die GP-IB-Schnittstelle und der

Anschluss für die Stromversorgung. Die BNC-Buchsen mit der Indexbezeichnung CUR sind Strom- Aus- und Eingänge und die mit POT sind Potentialmessbuchsen.



Abbildung 42: Foto der Vorder und Rückansicht des HIOKI 3522-50

Das LCR-Meter wird bei den in Kapitel 4 behandelten Messungen an Zellkulturen (Bioimpedanzmessungen) stets im „constant voltage mode“ betrieben. So wird der transepithelial anliegende Potentialunterschied zwischen den Elektroden vom LCR-Meter konstant kleiner 0,1V gehalten (constant voltage mode). In Abbildung 43 ist die Messschaltung im „constant voltage mode“ Betrieb dargestellt.

Im Messmodul liegt immer jeweils eine der Top-Elektroden auf H_{POT} und die andere auf H_{CUR} oder eine auf L_{CUR} und die andere auf L_{POT} . Dem entsprechend gilt dies auch für die Bottom-Elektroden.

Relevante Messparameter sind: die Impedanz $|Z|$ und die Messbereichsauswahl für $|Z|$, der Phasenwinkel θ , die Frequenz, die Signalstärke und die Messgeschwindigkeit.

Daneben werden noch die Funktionen AVE (Average), Delay und Range verwendet. Bei der AVE- (Average) Funktion wird ein Mittelwert aus Einzelmessungen vorgegebener Anzahl gebildet. Bei Delay kann eine Dauer eingestellt werden, die zwischen dem Anlegen eines Signals gewartet wird, bis die Messung beginnt. Range betitelt die Impedanzbereichsauswahl. Sie kann auf „AUTO“ gestellt werden, sodass die Auswahl vom LCR-Meter selbstständig festgelegt wird.

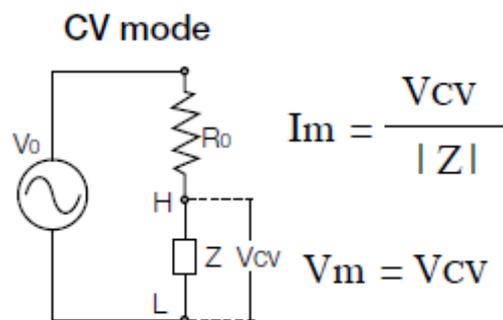


Abbildung 43: Kopie der technischen Beschreibung des HIOKI- 3522-50; Constant Voltage Mode.

In der Tabelle 6 werden die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Messparameter und wichtige technische Details des LCR-Meters tabellarisch aufgelistet.

Messparameter	$ Z , \theta$
Messbereich $ Z $	10.00 m Ω to 200.00 M Ω (abhängig der Messfrequenz und der Signalstärke)
Messbereich θ	-180.00° bis +180.00°
Messgenauigkeit	Z : $\pm 0.08\%$ rdg. θ : $\pm 0.05^\circ$
Mess-Signalstärke	10 mV bis 5 V rms / 10iA bis 100 mA rms
Messgeschwindigkeit (typische für $ Z $ benötigte Messzeiten)	FAST : 5 ms, NORMAL : 16 ms, SLOW 1 / 2 : 88 ms / 828 ms
Messfrequenzen	DC, 1 mHz bis 100 kHz ($\pm 0.005\%$)
Anschlüsse	4 BNC-Anschlüsse, GP-IB -USB Schnittstelle (oder wahlweise RS-232C), externes I/O, Ground Buchse, Stromversorgung

Tabelle 6: Auszug aus dem technischen Datenblatt des HIOKI-*LCR-Meter 3522-50 LCR HiTESTER*.

2.6 Das LabVIEW-Programm

Die LabVIEW-Programmierung automatisiert den Messablauf. LabVIEW ist eine Steuerprogrammierung die auf einem PC arbeitet. In das LabVIEW-Programm sind Steuerprogrammierungen für die Bedienung des LCR-Meters und der Relaiskarten des MUX implementiert. LCR-Meter bzw. MUX werden vom PC über eine USB- bzw. USB-GP-IB-Schnittstelle angesteuert. Im Normalfall, steuert das LabVIEW-Programm zuerst den MUX an, dieser schaltet daraufhin Relais, wie sie durch eine 4 mal 8 Matrix in der LabVIEW-Benutzeroberfläche festgelegt sind. So enden die Mess- und Signalpole des LCR-Meters in den Elektroden der Zellkulturkammer. LabVIEW steuert daraufhin das LCR-Meter an und fordert es zur impedanzspektroskopischen Messung auf. LabVIEW koordiniert die Messung über einen beliebigen Versuchszeitraum und speichert die aufgenommenen Messdaten. Der strukturelle Aufbau des LabVIEW-Programms ist in der Arbeit von M. Fischender [2] genauer beschrieben. (An der LabVIEW-Programmierung wurden geringfügige Änderungen vorgenommen (vgl. Kap.4.2.1).)

2.6.1 Die LabVIEW-Benutzeroberfläche

Die Bedienung des LabVIEW-Messprogramms erfolgt über eine graphische Benutzeroberfläche. Beim Start des Programms erscheint ein Hauptfenster, in welchem, wie nun folgt, Einstellungen festgelegt werden:

- i. Durch Eingeben von zweistelligen Zahlen in eine 4 mal 8 Matrix werden die Relaiskarten des MUX adressiert und die Messpole des LCR-Meter auf die gewünschten Elektroden des Messmoduls geschaltet.
- ii. Durch Eingeben der Startfrequenz und der Endfrequenz und durch die Eingabe der Anzahl der Frequenzmesspunkte (FMP) innerhalb eines Spektrums, kann sowohl der Frequenzbereich als auch die Auflösung im Frequenzspektrum festgelegt werden. Der Frequenzbereich wird in logarithmisch

konstante Abstände unterteilt, sodass die Frequenzmesspunkte in eben diesem Abstand gewählt werden.

- iii. Durch Einstellen der Wartezeit zwischen den Messvorgängen, wird die Zeitdauer zwischen dem Anfang einer Messung und dem Ende einer vorherigen Messung festgelegt.
- iv. In ein Eingabefeld wird das Ende der gesamten Messung, in Form eines Datums und einer Uhrzeit eingegeben. So wird die zeitliche Gesamtdauer einer Bioimpedanzmessung festgelegt.
- v. Durch das Auswählen von Messparametern werden die entsprechende Messdaten in einzelnen Data-Files gespeichert. Hilfreich ist hier besonders die Formatierung der gespeicherten Daten, in der Impedanzmesswerte einer Frequenz dem jeweiligen Zeitpunkt der Messung gegenübergestellt sind. Diese Matrixform, deren Spalten Frequenzmesspunkte und deren Zeilen Messzeitpunkte entsprechen, beinhaltet an den Kreuzungspunkten den jeweiligen Impedanzmesswert. Diese Matrixform ist hinsichtlich der graphischen Darstellung der Messergebnisse in 3D-Graphiken vorteilhaft.

Sobald die Parameter in der LabVIEW-Oberfläche eingegeben worden sind, kann die Messung mit einem START-Knopf gestartet werden. Daraufhin erscheint ein neues Fenster in dem die Messaktivitäten sowie die derzeitigen Messwerte graphisch dargestellt werden.

Nicht alle Parameter der elektrischen Messungen werden in der LabVIEW-Oberfläche festgelegt, sondern einige Messparametereinstellungen, können nur über das Touch-Screen-Panel des LCR-Meters eingegeben werden.

3. Methode und Durchführung

In diesem Kapitel wird zuerst der Erkenntnisstand der Arbeiten von M. Fischender [2] und M. Hufnagel [1] vorgestellt, da die vorliegende Arbeit an deren Messaufbau und Messmethoden anknüpft. Dabei werden Problemstellungen beider Arbeiten aufgearbeitet und erklärt, wie versucht wurde, diese Probleme zu beheben bzw. das Messergebnis weiter zu verbessern. Daraufhin wird die Messmethode einer für diese Arbeit typischen Bioimpedanzmessung erklärt und deren Vorbereitungsphase bis zum Start der Messung chronologisch abgehandelt. Es werden Einstellungen aufgelistet, die als Standardparameter in allen Bioimpedanzmessungen Anwendung fanden und Beschreibungen der Evaluierung der optischen und elektrischen Ergebnisse einer Bioimpedanzmessung angegeben. Den Schluss dieses Kapitels bildet die Methodik des Einsatzes von Permeation Enhancern, die die Ergebnisse bisheriger Messungen untermauern und bei deren Deutung Klarheit schaffen sollen. Für bestimmte Teile dieses Kapitels ist den Ergebnissen von Kapitel 4 vorgegriffen worden.

3.1 Status vorangehender Arbeiten

In den Diplomarbeiten von M. Fischeneder [2] und M. Hufnagel [1] wurde gezeigt, dass Caco-2-Zellen auf einem Borosilikat-Glassubstrat sowie auf Edelmetall-Elektroden aufwachsen. Beide Arbeiten verwendeten Materialien die auf die Zellkulturen nicht toxisch wirkten, sodass im Gegenteil ein schnelles Wachstum zu beobachten war und die Chipoberfläche rasch mit Zellgewebe bedeckt war. In Abbildung 44 werden die

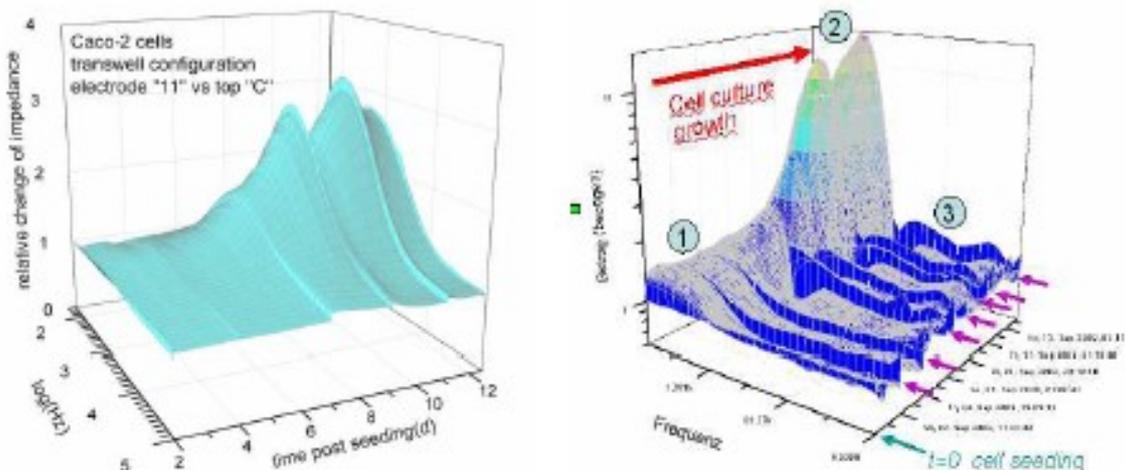


Abbildung 44: Darstellung relative ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektra aus [1] (links) und aus [2] (rechts); Vertikal tragen relative ($|Z|/|Z_1|$) Impedanzspektra, horizontal links die Frequenz [Hz] und horizontal rechts die Zeit nach der Aussaat auf; die Sprünge korrelieren mit den Zeitpunkten des Nährlösungswechsels.

Impedanzspektra gezeigt, die in diesen Arbeiten entlang der Messzeit aufgenommen wurden. In der Arbeit von M.Hufnagel [1] wurde bei Vermehrung der Caco-2-Zellen auf den Elektroden ein deutlicher Anstieg der transepithelialen Impedanz bei niederen (5kHz (auflösungsbedingt)-ca. 40kHz) Frequenzen festgestellt. Die Messmethode in der Arbeit von M.Fischeneder [2] unterscheidet sich dahingehend, dass die Elektroden ausschließlich auf der basalen Gewebeseite positioniert waren. Auch dort zeigt sich dieser charakteristische

Anstieg bis hin zu niederen Messfrequenzen von 200Hz. Die Auswertung beider Arbeiten ([2] und [1]) ergab weiter, dass mit dem Nährlösungswechsel ein Sprung im Impedanzspektrum korreliert. Beim Nährlösungswechsel mit der Pipette wurde in der Arbeit von M. Hufnagel [1] die Position der Bottom- zu den Top-Elektroden methodebedingt verändert, d. h., dass diese Störung dadurch verursacht sein könnte. Das Impedanzspektrum in der Arbeit M.Fischeneder [2] zeigte diese jedoch Störung auch, wobei hier nur Chip-Elektroden verwendet wurden, die faktisch fix angebracht waren. Als mögliche Ursachen wurden Leitfähigkeitsvariationen bei Verbrauch oder Wechsel der RPMI-Nährlösung primär ausgeschlossen. Es verblieb die Spekulation, dass ein Verletzen des bereits gewachsenen Gewebes die wahrscheinlichste Ursache für die abrupten Änderungen im Impedanzspektrum beim RPMI-Mediumwechsel waren, da das Impedanzspektrum nach etwa 2 Tagen wieder ursprüngliche Werte angenommen hatte, und dann, nach dieser Vorstellung, das Gewebe (hin zu einem konfluenten Zellmonolayer) repariert war.

Die Methode und der Aufbau dieser Arbeit verwendet eben erwähnte Arbeiten als Vorlage. M. Fischeneder [2] zeigte, dass mit 4-Punkt-Messungen bis zu niederen Frequenzen $> 200\text{Hz}$ von der basalen Gewebeseite aus Gewebeimpedanzen gemessen werden können. Aus der Arbeit von M. Hufnagel [1] wurde der Aufbau für die transepitheliale Impedanzmessung übernommen und auf 4-Punkt-Messmethode erweitert. Das (in dieser Arbeit) so genannte Messmodul wurde mit einem automatisierten Nährflüssigkeitsaustauschsystem ausgestattet, sodass die Elektrodenpositionen während der gesamten Messzeit unverändert blieben und so das Gewebe beim Flüssigkeitsaustausch geschont wird.

3.2 Vorbereitungen zur Messung der Gewebeimpedanz

Dieses Kapitel beinhaltet im Wesentlichen einen chronologisch dargelegten Ablauf, der die Vorbereitungsphase bis zum Start einer Bioimpedanzmessung schrittweise beschreibt. Bioimpedanzmessungen betiteln die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen an biologischen Zellkulturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 6 Bioimpedanzmessungen durchgeführt, wobei die ersten zwei zur Evaluierung des Messaufbaus und zur Optimierung des Messsystems durchgeführt wurden. Die nun im Folgenden beschriebene chronologische Abhandlung gilt für die Vorbereitungsphasen der 3.- 6. Bioimpedanzmessung. Zu Beginn der Vorbereitungsphase liegt ein elektrisch getesteter Aufbau vor.

Die Vorbereitungsphase wird im Folgenden chronologisch dargelegt. Einige Arbeitsschritte müssen dabei unter anderem in keimfreien Umgebungen erfolgen.

- 1) Bedingung: Funktionstüchtigkeit des elektrischen Messaufbaus.
- 2) Reinigung des Chip: Der Chip wird in eine Piranha-Lösung (Mischung aus H_2SO_4 und HCl) getaucht und von biologischen Rückständen befreit.
- 3) Reinigung: Das Messmodul ist vorerst in seine Einzelteile zerlegt. FlexiPERM, Top-Elektroden-Decke, sowie die Schläuche und der Deckel das RPMI-Reservoir werden für 24 Stunden in ein

Alkoholbad (70%) getaucht. Weitere Bauteile wie die Halterung, die Schlauchquetschpumpe und das RPMI-Reservoir werden gesondert mit Alkohol (70%) gereinigt. Zusammenfassend gesagt, werden alle Bauteile gereinigt, die sich bei einer Bioimpedanzmessung im Brutschrank befinden.

- 4) Trocknung: Der Luftstrom in der Laminar-Flow-Box trocknet nach dem Desinfektionsprozess alle Bauteile, die im oben (Punkt 3) erwähnten Alkoholbad untergebracht waren.
- 5) Zusammenschluss von Chip und FlexiPERM: Das FlexiPERM wird mit Microset auf die Glasoberfläche des Chips geklebt. Die RPMI-In/Out-Düsen werden eingeklebt. (Dieser Aufbau ist in Abb.21 in der Einleitung zum Kap.2 schematisch dargestellt, wobei die geklebten Stellen nicht eingezeichnet sind).

Nun folgen Arbeitsschritte, die in der Laminar-Flow-Box ausgeführt werden.

- 6) Aussaat der Caco-2-Zellen: Beim so genannten Spalten wird eine bestehende Zellgewebekultur durch den Einsatz von Trypsin in Einzelzellen aufgespaltet. Diese Einzelzellen werden entnommen und eine RPMI-Nährmedium-Zellsuspension hergestellt. 160µl dieser Suspension, das entspricht 17.000 Caco-2- Zellen, werden mit einer Pipette in die Zellkulturkammern gefüllt. Die Zellkulturkammern werden daraufhin mit einem sterilen Objektträger abgedeckt. Die Zellen setzen sich ab und binden auf der basolateralen Gewebeseite an die Chipoberfläche.
- 7) RPMI-Reservoir: Ein neues, steriles, Plastiktube, mit einem Fassungsvermögen von etwa 100ml, wird mit 80ml RPMI-Nährlösung angefüllt. Der Deckel mit in die Oberseite eingeklebten (Sylgard [30]) Düsen und das Plastiktube bilden gemeinsam das RPMI-Reservoir.
- 8) Verbinden der RMI-In/Out-Düsen mit dem RPMI-Reservoir: Die Schläuche werden über die beiden RPMI In/Out-Düsen im FlexiPERM und über die beiden Düsen im Deckel des Tanks gestülpt.
- 9) Einlegen des Zusammenschlusses von Chip und FlexiPERM in die Halterung: Der Chip wird in die passende Bodenvertiefung der Halterung eingelegt und in den PCI-Stecker geschoben. Die Chip-Elektroden werden so kontaktiert.

- 10) Schließen des Messmoduls (vgl. Abb.45): Zusammenschluss von Chip, FlexiPERM und Top-Elektroden-Decke. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen werden mit einer Pipette aus jeder Zellkulturkammer 60 μ l RPMI-Nährlösung entnommen. Damit wird ein Überlaufen der Zellkulturkammern beim Eintauchen der Top-Elektroden verhindert. Die Top-Elektroden, die in jede der mit RPMI-Medium gefüllte Zellkulturkammer eintauchen, müssen zentral über den Bottom-Elektroden platziert werden. Es muss darauf geachtet werden, dass sich an der Top-Elektrode keine Luftblasen bilden.

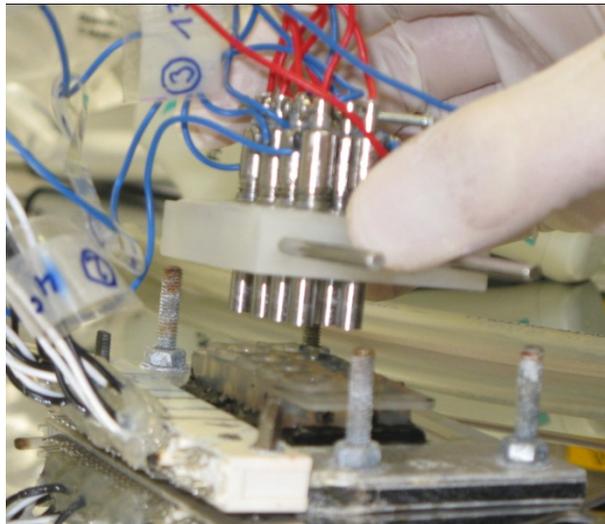


Abbildung 45: Foto des Messmoduls in der Laminar-Flow-Box: Die Elektroden des Messmoduls sind kontaktiert, das Messmodul ist noch offen.

- 11) Fixierung des Zusammenschluss von Chip, FlexiPERM und Top-Elektroden-Decke in der Halterung: Die Top-Elektroden-Decke wird in der Halterung an Gewindestangen gegen das FlexiPERM und den Chip geschraubt und das Messmodul damit verriegelt.

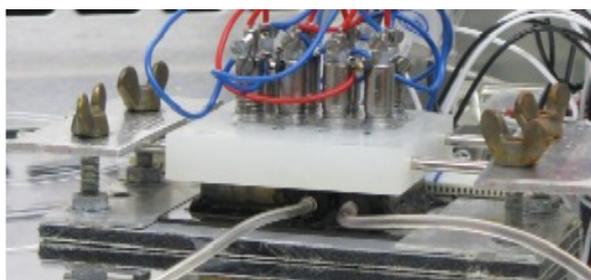


Abbildung 46:Foto des Messmoduls, welches in der Laminar-Flow-Box aufgenommen wurde; das Messmoduls ist geschlossen.

Nun folgen Arbeitsschritte, die in im Brutschrank ausgeführt werden.

- 12) Transport von der Laminar-Flow-Box in den Brutschrank: Das in der Halterung fixierte und

elektrisch kontaktierte Messmodul mit angeschlossenen Schläuchen (siehe Abb.46), wird wie auch die Schlauchquetschpumpe und das RPMI-Reservoir von der Laminar-Flow-Box in den Brutschrank getragen. Dieser Transport sollte rasch erfolgen.

- 13) Kontaktierung des Messmoduls: Das geschirmte Flachbandkabel für die Kontaktierung des PCI-Steckers und die Stromversorgung für die Schlauchquetschpumpe werden ins Innere des Brutschranks gezogen. Sie werden an der Schwelle der Brutschranktüre mit Klebeband fixiert. Das Messmodul ist nun betriebsbereit.
- 14) Aufbau und Fixierung der Gerätschaft im Brutschrank: Das RPMI-Reservoir wird an der Schlauchquetschpumpe mit Klebeband befestigt und einer der beiden Schläuche in die Vorrichtung am Pumprad eingespannt. Der Deckel des RPMI-Reservoirs wird nur lose auf den (Reservoir eigenen) Tubehals gelegt, sodass ein Austausch zwischen Brutschrank-Atmosphäre und RPMI-Medium möglich ist. Die Pumpe wird in Betrieb genommen.
- 15) Schließen der Brutschranktüre: Durch das Schließen der Brutschranktüre muss der Brutschrank nach außen dicht abriegeln, um die spezifische Atmosphäre zu wahren, was automatisch vom Brutschrank erkannt und signalisiert wird.

Ende der Arbeitsschritte, die in keimfreier Umgebung ausgeführt werden müssen.

- 16) Testmessung: Nach dem alle Gerätschaften mit dem restlichen Aufbau verbunden wurden, wird eine elektrische Testmessung durchgeführt. Dies dient der Feststellung der elektrischen Kontaktierung sowie zur Prüfung der Funktionstüchtigkeit des gesamten elektrischen Aufbaus.
- 17) Start des LabVIEW-Programms: Die Parameter der elektrische Messung werden eingestellt und das LabVIEW-Programm gestartet. Die Bioimpedanzmessung beginnt mit dem Drücken eines Startknopfs in der LabVIEW-Oberfläche und arbeitet dann für mindestens 7 Tage, bzw. bis zum Ende der Bioimpedanzmessung. Alle Aufgaben der elektrischen Messtätigkeit laufen automatisch ab.

3.3 Schema der Bioimpedanzmessung

Zu Beginn einer Bioimpedanzmessung werden Caco-2-Einzelzellen in die 8 messtechnisch unabhängigen Zellkulturkammern des Messmoduls ausgesät. Die Zellen setzen sich auf der basolateralen Zellseite auf der Chipoberfläche, die den Boden der Zellkulturkammern bildet, ab und bedecken so die Chipoberfläche, die aus Glassubstrat und Bottom-Elektroden besteht (vgl. Abb.47). Da die Höhe der Bottom-Elektroden über dem Glassubstrat nur 200nm beträgt, können die Zellen im Zuge der Zellvermehrung ein Gewebe über den Bottom-Elektroden und dem Glassubstrat ausbilden. Die Konfluenz des Caco-2-Zellrasens nimmt fortschreitend zu, sodass sich durch die zunehmende Gewebeverdichtung ein vollständig konfluenter Caco-2-Zellmonolayer ausbildet. Auf der apikalen Gewebeseite stehen den Bottom-Elektroden (im „geschlossenen“ Messmodul) die in das RPMI-Medium getauchten Top-Elektroden in 2mm Abstand gegenüber (vgl. Abb.47). Durch die Anwesenheit von Top- und Bottom-Elektroden kann die transepitheliale Impedanz des dazwischenliegenden Gewebes gemessen werden. Die Zellkulturkammern sind untereinander durch Kanäle (in Abb. 47 nicht eingezeichnet) verbunden, die der RPMI-Nährstoffzufuhr dienen. So kann das Zellwachstum über einen langen Zeitraum impedanzspektroskopisch in 4-Punkt-Messtechnik untersucht werden, ohne dabei das Wachstum und die somit auch Messung zu stören.

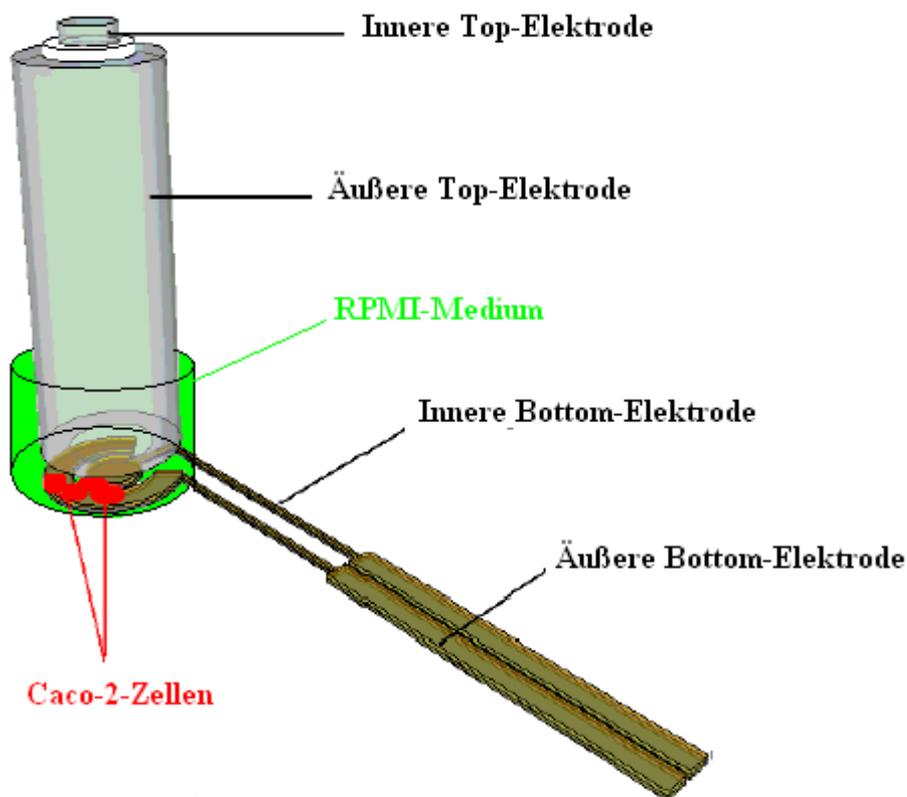


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Messsituation einer Bioimpedanzmessung. Auf den Bottom-Elektroden wachsen die hier übergroß dargestellten Caco-2 Zellen auf. Der Zwischenraum zwischen Top- und Bottom-Elektroden stellt das „Device Under Test“ dar. Das „Device Under Test“ ist mit RPMI-Medium angefüllt, das fortlaufend ausgetauscht wird. (Nicht eingezeichnet ist der Epoxidharzblock, das FlexiPERM, und das Glassubstrat des Chip.)

3.4 Standardparameter einer Bioimpedanzmessung

In diesem Kapitel werden Einstellungen aufgelistet, die als Standardparameter in allen Bioimpedanzmessungen Anwendung fanden. Das betrifft einerseits das Parameter der Nährstoffversorgung beim Kultivieren von Caco-2-Zellen im Brutschrank und andererseits bestimmte elektrische Messparameter.

3.4.1 Messaufbau im Brutschrank; Einstellen der Nährstoffversorgung

Eine Bioimpedanzmessung wird entlang der gesamten Messdauer im Brutschrank durchgeführt, da Caco-2-Zellen nur in dieser spezifischen Umgebung vital bleiben und sich rasch vermehren.

Im Brutschrank „NAPCO 6000 CO₂“ herrschen stets 37°C und eine Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Atmosphäre hat ein Anteil von 5% an CO₂. Das ist notwendig, um den pH-Wert im RPMI-Nährmedium konstant zu halten. Der Deckel des RPMI-Reservoirs wird deshalb nur lose auf den Verschluss des RPMI-Reservoirs gelegt, damit das RPMI-Medium mit der feuchten CO₂ Atmosphäre des Brutschrankes wechselwirken kann.

Sobald das Messmodul im Brutschrank steht und elektrisch verbunden ist (vgl. Kap.3.3 Punkt: 14), wird die Schlauchquetschpumpe in Betrieb genommen. Die Durchflussgeschwindigkeit kann an der Oberseite der Schlauchquetschpumpe geregelt werden und ist im Betrieb auf Stufe 03 eingestellt. Das entspricht einem Flüssigkeitstransport von 3,5µl pro Sekunde.

Das RPMI-Reservoir ist zu Versuchsbeginn mit 80ml RPMI-Nährlösung gefüllt, das entspricht einem vielfachen der über die gesamte Messzeit benötigten Nährstoffzufuhr.

3.4.2 Methode der elektrischen Messung und Überblick über deren Parameter

Das Einstellen der elektrischen Parameter erfolgt durch die LabVIEW-Oberfläche und/oder durch das Touch-Panel am LCR-Meter. In den jeweiligen Kapiteln wurde bereits deren Funktionsweise erklärt und die relevanten Parameter der elektrischen Messung angeführt.

Für die Dauer der Messtätigkeit dieser Arbeit wurden die Messeinstellungen den Aufgabenstellungen angepasst, die sich erst aus den Messergebnissen - vorheriger in dieser Arbeit durchgeführter Messungen - ergaben. So werden die genauen Messparameter bei den Darstellungen der Ergebnisse angegeben. Im Folgenden soll ein kleiner Überblick den Verwendungsbereich der Messparameter umrahmen bzw. konstant bleibende Messparameter aufgelistet werden.

Auflistung der elektrischen Messparameter und der Charakteristika der Messmethode, die für alle Bioimpedanzmessungen dieser Arbeit verwendet wurden.

- a) 4-Punkt-Messmethode: Die Impedanz wird ausschließlich mit der 4-Punkt-Messtechnik bestimmt.
- b) Transepitheliale Impedanz: Die Impedanz wird nur durch das Gewebe (an den Top- und Bottom-

Elektroden) festgestellt.

- c) Frequenzbereich: Der maximale Frequenzbereich der bei einer Bioimpedanzmessung abgetastet wird liegt zwischen 1Hz und 100kHz.
- d) „Constant Voltage Mode“: Das Signal des LCR-Meters durch die Probe wird konstant $\leq 0,1V$ gehalten.
- e) „Range“: Die Impedanzbereichsanpassung des LCR-Meters ist auf „AUTO“ eingestellt.

3.5 Darstellung relativer Bioimpedanzspektra

Die von LabVIEW-gespeicherten Messdaten werden zur Auswertung in verschiedenartigen Diagrammen dargestellt. Ein typisches relatives Bioimpedanzspektrum ist ein 3 dimensionales Diagramm, auf dessen horizontalen Achsen die Zeit nach Aussaat linear und die Frequenz logarithmisch aufragt. Auf der vertikalen (Z-Achse) Achse ist im Normalfall der *Quotient* ($|Z(\omega,t)|/|Z_i(\omega,t=i)|$) oder die *Differenz* ($|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega,t=i)|$) aufgetragen. Neben den 3D-Diagrammen werden auch 2D-Diagramme und 2D-Konturplots zur Darstellung der Messergebnisse verwendet, wobei auch bei diesen die Zeit linear und die Frequenz logarithmisch aufgetragen wird. Die Argumente von $Z(\omega,t)$ sind die Messfrequenz ω in [Hz] und die Zeit nach der Aussaat t in Stunden [h].

Vor dem Hintergrund, dass die vom LCR-Meter aufgenommenen Absolutbeträge des Impedanzmesswerts auch immer die Impedanz des Messsetups (vgl. z.B.: die Zellkonstante der Elektroden, Impedanz des reinen RPMI-Mediums) beinhalten, die aber mit der Gewebeimpedanz nur unwesentlich zusammenhängen, werden in den 3D-Bioimpedanzspektra hauptsächlich relative Impedanzänderungen ($|Z|/|Z_i|$ bzw. $|Z|-|Z_i|$) bezüglich einer impedanzspektroskopischen Messung zu Anfang der Messserie dargestellt. Eine Messserie betitelt die Gesamtzahl der impedanzspektroskopischen (IS) Messungen die während der gesamten Dauer Bioimpedanzmessung in einer Zellkulturkammer des Messmodul aufgenommen werden. Da das Messmodul 8 Zellkulturkammern besitzt, besteht eine Bioimpedanzmessung aus 8 Messserien.

Der Index (i) in den Berechnungsvorschriften von $|Z|/|Z_i|$ bzw. $|Z|-|Z_i|$ nummeriert die Impedanzspektra der Messserie in chronologischer Reihenfolge. Dabei gibt „i“ an, bezüglich welchem Impedanzspektrum die *Differenzen* und *Quotienten* gebildet wurden. So werden z.B. für $i=1$ die *Quotienten* und die *Differenzen* bezüglich des ersten Impedanzspektrums der Messserie, das entspricht meistens dem Zeitpunkt 24h nach Zellaussaat, gebildet d.h. $|Z_{>1}|/|Z_1|$ bzw. $|Z_{>1}|-|Z_1|$. Bei der Darstellung der Messergebnisse ist es nicht immer von Vorteil die *Quotienten* und die *Differenzen* bezüglich des ersten Impedanzspektrums der Messserie darzustellen, da nicht alle Impedanzspektra durchgehend für jeden Frequenzmesspunkt des Messzeitpunkts einen geeigneten („sinnvollen“;vgl. Kap.4.1.4.1) Messwert liefern. Der Index i kann normalerweise direkt in die Zeit nach Aussaat der Caco-2-Zellen umgerechnet werden, da Messserien in zeitlich konstanten Abständen (z.B.: einstündiger Abstand) durchgeführt werden.

Globale Maxima $(|Z(\omega,t)|/|Z_i(\omega,t=i)|)_{\max}$. bzw. $(|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega,t=i)|)_{\max}$: Im Ergebniskapitel wird häufig das globale Maximum angegeben. Damit ist der größte Wert der *Differenz* und des *Quotienten* gemeint, der entlang der gesamten Messdauer der Messserie und innerhalb des gesamten Frequenzspektrums festgestellt worden ist. Der Wert und die Lage des globalen Maximums sind vom Index i , bezüglich dessen die *Differenz* und der *Quotient* gebildet wurden, abhängig.

3.6 Feststellung der Zelladhäsion und der Zellbedeckung

Die Zelladhäsion auf der Chipoberfläche stellt ein entscheidendes Kriterium für die Durchführbarkeit von Bioimpedanzmessungen dieser Art dar. Die Caco-2-Zellen sollen laut Versuchsvorstellung an das Glassubrat und die metallischen (Bottom-) Elektroden binden und diese im Zuge der Zellvermehrung vollständig

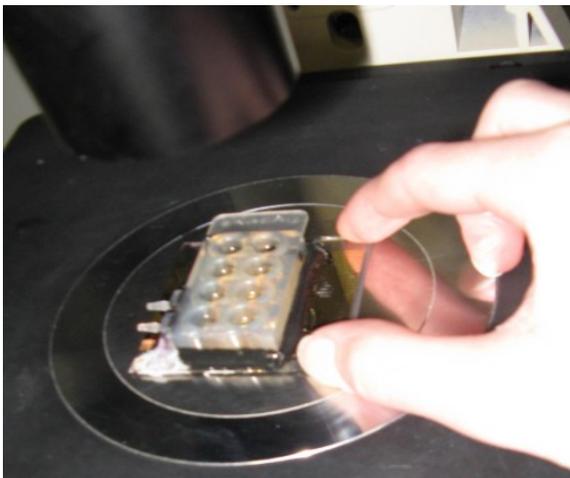


Abbildung 48: Foto beim Feststellen des Bewuchsgrades mit mikroskopischen Methoden; (durchlichtmikroskopisches Fotografieren nach der 3. Bioimpedanzmessung).

überwachsen. In diesem Zusammenhang muss auch die so genannte Biokompatibilität genannt werden, die angibt, ob Materialien in Kontakt mit dem Nährmedium oder mit den biologischen Zellen auf diese toxisch wirken.

Die Feststellung der Zelladhäsion geht mit der Feststellung des Zell-Bewuchsgrades einher. Am Ende einer Bioimpedanzmessung wird die Chipoberfläche des Messmoduls unter dem Mikroskop untersucht (vgl. Abb.48). Hierbei werden mikroskopische Durchlicht- und Auflichtaufnahmen der Chipoberfläche gemacht, anhand derer der Zellbewuchsgrad festgestellt wird. Die Zelladhäsion zeigt sich beim Absaugen des RPMI-

Mediums aus den Zellkulturkammern.

Der Bedeckungsgrad der Bottom-Elektrode korreliert - so die Hypothese dieser Arbeit - mit dem Anstieg der transepithelialen Impedanz bei charakteristischen Frequenzen. Um diese Korrelation zu untersuchen, werden mikroskopische Aufnahmen des Zelllayers den Bioimpedanzspektra gegenübergestellt.

Sobald größere Teile des Caco-2-Zelllayers konfluent sind, löst sich der Zelllayer lokal vom Untergrund, i.e. dem Glassubrat mit den Bottom-Elektroden, ab. Man nennt diese lokalen Ablösungen Domes. Mit zunehmender Versuchsdauer lösen sich immer mehr Gewebestellen vom Untergrund ab, bis die Zellschicht lose im Nährmedium schwimmt (schätzungsweise nach etwa 20-25 Tagen nach Zellaussaat). Ist dieser Zeitpunkt erreicht, müssen die Schlüsse, die aus dem Impedanzspektrum gezogen werden (vgl. Elektrische Eigenschaften eines dichten Zellayers Kap. 1.6) unter neuen Gesichtspunkten gedeutet werden.

3.7 Einsatz von Permeation Enhancer (PE)

Permeation Enhancer (PE) sind chemische Substanzen die die Tight Junctions des Caco-2-Gewebes

ansprechen.(vgl. Kap.1.6 bzw. 1.7)

Die Art des PE und einzusetzende PE-Konzentration werden zusammen mit Fachleuten des Instituts für pharmazeutische Technologien der Uni Wien festgelegt. Zu Grunde liegen hier Daten, welche durch den Einsatz von PE bei konfluentem Zellgewebe, das auf einem sehr engmaschigen Gitter aufgewachsen ist, durch TEER-Messung gewonnen wurden. Die TEER-Messung wurde mit dem EVOM (ein Produkt von World Precision Instruments -WPI), welches den transepithelialen elektrischen Widerstand bei einer Frequenz von 12,5Hz mit einem Rechtecksignal durch einen Caco-2-Zellmonolayer misst, durchgeführt. Aufgrund dieser Daten konnte eine Auswahl von 4 PE (Bromelain, DOC, Chilosan und Na-Carpat) generiert werden, deren Anforderungen hinsichtlich der Impedanzspektroskopie und deren Einsatzfähigkeit bezüglich des experimentellen Aufbaus weiter untersucht werden. Der PE soll sich außerdem durch eine einfache Handhabbarkeit im Einsatz auszeichnen. So ist ein geeigneter PE im RPMI-Medium gut lösbar, lässt sich leicht aus den Zellkulturkammern und Kanälen ausgewaschen und weist eine hohe Viskosität auf.

Eine Anforderung bei Zugabe von PE zum RPMI-Nährmedium ist, dass sich das Impedanzspektrum des reinen RPMI-Medium von dem RPMI-Medium mit beigefügten PE so wenig wie möglich unterscheidet. Das entscheidende Maß war hier die Differenz*(siehe Gl.41). Bei der Berechnung der Differenz* wird die Impedanz einer bestimmten Frequenz des reinen RPMI-Mediums von der Impedanz bei gleicher Frequenz des mit PE vermengtem RPMI-Mediums subtrahiert. Diese Differenz wird durch den Impedanzwert des reinen RPMI-Mediums dieser Frequenz dividiert. Die Differenz* beschreibt nun prozentartig Abweichungen von einem Soll-Werts. Der Soll-Wert ist der Impedanzmesswert einer Frequenz der reinen RPMI-Lösung. Die Summe u dieser Differenzen* läuft über alle Frequenzmesspunkte (siehe Gl. 41). Als Gegenprobe und Vergleichswert wird auch die Summe v der Differenzen der Absolutbeträge der Impedanzen wie in Gl.42 gebildet und als Maß herangezogen.

$$u = \sum_{FMP=i=1}^{100} \text{Differenz}^* = \sum_{FMP=i=1}^{100} \frac{|Z_{RPMI}(\omega_i) - Z_{RPMI+PE}(\omega_i)|}{Z_{RPMI}(\omega_i)}$$

Gl. 41: Summe u; Summe prozentartiger Abweichungen von Z_{rpmi}

$$v = \sum_{FMP=i=1}^{100} |Z_{RPMI}(\omega_i) - Z_{RPMI+PE}(\omega_i)|$$

Gl. 42: Summe v; Summe der Abweichungen von Z_{rpmi}

Für die Messwerte aller 8 Zellkulturkammern werden diese Summen u und v gebildet und daraus mit Gleichung 43 und 44 Mittelwerte berechnet. Je kleiner die Mittelwerte y und x sind, desto besser wird die Anwendbarkeit des PE in der Impedanzspektroskopie bewertet.

$$y = \frac{1}{8} \sum_{Topf=1}^8 u_{Topf}$$

Gl.4 3: Mittelwert der Summe u

$$x = \frac{1}{8} \sum_{Topf=1}^8 v_{Topf}$$

Gl.4 4: Mittelwert der Summe v

(Neben y und x wird die Standardabweichung der in den Summen u und v addierten Beiträge berechnet. Die

Standardabweichung zeigt, unter anderem, ob „vereinzelte irreguläre Messpunkte“ (vgl. Kap.4.1.41) bei der Berechnung der Mittelwerte beteiligt waren, indem die Mittelwerte kleiner sind oder in etwa in der gleichen Größenordnung liegen wie die entsprechenden Standardabweichungen.)

4. Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Funktionsprüfung des experimentellen Aufbaus dargestellt. Das Messsystem und die Messmethode werden dabei schrittweise verbessert und für Problemstellungen Lösungen gesucht und umgesetzt. Im zweiten Teil werden Messergebnisse vorgestellt, die mit dem verbesserten Aufbau aufgenommen wurden. So werden von insgesamt 6 im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bioimpedanzmessungen die elektrischen Messergebnisse der letzten vier (3., 4., 5. und 6. Bioimpedanzmessung) vorgestellt, da die ersten beiden zur Evaluierung des Messaufbaus und zur Optimierung des Messsystems durchgeführt wurden. Bioimpedanzmessungen wurden mit verschiedenen Chiptypen durchgeführt und die elektrischen Messparameter den jeweiligen Anforderungen angepasst. Einige Messparameter sind in Kapitel 3.4 als Standardparameter festgelegt worden und weitere werden im Folgenden angegeben.

4.1 Charakterisierung des Messsystems

In Abbildung 21 ist der Messaufbau schematisch dargestellt. Er wurde hinsichtlich seiner Funktionalität überprüft und hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit mit nicht-lebenden Proben charakterisiert. Es werden einzelne Bestandteile des Messaufbaus allein und in Kombination mit anderen Bestandteilen auf ihre Funktionstüchtigkeit getestet. Das LabVIEW-Programm ist an den meisten Testmessungen beteiligt, da LabVIEW die Aufnahme von Impedanzspektra erleichtert.

4.1.1 Funktionstüchtigkeit des LCR-Meters

Anfänglich wird das LCR-Meter für die zwei Extremfälle, und zwar mit einem „offenen Schaltkreis“ und einem „kurz geschlossenen Schaltkreis“ getestet (vgl. Tabelle 7: (a) und (b)). Bei der „offenen“ Messung liegen die Koaxialkabel, die mit den Signalbuchsen des LCR-Meters verbunden sind, unverbunden, also mit offenem Ende (an der Luft). Der Impedanzwert einer offenen Messung mit erfolgreichem Testergebnis ist für alle Messfrequenzen sehr groß und die Phasenverschiebung, durch den kapazitiven Charakter der 2 freiliegenden Kabel, nahe 90° . Die Kurzschlussmessung hingegen soll für alle Frequenzen die Impedanz 0Ω und die Phasenverschiebung 0° liefern. Abweichungen von diesen Sollwerten bedeuten Einbußen der Messgenauigkeit. Die Messung eines exakt dimensionierten RC-Gliedes (vgl. Tabelle 7: (c)), zeigt die Funktionstüchtigkeit des LCR-Meters im Einsatzgebiet der impedanzspektroskopischen Analyse bezüglich einfacher Elektronenleiter.

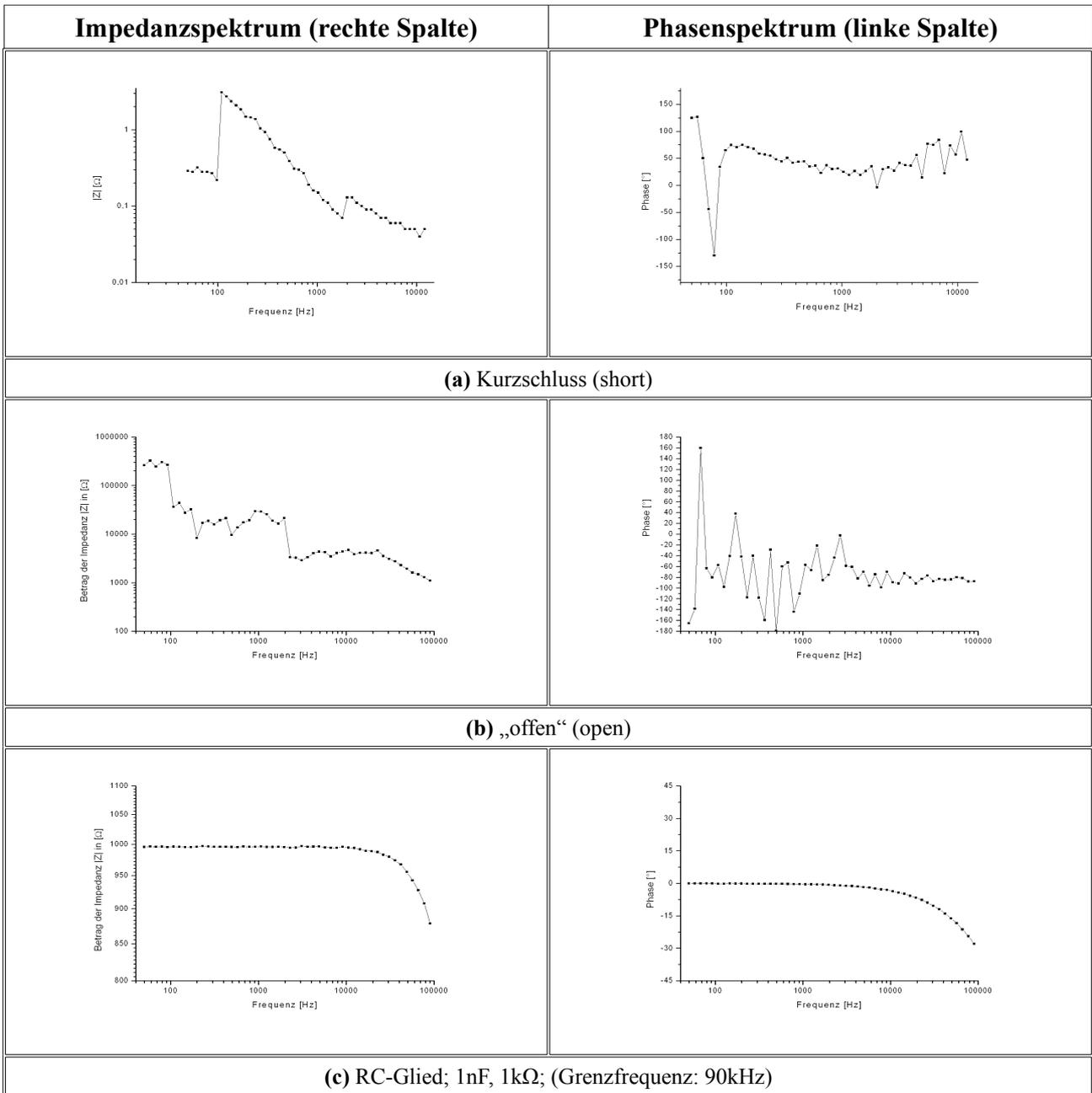


Tabelle 7: Zusammenfassung der Funktionsprüfung des LCR-Meters: Dargestellt werden Impedanzspektra (rechte Spalte; (a), (b) und (c)) und Phasenspektren (linke Spalte; (a), (b) und (c)) in einem Frequenzbereich von 40Hz-100kHz.

4.1.2 Funktionsprüfung des MUX

Der Multiplexer (MUX) hat die Aufgabe die Signal- und Messelektroden des Messmoduls mit den jeweils passenden Messpolen des LCR-Meters (HIOKI) zu verbinden. Der MUX ist als ein Relais-tower mit elektromechanischen Relais ausgeführt. Mit 4 Eingängen belegt er insgesamt 32 Ausgänge für 8 messtechnisch unabhängige Zellkulturkammern. Gesteuert werden die einzelnen Relais des MUX von der LabVIEW- Steuerprogrammierung, die auf einem PC betrieben wird.

Der MUX wird wie das LCR-Meter, für die zwei Extremfälle des „offenen Schaltkreises“ (siehe Tabelle 8 **(a)**) und des „kurz geschlossenen Schaltkreises“ (siehe Tabelle 8 **(b)**), sowie für eine exakt dimensioniertes RC-Glied (siehe Tabelle 8 **(c)**) getestet. Das Impedanzspektrum und das Phasenspektrum sind in Tabelle 8 wie Bodediagramme dargestellt, nur sind Phasen- und Impedanzspektrum nebeneinander dargestellt.

In der Tabelle 8 zeigt die Kurzschlussmessung **(a)** bei niederen Messfrequenzen eine Störung. Die Aufnahme von Impedanzspektren beginnt bei niedrigen Messfrequenzen. Da der Kontakt zwischen LCR-Meter und Elektroden durch „Nachschwingen“ der Relais des MUX kurzzeitig nicht gewährleistet ist, zeigt der Impedanzmesswert einen um fünf Größenordnungen zu großen Wert. Indem eine Verzögerung zwischen dem Schalten der Relais und dem Beginn der Messaktivität in die LabVIEW-Programmierung implementiert wurde, konnte diese Störung behoben werden.

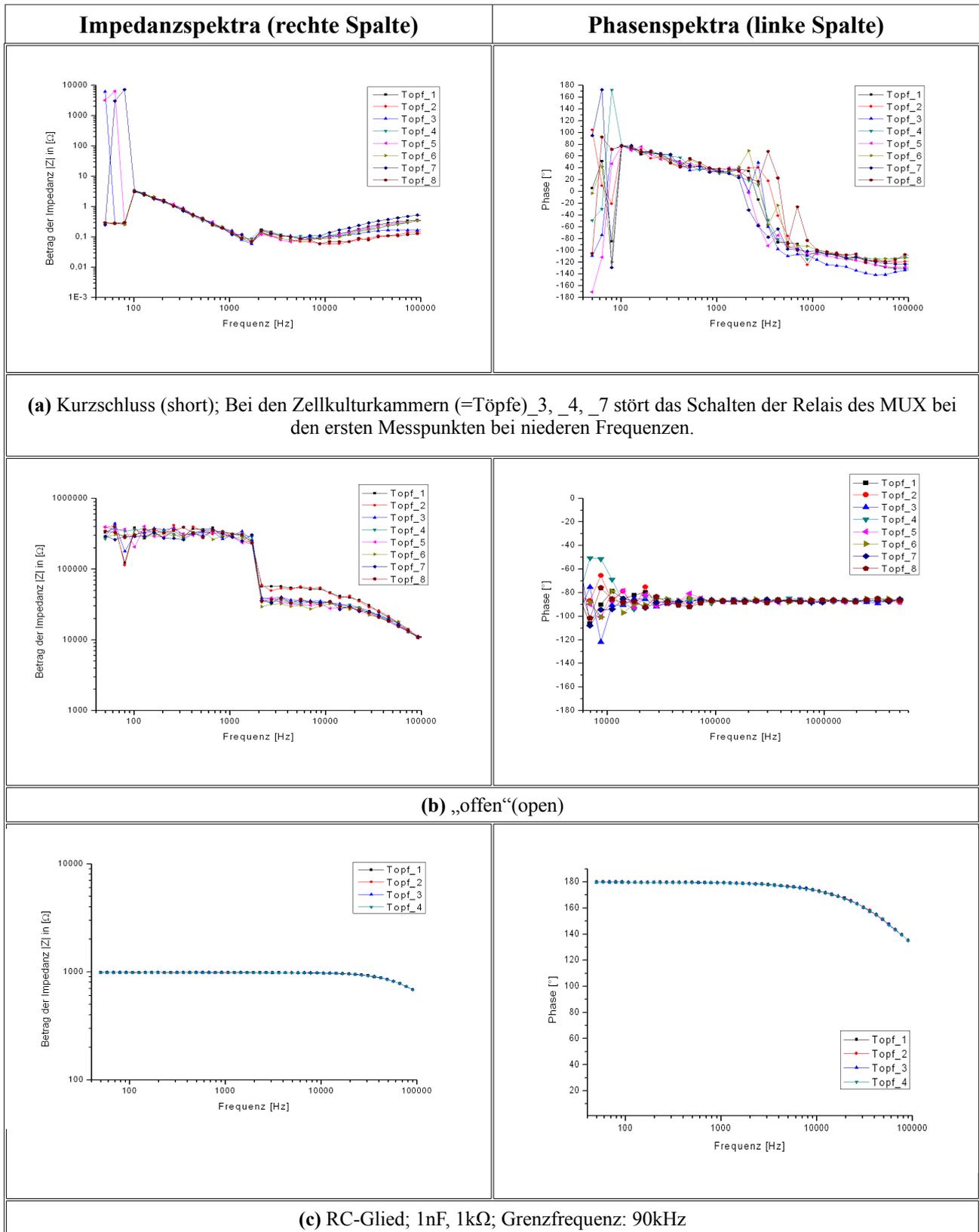


Tabelle 8: Zusammenfassung der Funktionsprüfung des MUX-Meters: Dargestellt werden Impedanzspektra (rechte Spalte; (a), (b) und (c)) und Phasenspektra (linke Spalte; (a), (b) und (c)) in einem Frequenzbereich von 40Hz-100kHz. Eine Zellkulturkammer wird in dieser tabellarischen Zusammenfassung Topf genannt.

4.1.3 Funktionsprüfung des Messmoduls

Das Messmodul besteht im Wesentlichen aus dem Chip, dem FlexiPERM und der Top-Elektroden Decke. Die einzelnen Bauteile, sowie der Zusammenschluss dieser Bauteile zum Messmodul werden getestet und bewertet. Die Ergebnisse und die im Weiteren ausgeführten Optimierungen sind Thema dieses Kapitels.

Funktionsprüfung der Chips:

Standardmäßig werden die lithographisch erzeugten Leiterstrukturen auf der Chipoberfläche mit einem Mikroskop auf Unterbrechungen und Kurzschlüsse untersucht. Eine Auswahl intakter Chips wird daraufhin in den PCI-Stecker eingeschoben und die Funktionstüchtigkeit jeder Elektrode mit einem einfachen Amperemeter (deren Messspitze in einen Tropfen einer NaCl-Lösung auf der Bottom-Elektrode taucht) elektrisch überprüft. Eine Dokumentation einer elektrischen Widerstandsmessung im Zuge der Qualitätskontrolle beim „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ ist in der Tabelle 9 dargestellt.

Sensorfeld (bzw. Zellkulturkammer; folgt dem System in Abb.40)	Gold-Struktur		Platin-Struktur	
	Zur äußeren Elektrode in [Ω]	Zur inneren Elektrode in [Ω]	Zur äußeren Elektrode in [Ω]	Zur inneren Elektrode in [Ω]
1	122,4	89,6	836	836
2	48,8	73,5	542	542
3	80,22	88,8	848	833
4	46,5	58,4	456	535
5	91,3	92	988	845
6	42,9	56,9	404	528
7	123	113,2	1050	950
8	66	58,4	595	525

Tabelle 9: Elektrischer DC- Widerstandsmessung der Leiterstrukturen auf dem Chip: Von den Kontakten des 37-Pol-Steckers der Halterung zu den ringförmigen (Bottom)-Elektroden.

Anhand Tabelle 9 kann leicht abgelesen werden, dass

- (a) der elektrische Gleichstromwiderstand entlang der Goldstrukturen etwa um den Faktor 10 kleiner ist als der von Platinstrukturen.
- (b) der elektrische Gleichstromwiderstand entlang der Leiterbahnstrukturen (von den Pins an der Glassubstratkante zu den Elektroden), die unterschiedlich lang sind, variiert.

Funktionsfähigkeit des Fluidik-Systems: In der ersten (Pilot) Bioimpedanzmessung wurde das Messmodul im Einsatz getestet und anschließend wurden einige Verbesserungen vorgenommen, die für alle weiteren (Bioimpedanz-) Messungen beibehalten wurden. So wurden die Kanäle im FlexiPERM, die die Zellkulturkammern miteinander verbinden neu angeordnet und das Messmodul, wie nun veranschaulicht werden soll, gegenüber Flüssigkeitsaustritt abgedichtet. Der im Kapitel 2 beschriebene Aufbau bleibt unverändert und wird im Folgenden nur ergänzt.

Abdichtung entlang des Nährflüssigkeitsstroms:

Abbildung 52 zeigt in (1), (2) und (3), Orte die am Messmodul anders als in Kapitel 2 vorgestellt abgedichtet wurden.

- (1) Die Plastik Düsen im Deckel des RPMI-Reservoirs wurden mit Sylgard [30] eingeklebt.
- (2) Der Zwischenraum zwischen innerer und äußerer Top-Elektrode, wo ein Teflonschlauch die elektrische Isolationsschicht zwischen den beiden Elektroden bildet, wurde mit Sylgard abgedichtet (vgl. Abb.49).
- (3) Der Raum zwischen Schraube und Schraubengewinde, zwischen äußerer Top-Elektrode und Epoxidharzblock wurde mit Sylgard abgedichtet und eine Sylgard-Deckschicht über die Oberfläche des Epoxidharzblockes gelegt (vgl. Abb.49).
- (4) Mit Microset-Kleber [27] wird die äußere FlexiPERM-Seitenwand am Glassubrat festgeklebt (vgl. Abb.50 (4) bzw. Abb.49).

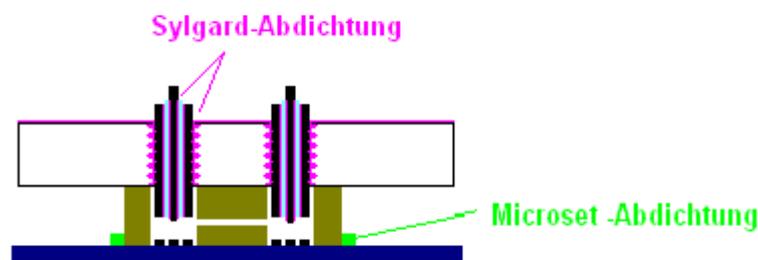


Abbildung 49: schematische Darstellung eines Schnitts durch das Messmodul und den mit Microset-Kleber und Sylgard neu abgedichtete Stellen.

An Orten, wo mit Microset-Kleber [27] abgedichtet wird, wird der Kleber nach jeder Bioimpedanzmessung entfernt und vor jeder Bioimpedanzmessung wieder neu aufgebracht. Die Abdichtung mit Sylgard bleibt hingegen dauerhaft (zumindest bis zum Ende der Messtätigkeiten dieser Arbeit) bestehen.

Durchmischung:

Nährflüssigkeitsaustausch in Abhängigkeit der räumlichen Anordnung der Fluidik-Kanäle: Bei der ersten Bauform, wie sie in Abbildung 50 und Abbildung 51 gezeigt wird, war der Nährflüssigkeitsstrom nicht eindeutig gerichtet und die Zellkulturkammern wurden ungleichmäßig mit frischem RPMI-Nährmedium durchmischt. Deshalb wurden die Bohrungen im FlexiPERM, welche die Kanäle bilden, neu angeordnet (vgl. Abb.51 (alt) mit Abb.21 (neu)), sodass der Nährflüssigkeitsstrom nacheinander die Zellkulturkammern durchströmt.

Von der 2. bis zur 6. Bioimpedanzmessung, also bis zum Ende der Messtätigkeit dieser Arbeit, kam dieser modifizierte Aufbau des Messmoduls zum Einsatz.

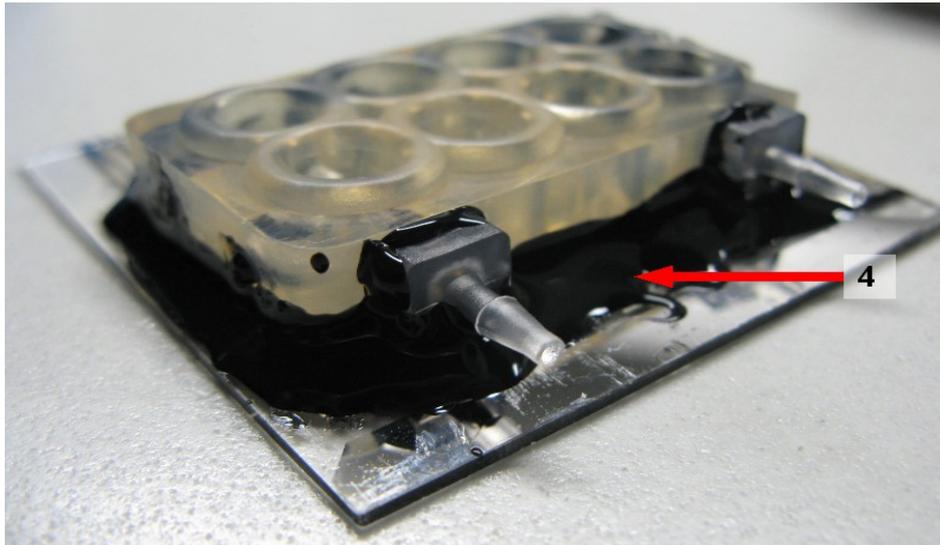
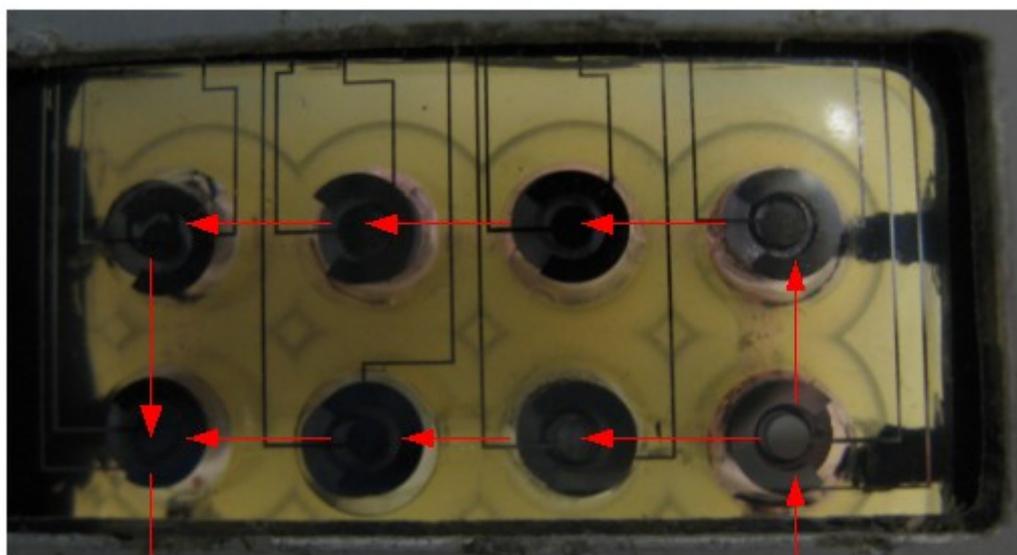


Abbildung 50: Foto der alten Bauform des Messmoduls: Gezeigt wird der Chip mit dem Biokleber (Mikroset) aufgeklebten FlexiPERM und eingeklebten Düsen, wie er bei der 1. Bioimpedanzmessung verwendet wurde.



RPMI-Out

RPMI-In

Abbildung 51: Foto der Unterseite der alten Bauform des Messmoduls: Rote Pfeile zeigen durch die Bohrungen und in Richtung des RPMI-Nährmediumstroms bei der ersten Bioimpedanzmessung.

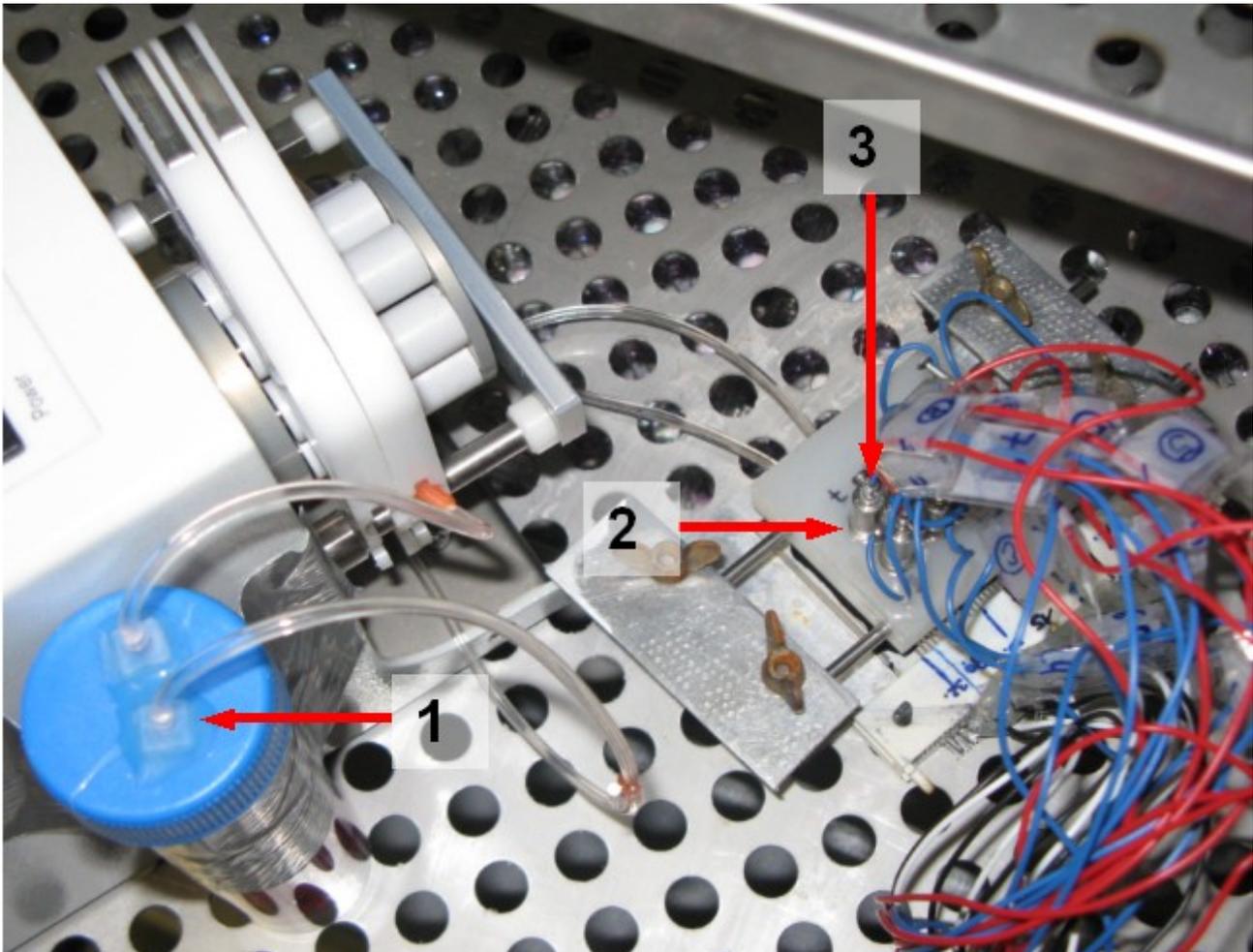


Abbildung 52: Foto des Messaufbaus im Zellkulturschrank; links im Bild ist die Schlauchquetschpumpe und das RPMI-Reservoir. Rechts ist das Messmodul. 1,2 und 3 zeigen Orte, wo mit Sylgard eingeklebt oder mit Sylgard abgedichtet wurde.

4.1.4 Impedanzspektroskopische Untersuchung verschiedener Flüssigmedien

LabVIEW, LCR-Meter, MUX und Messmodul bilden hier gemeinsam das Messsystem. Die Chip-Elektroden stehen den Top-Elektroden im geschlossenen Messmodul in 2mm Abstand gegenüber und bestimmen die Impedanz des dazwischenliegenden Mediums. Zunächst wird das Impedanzspektrum von wässriger NaCl-Lösungen variierender Salzkonzentration, von destilliertem Wasser und vom RPMI-Medium (vgl. Abb.49) aufgenommen. Anhand der Ergebnisse dieser Messungen kann neben der Elektrodenpolarisation, das Auflösungsvermögen, die Stabilität gegenüber kleinen Positionsverschiebungen der Top- bezüglich den Bottom- Elektroden und die Langzeitstabilität (Driftverhalten) diskutiert werden. Zwischen den Messungen werden die Zellkulturkammern gründlich gereinigt. Erst wird mit destilliertem Wasser und dann mit dem zu messenden Medium mehrfach gespült. Nach erneutem Anfüllen mit dem Medium werden dann die impedanzspektroskopische Messungen durchgeführt. Erwähnenswert ist die Messung von destilliertem Wasser, wo schon wenige (z.B. aus vorangegangenen Messungen verschleppte) Salzionen genügen, um das Ergebnis maßgeblich zu verfälschen.

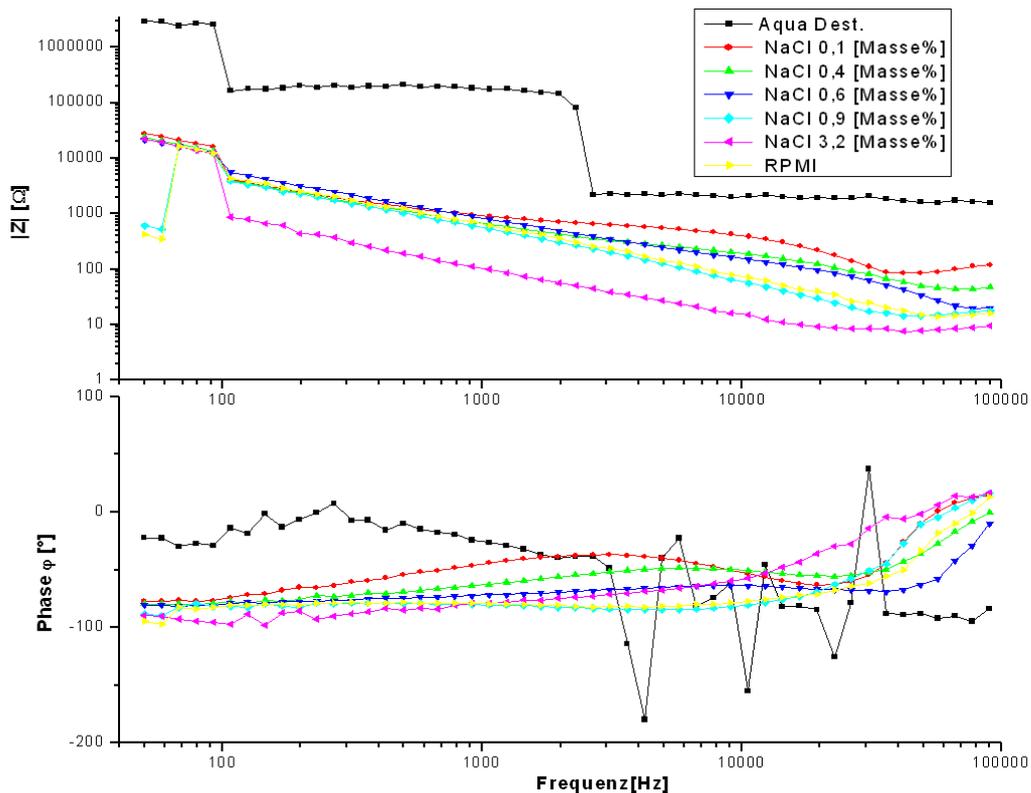


Abbildung 53: Bode Diagramm; Impedanz von destilliertem Wasser, verschieden konzentrierter wässriger Kochsalzlösung und RPMI-Nährmedium. Aufbau der Messung: LabVIEW, LCR-Meter; MUX; Messmodul, **ringförmige Elektroden**.

Das Bodediagramm von destilliertem Wasser, das mit den ringförmigen Bottom-Elektroden-Chip aufgenommen wurde (siehe Abb.53) zeigt, dass das Impedanzspektrum von destilliertem Wasser ein Ergebnis ähnlich einer „offenen“ Messung zeigt (vgl. Kap.4.1.1 bzw. Kap.4.1.2.) Hier ist offensichtlich die Leitfähigkeit im Vergleich zur Spannung, die an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt abfällt, zu klein (vgl. Elektrodenpolarisation; Butler-Volmer-Gleichung, Kap.1.5.2). Die Impedanzwerte sind gegenüber der NaCl-Konzentration gut aufgelöst. Das Impedanzspektrum der RPMI-Nährlösung gleicht dem der physiologischen Kochsalzlösung (NaCl 0,9 [Masse%]).

Vor dem Hintergrund, dass sich zwischen dem Frequenzmesspunkt bei 90Hz und dem bei 100Hz manche Impedanzmesswerte um einen Faktor 10-15 unterscheiden (vgl. Abb.53 NaCl 0,9%, NaCl 3,2% und RPMI-Lösung), müssen die Impedanzmesswerte bei Frequenzen kleiner 100Hz kritisch analysiert werden. Es kann als gegeben betrachtet werden, dass diese „Sprünge“ in der Impedanz nicht den wahren elektrischen Eigenschaften des vermessenen Mediums entsprechen und somit als Systemfehler interpretiert werden müssen. Da diese „Sprünge“ unabhängig vom Chiptyp und der in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden bestehen bleiben, wird beim Auswerten der Ergebnisse von Bioimpedanzmessungen auf diese oft stetig bei gleichen Frequenzen auftauchenden Sprünge hingewiesen oder diese Frequenzbereiche nicht berücksichtigt.

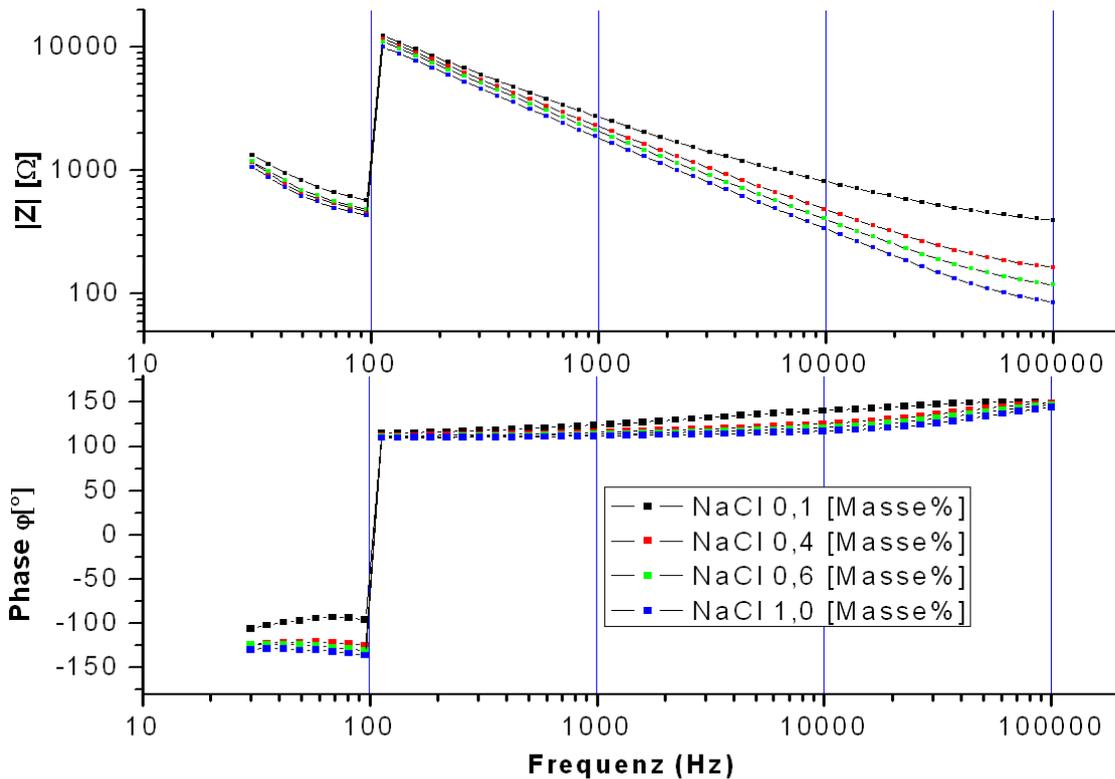


Abbildung 54: Bode-Diagramm von vier verschiedenen konzentrierter wässriger Kochsalzlösung; Aufbau der Messung: LCR-Meter; MUX; fluidic System; **IDES-Elektroden**.

Die Bodediagramme in Abbildung 53 wurden mit dem „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ und die in Abbildung 54 mit dem IDES-Chip aufgenommen. Aus dem Vergleich der Bodediagramme in Abbildung 53 und Abbildung 54 wurde unter anderem gefolgert, dass die IDES-Elektroden unempfindlicher als die ringförmigen Bottom-Elektroden gegenüber kleinen räumlichen Ausrichtungsveränderungen der Top- in Bezug auf die Bottom-Elektroden sind. Zwischen den Messungen, beim Austausch des zu messenden Mediums, wird die Lage der Top-Elektroden zu den Bottom-Elektroden methodenbedingt verändert. (Während einer Bioimpedanzmessung bleiben die Elektrodenpositionen entlang der gesamten Messdauer unverändert.) Aus dem Vergleich von Abbildung 53 und Abbildung 54 wird ersichtlich, dass durch Messung mit dem IDES-Chip im Vergleich zur Messung mit dem „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ die Impedanzwerte sich entlang der Frequenz monoton und gleichmäßig gegenüber der Salzkonzentration verhalten.

4.1.4.1 Stabilität der Elektroden und Auflösungsvermögen

Über die gesamte Versuchsdauer müssen zu definierten Bedingungen reproduzierbare Messwerte gemessen werden. So müssen die Elektroden auf Langzeitstabilität geprüft werden. Es zeigt sich, dass die Elektroden mit zunehmender Verwendung, stabilere Werte liefern. „Sprünge“, und Irreguläre Messpunkte wie sie im Folgenden definiert werden, kamen bei wiederholter Messung im RPMPI-Medium weniger häufig oder/und durchgängig bei den gleichen Frequenzmesspunkten (FMP) vor.

Klassifizierung häufig auftretender und nicht reproduzierbarer „Ausreißer“ der Impedanz bei der Messung:

- I. „Sprünge“ bzw. „Sprungstellen“: Damit sind „Ausreißer“ gemeint, die typischerweise bei Frequenzmesspunkten (FMP) zwischen 50Hz und 150Hz auftreten. Dabei „springt“ der Impedanzmesswert zwischen zwei FMP um eine oder zwei Größenordnungen (vgl. z.B. Abb.53 und 54).
- II. „Irreguläre Messpunkte nahe 1kHz“: Dabei streben Impedanzmesswerte im Messbereich zwischen 1kHz und 2kHz gegen Null.
- III. „Vereinzelte irreguläre Messpunkte“: Damit sind einzelne Impedanzmesswerte gemeint, die einen unvergleichbar höheren oder niedrigeren Impedanzwert annehmen als wie Impedanzwerte in unmittelbarer Zeit- oder Frequenznachbarschaft.

Beim Auftreten von „Ausreißern“ stimmen die detektierten Impedanzspektren von Elektrolytlösungen variierender Salzkonzentration in keiner Weise mit den theoretischen Vorgaben des Kohlrauschgesetzes (vgl. Kap.1.3.1.1) unter Berücksichtigung der Frequenzabhängigkeit der Leitfähigkeit (Kap.1.3.2.1 und Kap.1.4) überein. Dabei wurde beobachtet wie gut sich aus den gemessenen Impedanzwerten verschiedener Salzkonzentration festgehaltener Frequenz eine Kohlrauschgerade fitten lässt.

Um diese „Ausreißer“-Effekte experimentell zu untersuchen und einzugrenzen wurden die Top-Edelstahlelektroden mit Schleifpapier (P600) gründlich abgeschliffen, um eine frische, verunreinigungsfreie, Oberfläche freizulegen. Daraufhin mehrte sich das Auftauchen von „Sprüngen“ und von „Irregulären Messpunkten“ wieder. Sobald aber wieder längere Zeit im (RPMI-) Kulturmedium gemessen wurde, stellten sich nahezu die ursprünglichen Werte von vor dem Schleifen wieder ein (vgl. mit Abb.55). Dies kann darauf hindeuten, dass sich durch die Messung im Kulturmedium, Moleküle an der Elektrodenoberfläche anhaften und so den Ladungsaustausch an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt stabilisieren. Mit zunehmender Verwendungsdauer der Elektroden im Kulturmedium wurde eine leichte Drift zu höheren Impedanzwerten bei niedrigen Frequenzen beobachtet. Dies kann als Hinweis auf eine Anlagerung einer schlecht leitenden Schicht von beispielsweise organischen Molekülen aus dem Nährmedium, oder auf eine Einlagerung von Sauerstoff in das Elektrodenmaterial (vgl. Kap.1.5.2) gedeutet werden. Umgekehrt steigt, wie in Abbildung 54 zu erkennen ist, die Impedanz bei hohen Frequenzen durch die Wirkung eines vorherigen Abschleifens.

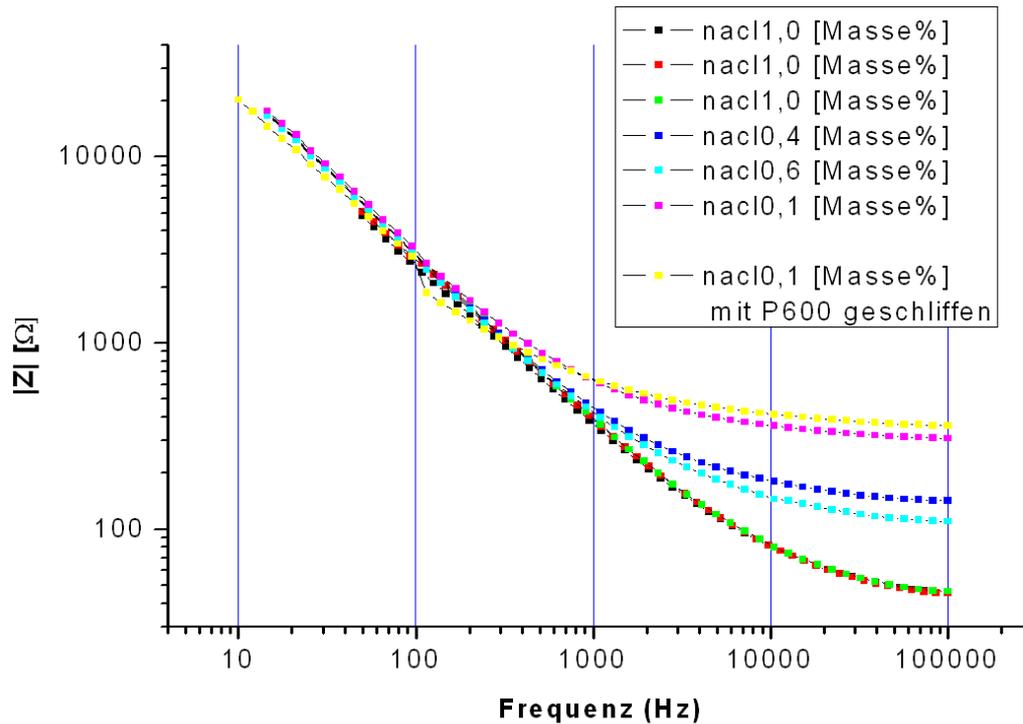


Abbildung 55: Impedanzspektra verschieden konzentrierter Kochsalzlösungen, aufgenommen mit der Messkonfiguration: LCR-Meter, MUX und IDES-Elektroden - Schwarze, rote und grüne Kurve zeigen die Langzeitstabilität der Elektroden bei mehrmaligem Verwenden desselben Elektrolyten. Gelbe und Rote Kurve zeigen den Einfluss des Abschleifens der Edelstahl-Top-Elektroden.

Abbildung 55 zeigt impedanzspektroskopische Messungen von verschieden konzentrierten wässrigen Kochsalzlösungen. Die 1,0% wässrige NaCl-Lösung wurde drei-mal hintereinander in einstündigem Abstand gemessen. Diese 3 Messkurven (schwarze, rote und grüne Kurve in Abb.55) bestehen aus Werten, die sehr dicht beisammen liegen und die sich auch über die längere Versuchsdauern decken (vgl. Kap.4.3.2 mit der Beschreibung zu Abb.64). Die Langzeitstabilität wird dadurch bestimmt, dass der Impedanzmesswert einer Frequenz über einen längeren Messzeitraum gleich bleibt, sofern eine Impedanzänderung nicht mit biologischen Mechanismen der Caco-2-Zellen zumindest mittelbar in Zusammenhang gestellt werden kann. So finden sich in nachfolgenden Kapiteln weitere Auswertungen zur Messung der Langzeitstabilität. In Kapitel 4.3.2 wurde die Langzeitstabilität der gesamten Messumgebung, inklusive der Beiträge des RPMI-Mediums, der Zellreste und anderer biologischer Rückstände zur Impedanz, über die gesamte Versuchsdauer vermessen. In Abbildung 96 zeigt den alleinigen Einfluss des sich aufgrund des Stoffwechsels der Caco-2-Zellen verändernden Impedanzspektrums des RPMI-Mediums.

Abbildung 54 zeigt die Wirkung des Schleifens der Edelstahl-Top-Elektroden auf die Impedanz wässriger 0,1%iger Salzlösung. In Abbildung 54 kann die Polarisierung der Elektroden entlang des Impedanzspektrums verfolgt werden. Ähnlich einem elektrischen Hochpass ist die Impedanz bei niederen Frequenzen höher und fällt mit steigender Frequenz stetig (logarithmisch) ab (vgl. Kap.2.2.3).

4.2 Messungen an Zellkulturen - Bioimpedanzmessungen

Nachdem das Messsystem getestet und charakterisiert wurde, kann es für Messungen an Zellkulturen eingesetzt werden. Die Vorgehensweise in der Vorbereitungsphase sowie die Einstellungen, die als Standardparameter in allen Bioimpedanzmessungen Anwendung finden, werden im Kapitel 3 angeführt. Das betrifft die Parameter zur Nährstoffversorgung, die Randbedingungen für das Kultivieren von Caco-2-Zellen im Brutschrank und die elektrischen Messparameter.

4.2.1 Ein Überblick

Zur besseren Orientierung folgt ein kurzer Überblick über die 6 Bioimpedanzmessungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die ersten zwei Bioimpedanzmessungen wurden als Pilot geführt, das heißt, dass für diese Messungen keine elektrischen Messergebnisse ausgewertet wurden.

Da die Messparameter für unterschiedliche Untersuchungszwecke geändert wurden, wird im Folgenden eine tabellarische Übersicht (siehe Tabelle 10) der Einstellungen angeführt. In Kapitel 3 wurden Standard-Einstellungen beschrieben, daher werden nur die Parameter angeführt, die von denen in Kapitel 3 beschriebenen abweichen.

In Tabelle 10 werden in der ersten Spalte die Bioimpedanzmessungen chronologisch angeführt. Da die erste und zweite Bioimpedanzmessung keine elektrischen Messergebnisse lieferten, werden keine elektrischen Parametereinstellungen angegeben. Die mit „Frequenzbereich und Auflösung“, „Einstellungen am LCR-Meter“ und „Dauer der Bioimpedanzmessung“ bezeichneten Spalten geben die Parametereinstellungen der elektrischen Messung an. Die Einträge in der Spalte mit dem Titel „Besonderheiten/Ergebnisübersicht“ geben einen Überblick über die Messungen und Messergebnisse.

Nr.	Bottom-Elektroden	Frequenzbereich und Auflösung	Einstellungen am LCR-Meter	Dauer der Bioimpedanzmessung	Besonderheiten/Ergebnisübersicht
1 2	ringförmige Gold-Elektroden	k.A.	k.A.	23 Tage	Aufgrund von Leckstellen entlang des Fluidik-Systems, waren die Zellkulturkammern am Ende der Messtätigkeit bereits ausgetrocknet oder kontaminiert. Die elektrischen Ergebnisse wurden nicht evaluiert.
pi lot	ringförmige Gold-Elektroden	k.A.	k.A.	7 Tage	Die Caco-2-Zellen wachsen mit hohem Bedeckungsgrad auf dem Glassubstrat und den Elektroden auf. Keine elektrischen Messergebnisse.
3	ringförmige Platin-Elektroden	40Hz bis 100kHz; mit 50 Messpunkten	AVE=8 times Speed; SLOW Delay=0,21[sek.]	7 Messtage; alle 2h eine IS-Messung (das entspricht insgesamt 83 IS-Messungen)	Der Zelllayer bedeckt die Chipoberfläche mit hohem Bedeckungsgrad. Die elektrischen Messergebnisse zeigen einen Anstieg der Impedanz über das Frequenzspektrum.
4	IDES- Platin-Elektroden	20Hz bis 100kHz; mit 100 Messpunkten	AVE=8 times Speed; SLOW Delay=0,21[sek.]	9 Messtage; alle 2h eine IS-Messung	Zellen der Passage 71, das ist höchste in dieser Arbeit verwendete Passage Zahl, werden zu Beginn ausgesät; Die elektrischen Messergebnisse zeigen einen Anstieg der Impedanz über ein Frequenzspektrum. Die optische Feststellung des Zellbedeckungsgrads der Chipoberfläche blieb aus.
5	IDES- Platin-Elektroden	1Hz bis 100kHz; mit 100 Messpunkten	AVE=8 times Speed; SLOW Delay=0,21[sek.]	11 Messtage; alle 2h eine IS-Messung	Messen eines Zelllayers mit hohem Zellbedeckungsgrad der Chipoberfläche
6	IDES- Platin-Elektroden	1Hz bis 100kHz; mit 100 Messpunkten	AVE=8 times Speed; SLOW Delay=0,21[sek.]	11 Messtage; alle 2h, +3 Tage nach der Bromelain Zugabe, jede h	Messen eines Zelllayers mit hohem Zellbedeckungsgrad der Chipoberfläche. Einsatz von Permeation Enhancers; Willentliche Beeinflussung der Tight Junctions/Aktivieren des parazellulären Ionenstroms.

Tabelle 10: Überblick über die durchgeführten in vitro Versuche an Caco-2-Zellgewebe (Bioimpedanzmessungen).

4.3 Messungen an Zellkulturen: Einzelergebnisse

In diesem Kapitel werden die optischen und elektrischen Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bioimpedanzmessungen vorgestellt, beschrieben und diskutiert.

4.3.1 Pilotmessungen und Änderungen am bisherigen Aufbau

Die ersten zwei Bioimpedanzmessungen wurden zur Evaluierung des Messaufbaus und zur Optimierung des Messsystems durchgeführt und werden deshalb als Pilot-Bioimpedanzmessungen angegeben. Diese wurden nach dem selben Schema durchgeführt wie alle weiter folgenden Bioimpedanzmessungen und zeigten erste Problemstellen und Erfolge.

4.3.1.1 Erste und Zweite Pilot-Bioimpedanzmessung

In der ersten Bioimpedanzmessung wurde die Funktionstüchtigkeit des Aufbaus und die praktische Methode getestet. Es folgten einige Änderungen am Messaufbau und der Methode in der Vorbereitungsphase, sodass bei der dritten Bioimpedanzmessung ein ausreichend funktionierender Aufbau und eine erprobte Methode vorlag.

Methode der 1. Bioimpedanzmessung: Das Messmodul wird in Alkohol (70%) gereinigt und über 24h in Alkohol eingelegt und danach vom Luftstrom in der Laminar-Flow-Box steril getrocknet. Caco-2-Zellgewebe wird mit Trypsin vom Untergrund einer Zellkulturflasche gelöst und in Einzelzellen aufgespaltet. Aus diesen Einzelzellen und frischer RPMI-Nährlösung wird eine Zellsuspension hergestellt mit der jede Zellkulturkammer mit 160µl befüllt wurde. Das Messmodul wird noch in der Laminar-Flow-Box geschlossen und dann mit allen anderen notwendigen Apparaturen in den Brutschrank gestellt und die Bioimpedanzmessung gestartet. Die Schlauchquetschpumpe für die kontinuierliche Versorgung mit Nährmedium wurde erst einen Tag nach Beginn der Messaktivität in Betrieb genommen, damit die Zellen sich während dieser Zeit an der Chipoberfläche absetzen und dort anhaften können.

Ergebnis der ersten Bioimpedanzmessung: Nach 23 Messtagen, am Ende der Bioimpedanzmessung, wird in sämtlichen Zellkulturkammern eine Kontamination der Zellkultur festgestellt. Die Ursache war entlang des Flüssigkeitsstroms austretende Nährlösung, welche einen Nährboden für eine Pilz-Infektionen darstellte. Die Auswertung des elektrischen Messergebnis zeigt keine Anzeichen eines Zellgewebeaufbaus.

Änderungen am Versuchsaufbau: Aufgrund eben beschriebener Problemstellen der ersten Bioimpedanzmessung wurde das Fluidik-System neu abgedichtet und die Kanäle im Messmodul neu angeordnet, weiters wurde die Pumpleistung der Schlauchquetschpumpe auf 3,5µl/s erhöht.

Wesentliche Änderungen der Methode: Das Messmodul wird bei allen folgenden Messungen an Zellkulturen (2.-6. Bioimpedanzmessung) erst 24h nach Zellaussaat geschlossen. Die Caco-2-Zellen setzen sich in dieser Zeit ab und binden an die Chipoberfläche, ohne dass die Top-Elektroden beim Eintauchen und gleichzeitigem Verdrängen der RPMI-Nährlösung Caco-2-Zellen über das Kanalsystem hinausspült wodurch

sich Populationen von Caco-2-Zellen entlang des ganzen Fluidik -System bilden würden.

4.3.1.2 Zelladhaesion und Zellbedeckung

Die zweite Bioimpedanzmessung belegte die Sinnhaftigkeit der durchgeführten Optimierungen nach der ersten Bioimpedanzmessungen insoweit, dass alle Zellkulturkammern frei von Infektionen blieben und dass die Nährstoffzufuhr die Zellkulturen ausreichend versorgte. 8 Tage nach der Zellaussaat, wurden mikroskopische Auf- und Durchlicht-Aufnahmen gemacht (siehe Abb.62, Abb.63, Abb.64 und Abb.65), die augenscheinlich konfluente Zellschichten zeigen. In diesem Versuch wurde der „Chip mit ringförmigen Gold-Elektroden“ verwendet. Abbildung 56 beschreibt eine mikroskopische Durchlichtaufnahme. Abbildung 57 zeigt, dass die Goldelektroden-Oberfläche von einem dichten Zellrasen bedeckt ist. Abbildung 58 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 59, wobei die Orientierung zwischen diesen beiden Aufnahmen an einem lichten Punkt, in Form eines Lift-Off-Fehlers, auf der Oberfläche leicht fällt.

Mikroskopische Aufnahmen der zweite Messung an Zellkulturen, 8 Tage nach Zellaussaat



Abbildung 56: Mikroskopische Durchlichtaufnahme; am linken Seitenrand hebt sich die Zellschicht, in Form eines Domes, vom Untergrund ab.

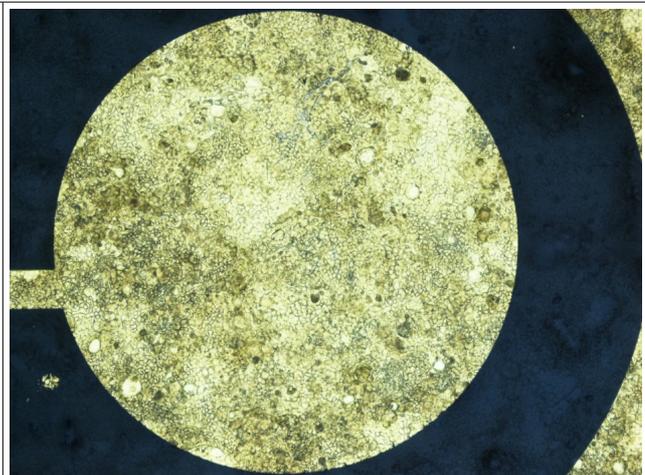


Abbildung 57: Mikroskopische Auflichtaufnahme; Die innere (Gold)-Elektrode ist vollständig überwachsen.

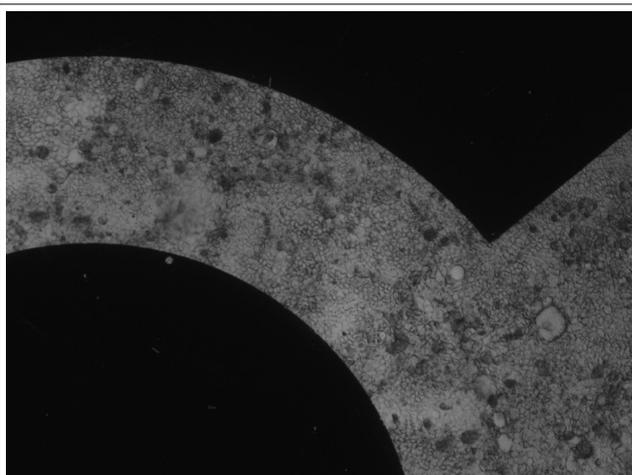


Abbildung 58: Mikroskopische Durchlichtaufnahme;

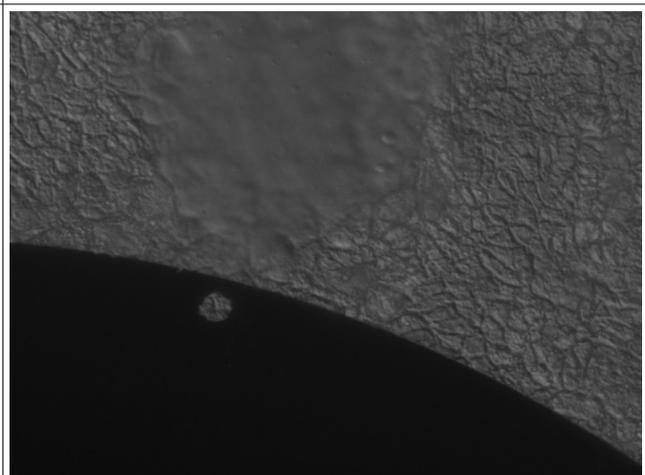


Abbildung 59: Auflichtaufnahme; vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 58; die Zellen bilden ein dichtes Gewebe.

4.3.2 Bioimpedanzmessung mit dem ringförmigen-Platin-Elektroden-Chip

Nachdem in der 2. Bioimpedanzmessung gezeigt werden konnte, dass die Caco-2-Zellen die Chipoberfläche mit den ringförmigen Gold-Elektroden im Zuge der Zellvermehrung mit konfluenten Zellschichten bedecken, war das Ziel der 3. Bioimpedanzmessung, mit ringförmigen (Bottom)-Platin-Elektroden das Bioimpedanzspektrum von Caco-2-Zellkulturen im Zuge der Zellvermehrung zu messen. Der Messaufbau entspricht jenem, der sich in der zweiten Bioimpedanzmessung schon bewährt hatte und in Kapitel 2 beschrieben ist, bzw. wie in Kapitel 4.1 beschrieben erweitert wurde. Die Messparameter sind in der Übersicht in Kapitel 4.3.1 und die Standardparameter in Kapitel 3.4 angeführt.

In diesem Kapitel werden relative ($Z/|Z_i|$) Bioimpedanzspektra präsentiert, deren Darstellung in Kapitel 3.5 beschrieben worden ist. Die relativen Bioimpedanzspektra stellen die elektrischen Messergebnisse dar, die für die Dauer von 188h nach Zellaussaat in verschiedenen Zellkulturkammern aufgenommen wurden. Neben den Diagrammen, die die zeitliche Veränderung im transepithelialen Impedanzspektrum dokumentieren, werden mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen präsentiert, die 188h nach Aussaat aufgenommen wurden und die die Zellbedeckung der Chipoberfläche zeigen. In Abbildung 56 wird eine mikroskopische Aufnahme beispielhaft erklärt. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wird augenscheinlich auf die Konfluenz des Caco-2-Zellmonolayers (vgl. Kap.1.6) geschlossen. Ziel der Auswertung ist es, eine Korrelation zwischen Konfluenz der Caco-2-Gewebeschicht und transepithelialer Impedanz zu finden.

Vermutlich aufgrund von Artefakten im Messsystem, lagen bei manchen Messungen keine sinnvollen Impedanzmesswerte („Ausreißer“; vgl. Kap.4.1.4.1) vor. So konnte der Quotient $|Z/|Z_i|$ nicht immer bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen (IS) Messung (z.B. für $|Z_j/|Z_1| = \infty$, wenn der Index j (mit $j>1$) die IS-Messungen der Messserie durchnummeriert) gebildet werden, wie im Folgenden anhand der Darstellung des elektrischen Messergebnisses für Zellkulturkammer_4 beispielhaft erklärt wird (siehe Abb.76 und 77). Auf der vertikalen Z -Achse ist die Änderung der Impedanz bezüglich der 10. impedanzspektroskopischen Messung ($|Z/|Z_{10}|$) aufgetragen. Das bedeutet, dass auch die horizontale Zeitachse in Abbildung 70 und 71 mit der Beschriftung „44h nach Aussaat“ startet. Es ist in den Beschriftungen der Abbildungen vermerkt, ab welchem Zeitpunkt nach Zellaussaat (bzw. ab der wievielten IS-Messung der Messserie) die Darstellung im Graphen beginnt.

In den Abbildungen 74, 76, 77 und 79 wurden wahlweise $|Z/|Z_i|$ -Werte Null bzw. Eins gesetzt, die wahrscheinlich keinem realen Wert des zu untersuchenden Messobjekts entsprochen haben. Auch bei den später folgenden (4.-6.) Bioimpedanzmessungen traten immer wieder „Ausreißer“ auf. Es wird des Weiteren an der jeweiligen Stelle darauf hingewiesen, wenn Impedanzmesswerte entfernt bzw. manipuliert wurden.

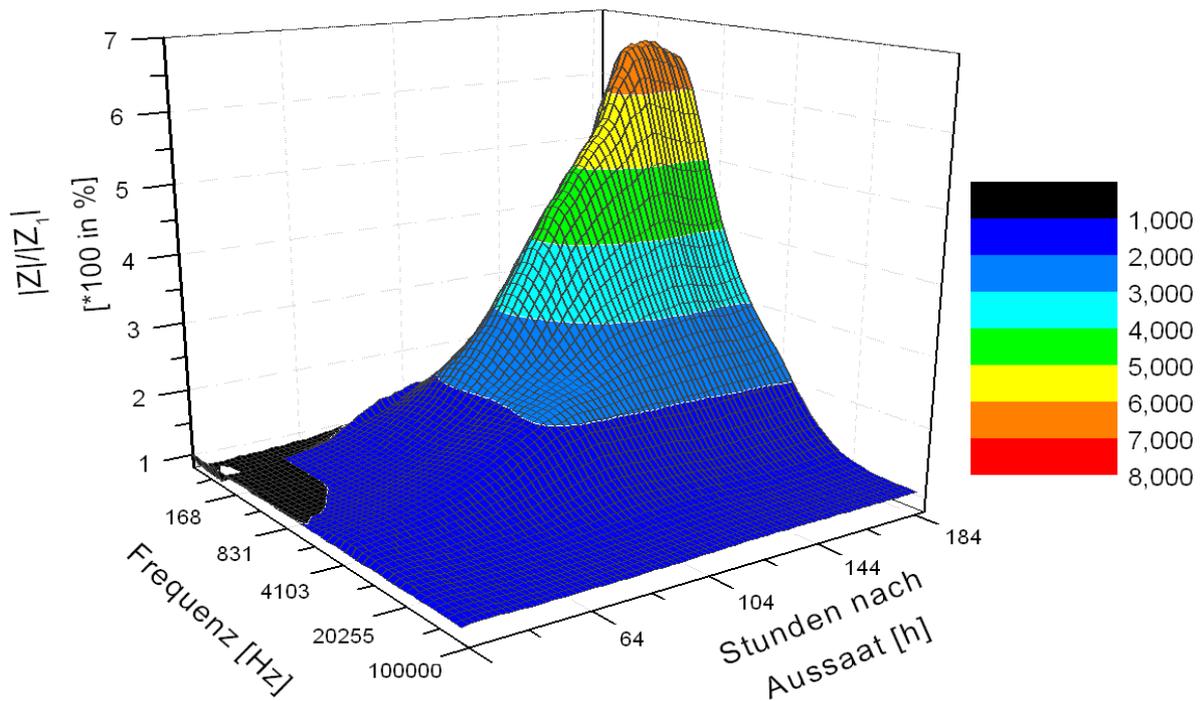


Abbildung 60: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum; **z-Achse:** relative Änderung des Impedanzspektrums ($|Z|/|Z_1|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung (die 24h nach Aussaat der Zellen statt gefunden hat), **x-Achse:** Frequenz in [Hz], **y-Achse:** die seit der Aussaat der Caco-2-Zellen vergangene Zeit [h]; Die Bedeckung der Bottom-Elektroden mit Caco-2-Zellgewebe ist in Abb.62 und 63 zu sehen. Der Caco-2-Zellmonolayer wurde anhand der mikroskopischen Aufnahmen als augenscheinlich konfluent eingestuft.

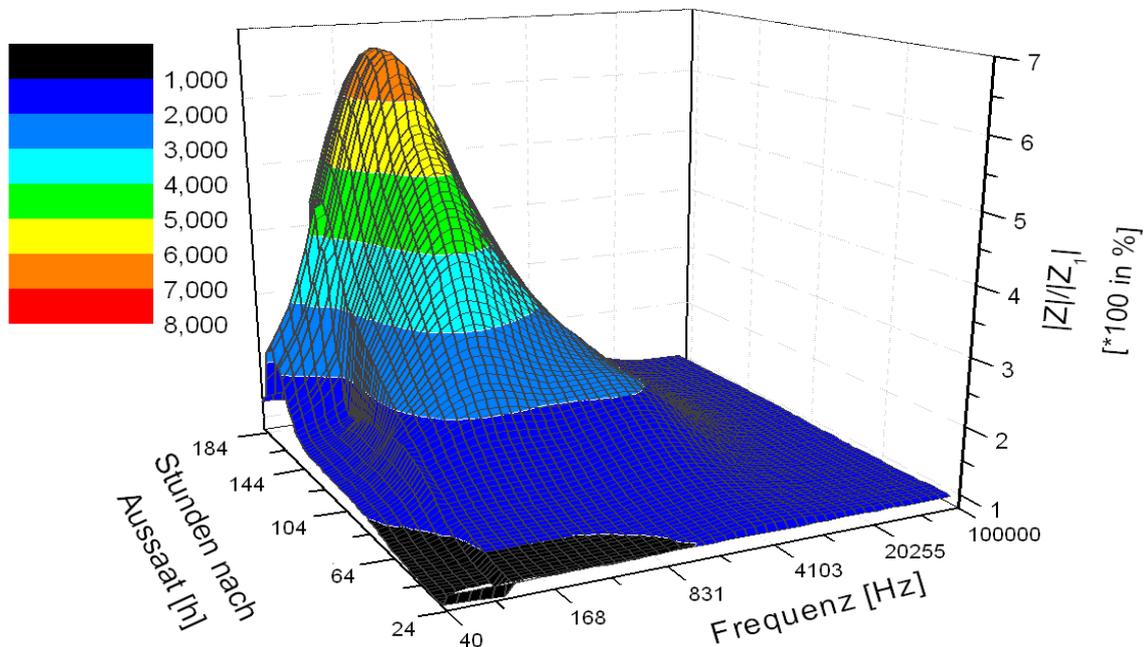


Abbildung 61: (gleicher Datensatz wie für Abb.60) 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum; **z-Achse:** - relative Änderung des Impedanzspektrums ($|Z|/|Z_1|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung; **x-Achse:** - Frequenz; **y-Achse:** - die seit der Aussaat vergangene Zeit; (Optisch evaluiert, lag (vgl. Abb.62 und 63) ein **konfluenter** Zellrasen vor!).

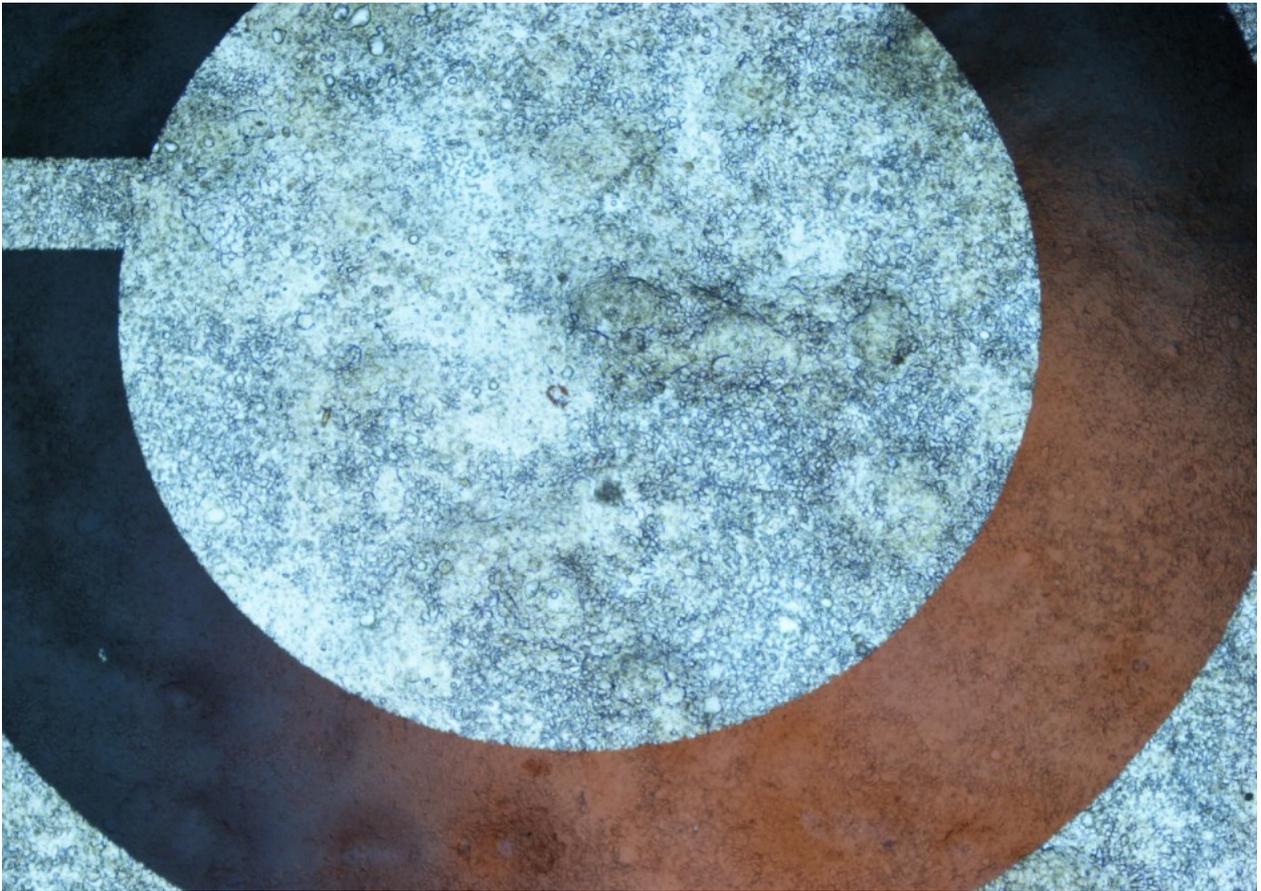


Abbildung 62: Mikroskopische Durch- und Auflichtaufnahme der Chipoberfläche (188h nach Zellaussaat); 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4: Der Caco-2-Zellrasen auf der Chipoberfläche ist konfluent.

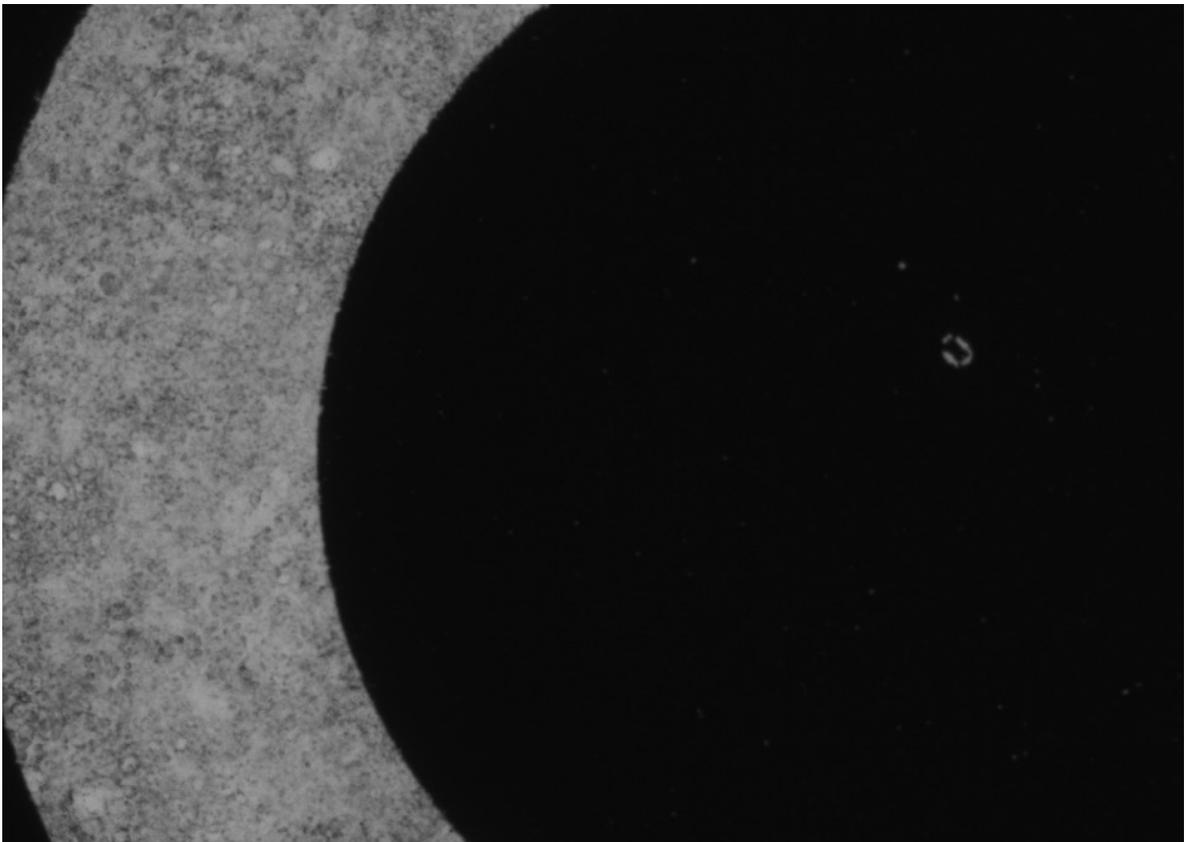


Abbildung 63: Mikroskopische Durchlichtaufnahme (188h nach Zellaussaat); 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4.

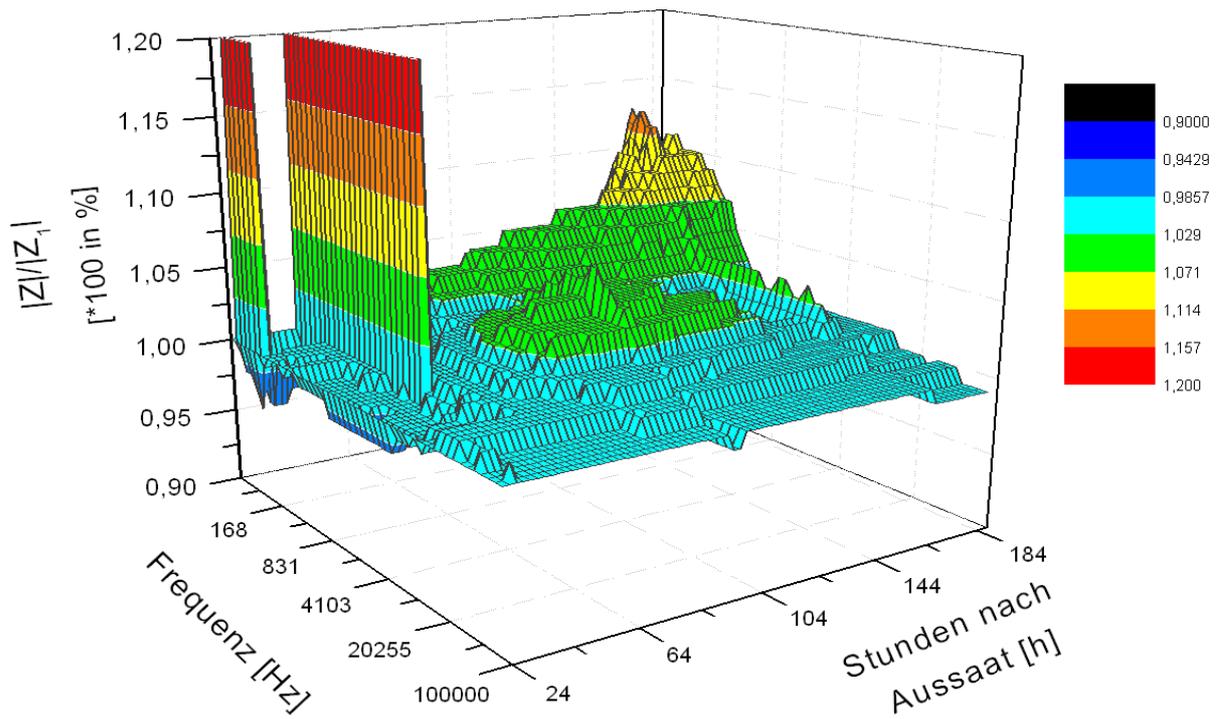


Abbildung 64: 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_1; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum; **z-Achse:** -relative Änderung des Impedanzspektrums bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung, **x-Achse:** Frequenz, **y-Achse:** die seit der Aussaat vergangene Zeit; Ein **Zellrasen** war **nicht vorhanden** (vgl. Abb.65).

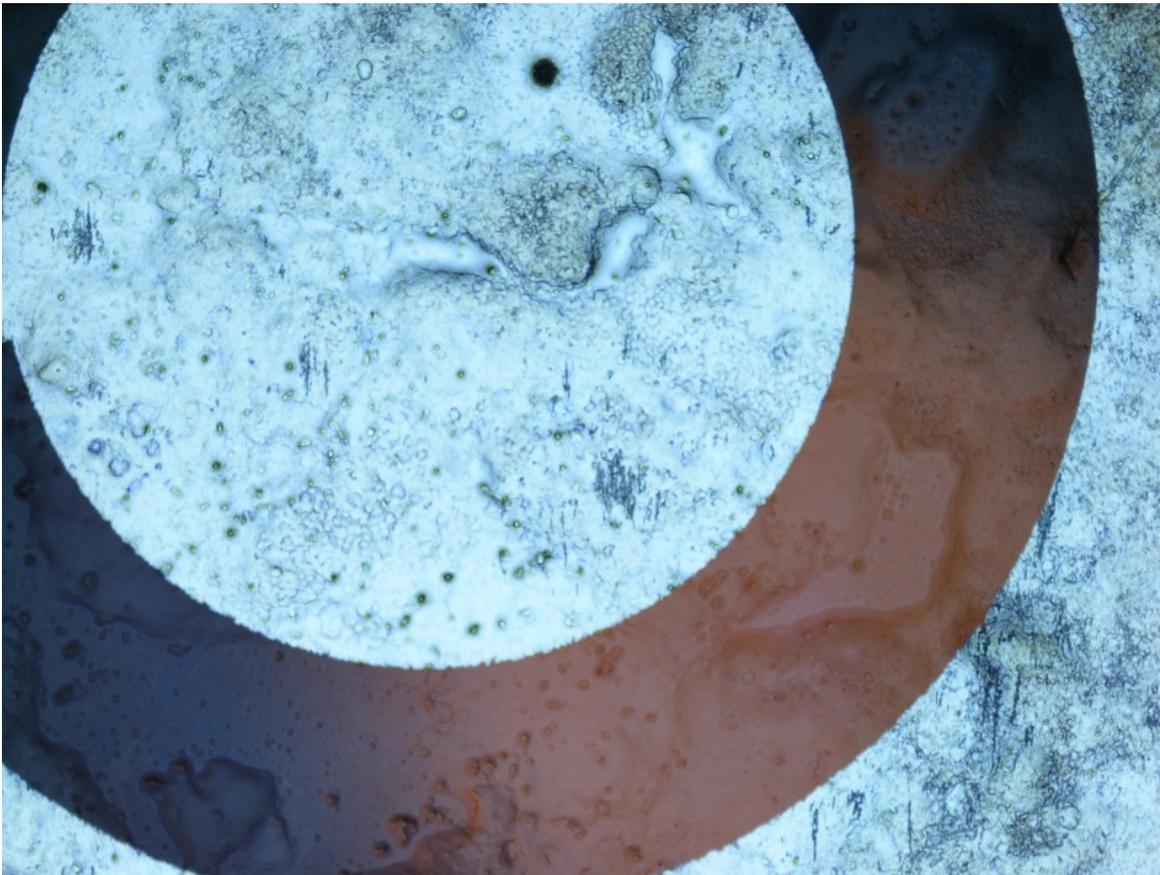


Abbildung 65: Mikroskopische Durch- und Auflichtaufnahme (188h nach Zellaussaat); 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; Ein Zellrasen ist nicht vorhanden.

Interpretation zu den Abbildungen 60 -67:

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Zellkulturkammer_1 und der Zellkulturkammer_4 der 3. Bioimpedanzmessung beschrieben und diskutiert. Abbildung 60 und 61 zeigen die zeitliche Veränderung ($|Z|/|Z_i|$) des Impedanzspektrums in Zellkulturkammer_4 aus verschiedenen Blickwinkeln. In Zellkulturkammer_4 sind bis 100h nach Aussaat keine Anzeichen eines signifikanten ($|Z|/|Z_i|>2$) Anstiegs der transepithelialen Impedanz auszumachen (vgl. Abb.69). Danach steigt die Impedanz mit der Zeit nach Aussaat in Abhängigkeit der Frequenz an. Etwa ab 170h nach Zellaussaat werden für den niedrigen Frequenzmessbereich (50Hz – 500Hz) die Maxima von $|Z|/|Z_i|$ erreicht. Für darüber liegende Frequenzen (500Hz-100kHz) werden die Maxima später oder dem Trend der Kurvenform folgend, erst nach Ende der Messserie erreicht (siehe Abb.66 und 67).

Das **globale Maximum** ($(|Z(\omega,t>i)|/|Z_i(\omega,t=i)|)_{\max}$), wird im Folgenden oft gesucht, um die Ergebnisse verschiedener Bioimpedanzmessungen zu vergleichen. Dabei steht das „ ω “ für Messfrequenzen in [Hz] und das „ t “ für die seit Aussaat der Zellen verstrichene Zeit in Stunden bzw. „ i “ als Index für die IS-Bezugsmessung bezüglich derer dargestellt wurde. In Zellkulturkammer_4 wurde $(|Z(\omega,t>1)|/|Z_i(\omega,t=1)|)_{\max}=6,8$ (bzw. 680 % des Impedanzwerts zu Beginn (i) der Messserie) 168h nach Zellaussaat bei einer Frequenz ω von 319Hz festgestellt.

Abbildung 62 und 63 zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen auf der Chipoberfläche, die direkt am Ende der Messserie (3. Bioimpedanzmessung), 188h nach Zellaussaat, gemacht wurden. Sie zeigen augenscheinlich einen konfluenten Zellmonolayer in Zellkulturkammer_4.

In Abbildung 64 wird das relative ($|Z|/|Z_i|$) Bioimpedanzspektrum in Zellkulturkammer_1 dargestellt. Das Impedanzspektrum zeigte während der gesamten Messdauer kaum Änderungen. Das globale Maximum von $(|Z(\omega,t)|/|Z_i(\omega)|)_{\max} = 2$, bei 104Hz, wurde 184h nach Aussaat, also gegen Ende der Messserie, erreicht. Abbildung 65 zeigt eine mikroskopische Durchlichtaufnahme der Chipoberfläche dieser Zellkulturkammer. Die Caco-2-Zellen bedecken nur vereinzelte Gebiete der Chipoberfläche, sodass die Bottom-Elektroden nur spärlich von Caco-2-Zellgewebe überwachsen sind. Die zeitliche Änderung des Impedanzspektrums in Zellkulturkammer_1 entspricht also einer Summe von Einflussfaktoren, die das Impedanzspektrum zwar zeitlich verändern, die aber nicht direkt auf eine Zunahme der Konfluenz der Caco-2-Gewebesicht zurückzuführen ist.

Mögliche Faktoren einer zeitlichen Veränderung des Impedanzspektrums, die nicht in Zusammenhang mit der zunehmenden Konfluenz der Gewebesicht stehen, sind:

- Änderungen der molekularen Zusammensetzung des RPMI-Mediums, z.B. durch Stoffwechsel mit der Caco-2-Zellkultur.
- Chemische Reaktionen an den Elektroden (vgl. Kap.1.5).
- Im Nährmedium frei schwebende Zellkörper und Zellrückstände (vgl. Kap.1.3.1.2 und Kap.1.4).

Abbildung 66 zeigt den Verlauf der zeitlichen Veränderung des Impedanzspektrums ($|Z|/|Z_1|$) in Zellkulturkammer_4 und Abbildung 73 die in Zellkulturkammer_1 für ausgesuchte Frequenzen.

In Abbildung 68 trägt die Differenz $(|Z|/|Z_1|)_{\text{Zellkulturkammer}_4} - (|Z|/|Z_1|)_{\text{Zellkulturkammer}_1}$ der jeweils gleichen Frequenz und zum jeweils gleichen Zeitpunkt nach Zellaussaat auf der vertikalen Achse auf. Diese Differenz entspricht einer Subtraktion der z-Achse ($|Z|/|Z_1|$) in Abbildung 67 von der in Abbildung 66. Somit kann der Graph in Abbildung 68 als die Darstellung betrachtet werden, die mögliche Einflussfaktoren einer Impedanzänderung ohne Zusammenhang mit der Zunahme der Konfluenz der Caco-2-Gewebeschnitt darstellt.

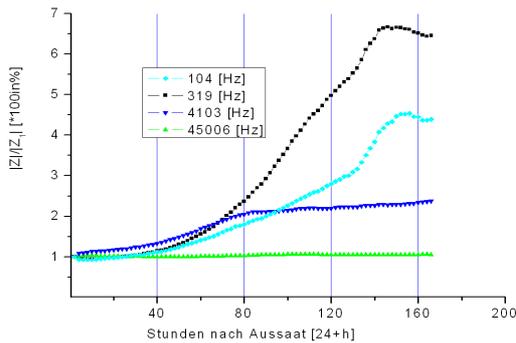


Abbildung 66: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) bezüglich der 1. IS Messung für ausgesuchte Frequenzen. Das Zellgewebe bedeckte die Chipoberfläche vollständig; siehe Abb.62 und 63.

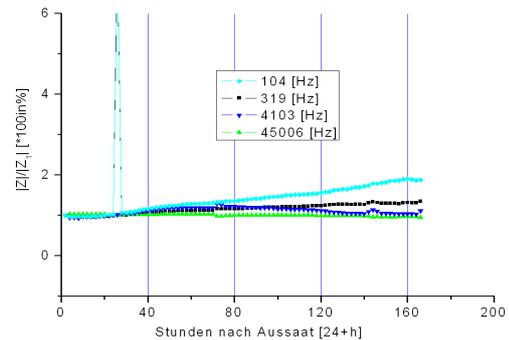


Abbildung 67: 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_1; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) bezüglich der 1. IS Messung für ausgesuchte Frequenzen. Spärliche Zellbedeckung der Chipoberfläche; siehe Abb.65.

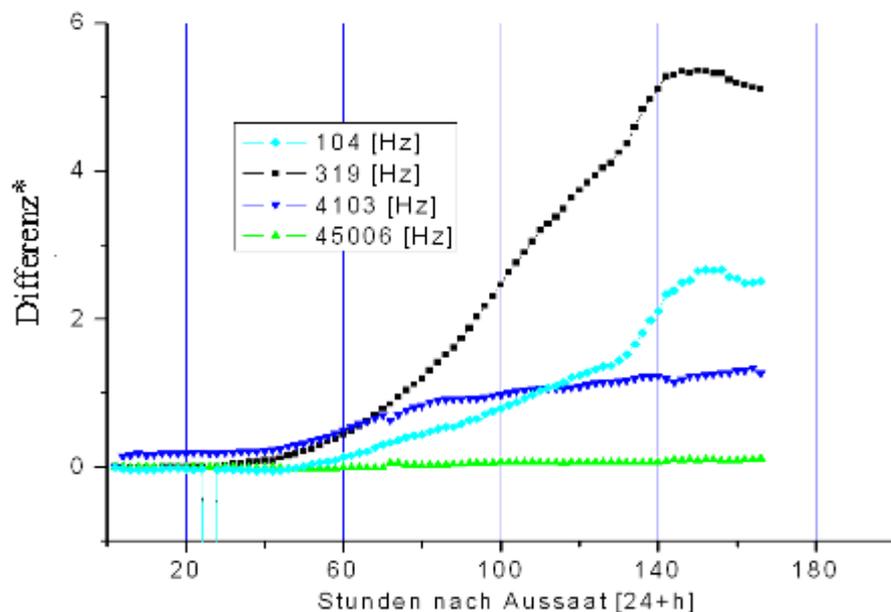


Abbildung 68: Differenz des Verlaufs der relativen ($|Z|/|Z_1|$) Impedanz der Messungen in Zellkulturkammer_4 und _1 für ausgewählte Frequenzen: Die vertikale Achse trägt die Differenz* = $(|Z|/|Z_1|)_{\text{Zellkulturkammer}_4} - (|Z|/|Z_1|)_{\text{Zellkulturkammer}_1}$ auf. (der Quotient wurde jeweils bezüglich der 1. IS Messung gebildet)

Der Graph in Abbildung 69 zeigt die Maxima des Verlaufs der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_i|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen (IS) Messung bei 319Hz und 272Hz. Dargestellt werden außerdem die Änderungen der Impedanz bei 89Hz und 76Hz, die später und vehementer auf die Gewebeverdichtung reagieren. 30 Stunden nach Erreichen der Maxima von ($|Z|/|Z_i|$) bei den Frequenzen von 89Hz und 76Hz und 174h nach Zellaussaat verschwindet dieses Impedanz-Plateau so abrupt wie es aufgetaucht ist. Hypothetisch könnte die Ausbildung von Domes (vgl. Kap.3.6) Anteil an diesem abrupten Abfall der Impedanz gehabt haben.

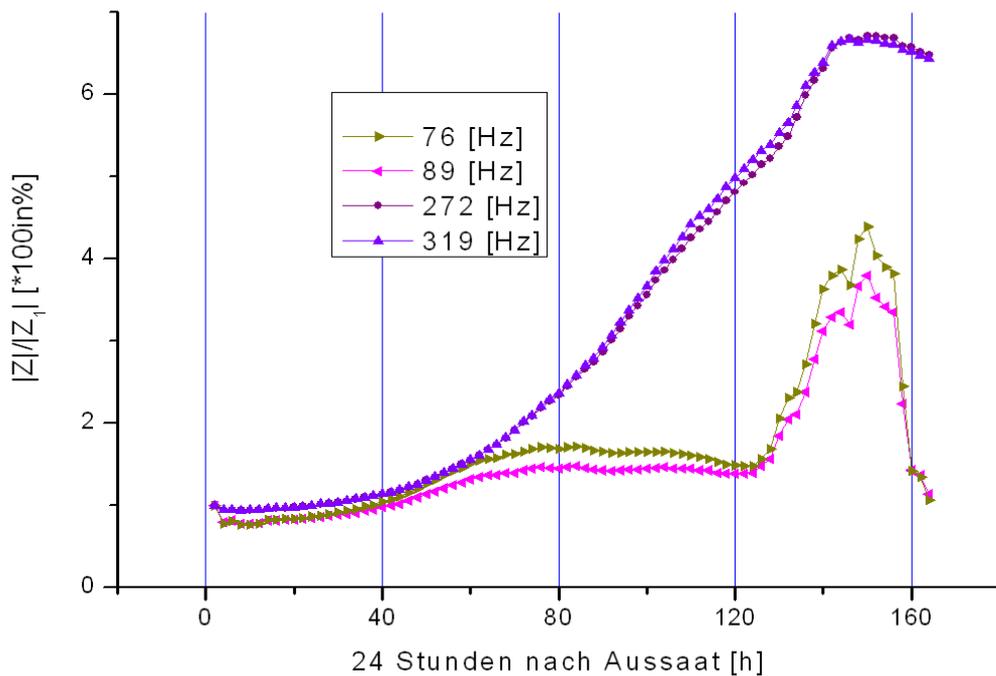


Abbildung 69: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_i|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung für ausgewählte Frequenzen.

Interpretation zu den Abbildungen 76-86:

Abbildung 70 und 71 zeigen $|Z|/|Z_{10}|$ in Zellkulturkammer_2. Anhand mikroskopischer Aufnahmen der Chipoberfläche in Zellkulturkammer_2 (siehe Abb.72 und 73) ist augenscheinlich ein konfluenter Zellrasen am Ende der Messserie feststellbar worden. Das globale Maximum ($(|Z|/|Z_{10}|)_{max.} = 4,8$) in Zellkulturkammer_2 wurde bei einer Frequenz von 974Hz und 124h nach Zellaussaat erreicht. Da die transepitheliale Impedanz verschiedener Frequenzen unterschiedlich stark mit der Zeit nach Aussaat anwächst, wird global die Form der relativen ($|Z|/|Z_i|$) Bioimpedanzspektra durch die Verlegung des Bezugszeitpunktes, bezüglich dessen die Impedanzänderung in der Graphik dargestellt wird (gemeint ist der Index i in $|Z|/|Z_i|$), verzerrt. In Abbildung 70 und 71, wurde das relative ($|Z|/|Z_{10}|$) Bioimpedanzspektrum bezüglich der 10. impedanzspektroskopischen Messung dargestellt. Es liegt nahe, dass sich das globale Maximum ($(|Z|/|Z_{10}|)_{max.}$ (bei 974Hz) in Abbildung 70 und 71 im Vergleich zum globalen Maximum ($(|Z|/|Z_i|)_{max}$ (bei 319Hz) in Abbildung 60 und 61 durch die Darstellungsweise zu einer höheren Frequenz verschoben hat.

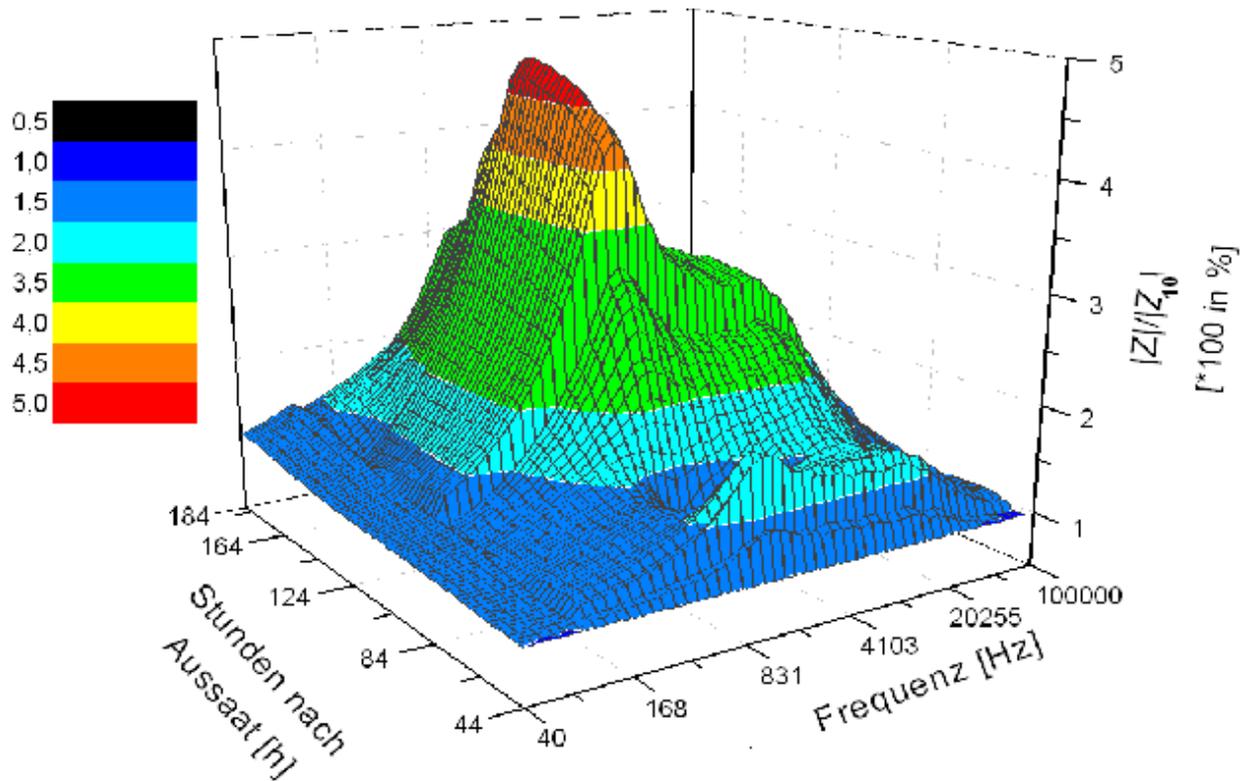


Abbildung 70: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_2; relatives ($|Z|/|Z_{10}|$) Bioimpedanzspektrum; relative Impedanzänderung bezüglich der 10. impedanzspektroskopischen Messung/ 44h nach Aussaat der Caco-2-Zellen;

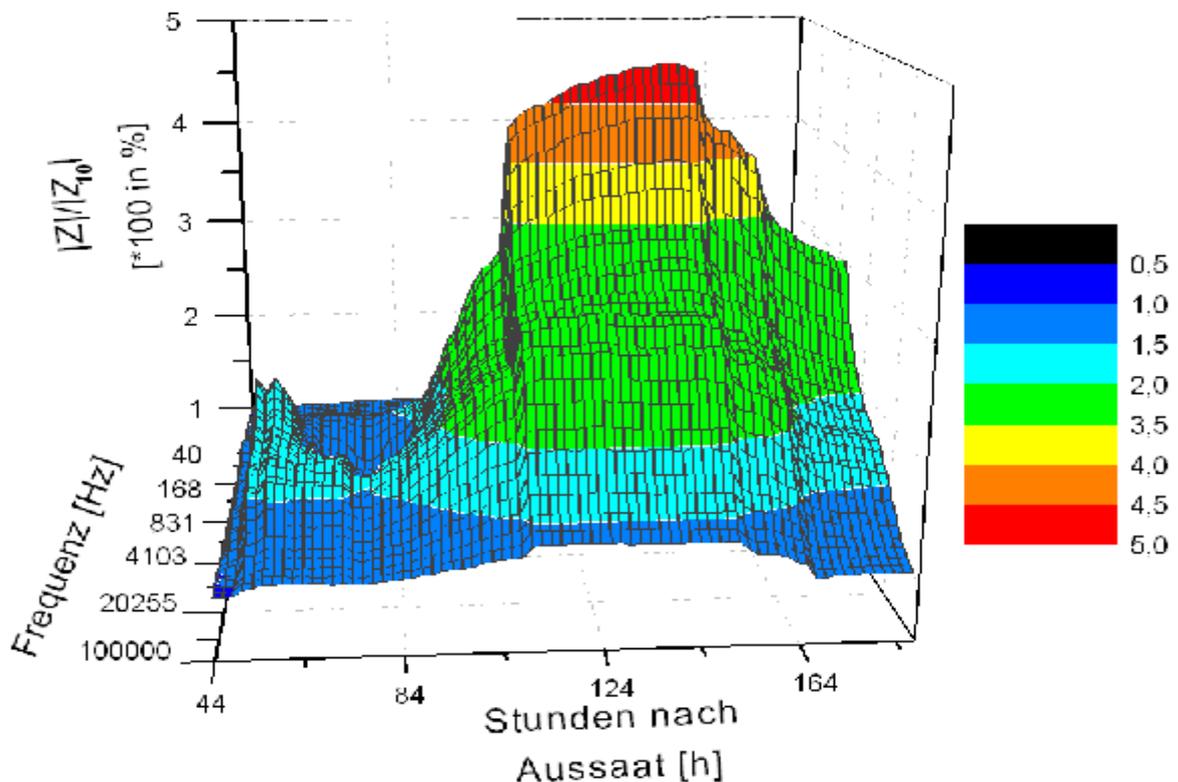


Abbildung 71: 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_2; relatives ($|Z|/|Z_{10}|$) Bioimpedanzspektrum; relative Impedanzänderung bezüglich der 10. impedanzspektroskopischen Messung/ 44h nach Aussaat der Caco-2-Zellen .



Abbildung 72: Mikroskopische Durch- und Auflichtaufnahme (188h nach Zellaussaat); 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_2

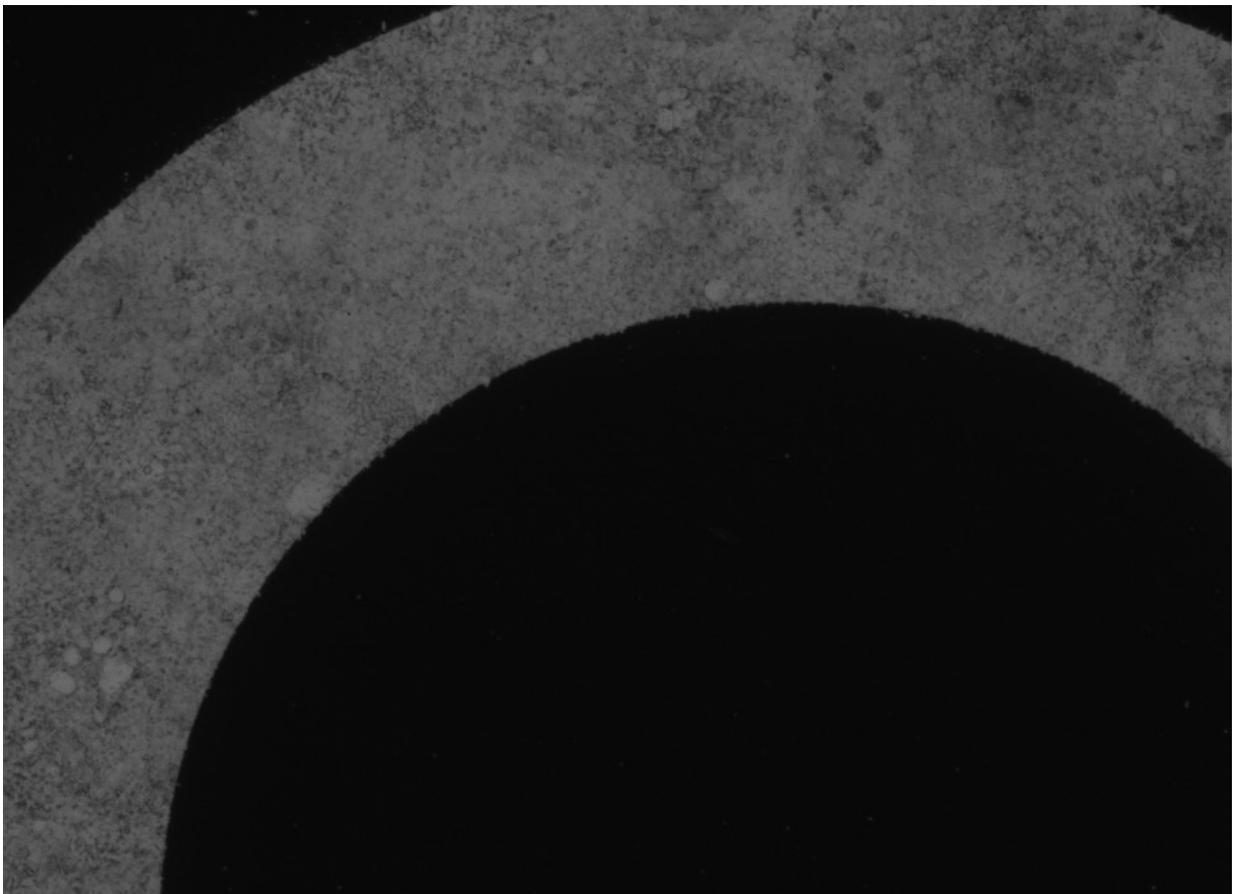


Abbildung 73: Mikroskopische Durchlichtaufnahme (188h nach Zellaussaat); 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_2.

Abbildung 74 und 76 zeigen $|Z|/|Z_{31}|$ von Zellkulturkammer_5 (bezüglich der 31. IS-Messung/ 84h nach Aussaat: vergleiche hier mit der Problematik im Absatz zuvor). Die mikroskopische Aufnahme in Abbildung 75 zeigt ein flächendeckendes Caco-2-Zellgewebe auf den Bottom-Elektroden in Zellkulturkammer_5. Abbildung 77 stellt $|Z|/|Z_{31}|$ gegenüber der Zeit ab 84 Stunden nach Aussaat der Caco-2 Zellen für ausgewählte Frequenzen von Zellkulturkammer_5 dar. Die global, innerhalb des Frequenzmessbereichs und des Messzeitraums, größte relative Impedanzänderung $(|Z|/|Z_{31}|)_{\max.} = 5,3$ erfuhren Impedanzmesswerte bei 143Hz und 178h nach Aussaat. Auch hier (vgl. 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_4) zeigte sich der Trend, dass der Anstieg der (transepithelialen) Impedanz bei 89Hz und 76Hz viel später und vehementer auftritt. In Zellkulturkammer_5 endet das Plateau bei Frequenzen von etwa 200Hz nicht abrupt wie bei Zellkulturkammer_4, sondern bleibt, im Gegenteil, bis zum Messende (188h nach Zellaussaat) monoton ansteigend erhalten. Über 4kHz treten kaum relative ($|Z|/|Z_{31}|$) Änderungen der Impedanz auf.

Im **Anhang** wird das „Originalmesswert-log Z (Impedanz)-spektrum“ von Zellkulturkammer_5 abgebildet. Dort treten keine „Irregulären Messpunkte bei 1kHz“ (Impedanzmesswerte zwischen den FMP 900Hz-2kHz tendieren „seltsam“ gegen $|Z|=0$) aus der Darstellung der Messwerte aus Zellkulturkammer_5 zu erkennen. Das globale Maximum in Zellkulturkammer_2 (vgl. Absatz weiter oben) bei 974Hz ist wahrscheinlich durch das Auftreten von „Irregulären Messpunkten bei 1kHz“ und durch die Darstellung als Quotient $|Z|/|Z_i|$ hin zu höheren Frequenzen verschoben, da im „Originalmesswert-log Z (Impedanz)-spektrum“ von Zellkulturkammer_2 (vgl. Anhang) eben eine solche „Irreguläre Messpunkte bei 1kHz“ auftritt.

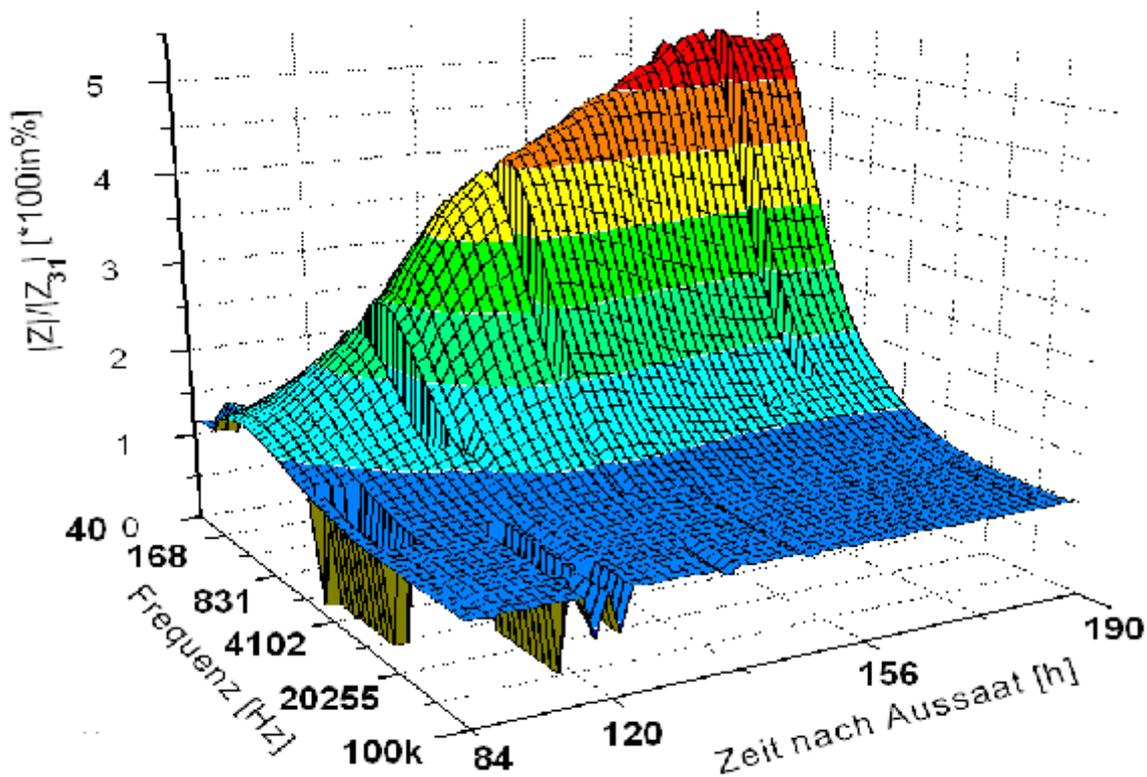


Abbildung 74: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_5; relatives ($|Z|/|Z_{31}|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 31. impedanzspektroskopischen Messung/ 84h nach Aussaat der Caco-2-Zellen.



Abbildung 75: Mikroskopische Durch- und Auflichtaufnahme ;3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer 5.

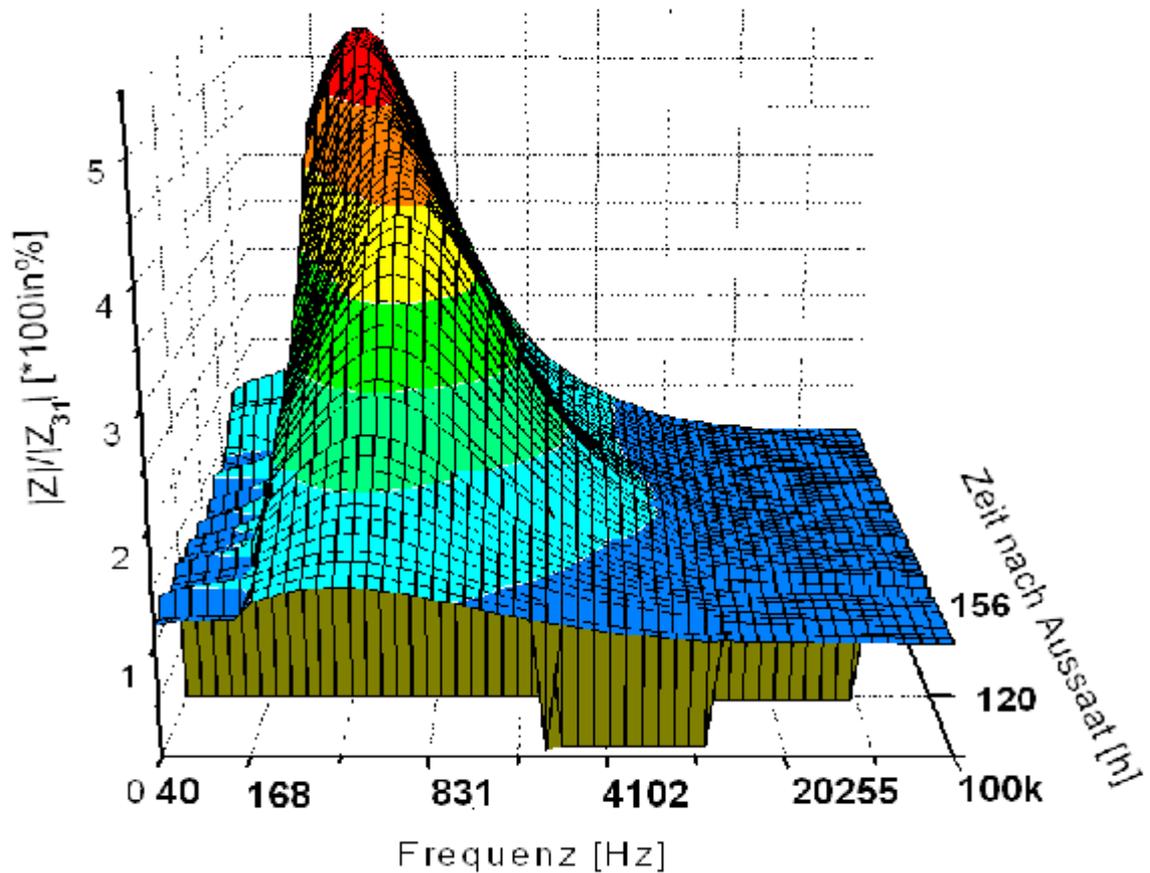


Abbildung 76: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_5; relatives ($|Z|/|Z_{31}|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 31. impedanzspektroskopischen Messung/ 84h nach Aussaat der Caco-2-Zellen; (gleicher Datensatz wie Abb.74).

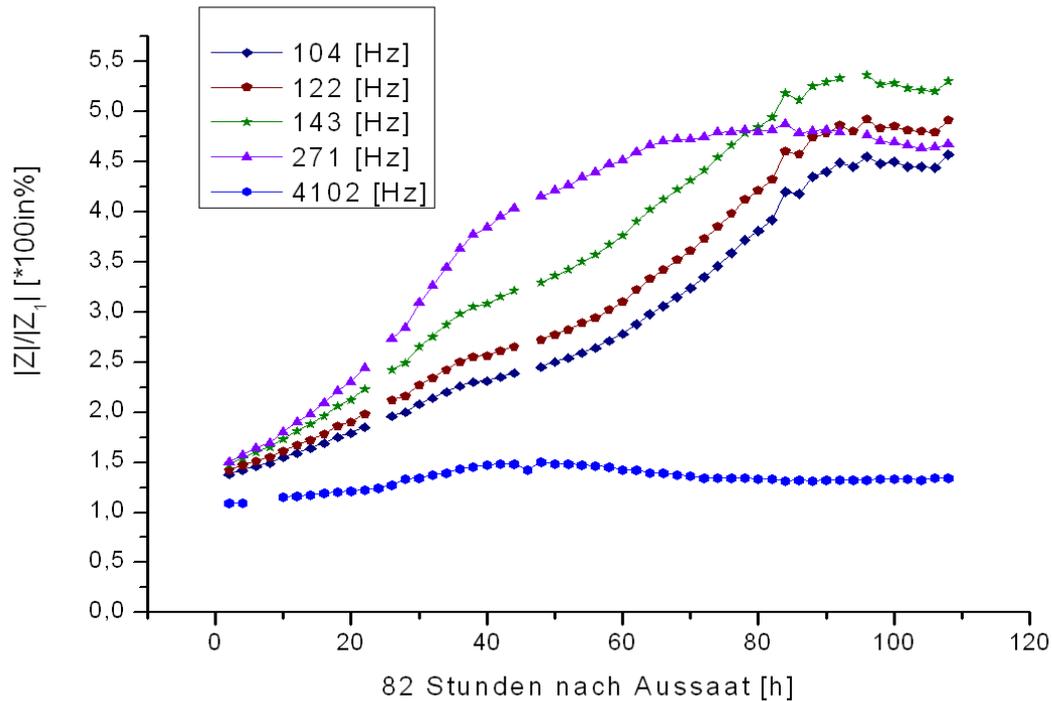


Abbildung 77: 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_5; Relative ($|Z|/|Z_{30}|$) Impedanz, bezüglich der 30. impedanzspektroskopischen Messung/ 82 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen, für ausgesuchte Frequenzen.

Abbildung 79 stellt $|Z|/|Z_1|$ der Messung in Zellkulturkammer_8 dar. Hier sind viele „vereinzelte irreguläre Messpunkte“ und auch „Sprünge“ (bei 100Hz), jedoch keine „Irregulären Messpunkte bei 1kHz“ (die in der Frequenznähe von 1-2kHz) als Impedanzmesswert aufgetreten. Da Impedanzmesswerte bei Frequenzen $< 100\text{Hz}$ von „Sprüngen“ begleitet wurden, werden sie nur mit Bedacht als Ergebnis behandelt. Die mikroskopische Aufnahme in Abbildung 78 zeigt mäßige Bedeckung der (Bottom-)Pt-Elektroden mit Caco-2-Zellgewebe in Zellkulturkammer_8. Hier wurde das globale Maximum $(|Z|/|Z_1|)_{\text{max.}}=2,85$ bei 168Hz und 176h nach Aussaat festgestellt, wobei diese typischen, in Kapitel 4.1.4.1 erwähnten, „vereinzelten irregulären Messpunkte“ nicht in die Wertung mit einbezogen wurden und aus der Graphik (siehe Abb.77) entfernt wurden.



Abbildung 78: Mikroskopische Durch- und Auflichtaufnahme; 3. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_8; Ein konfluenter Zellrasen ist nur lokal vorhanden.

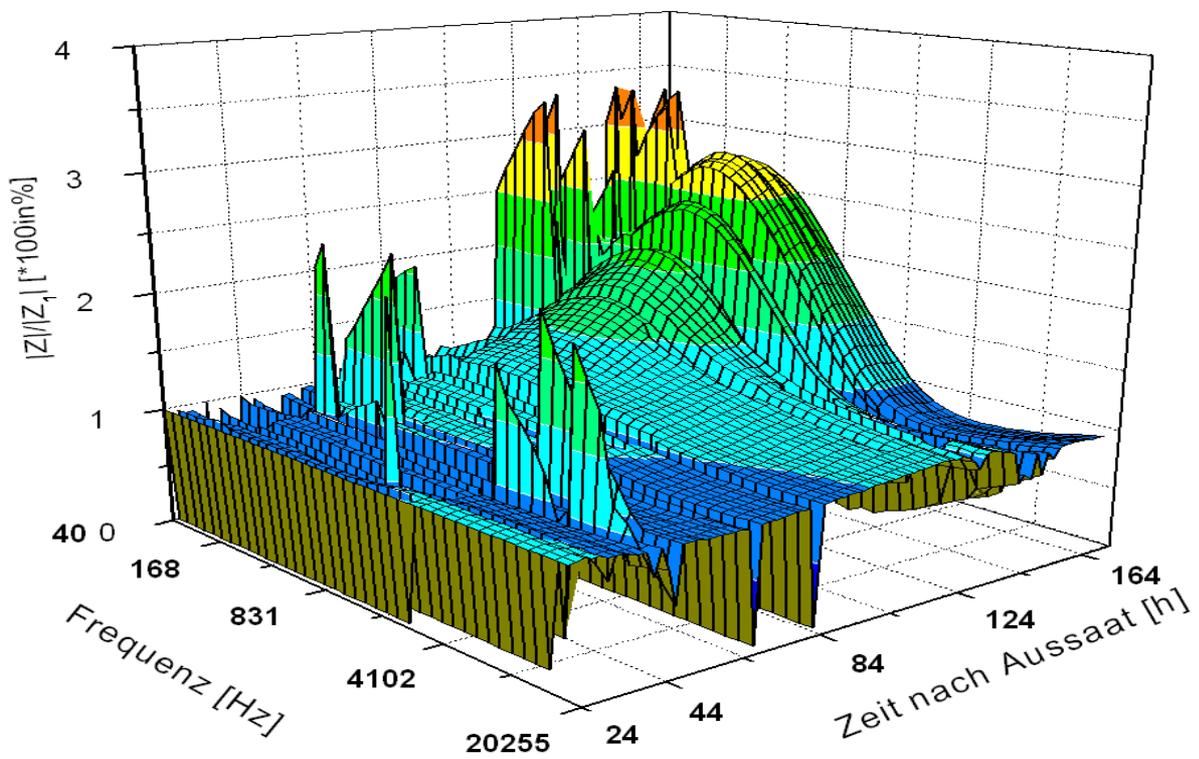


Abbildung 79: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_8; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen. Impedanzmesswerte, die als Systemfehler erachtet wurden, wurden in dieser Darstellung gleich $|Z|/|Z_1|=0$ gesetzt.

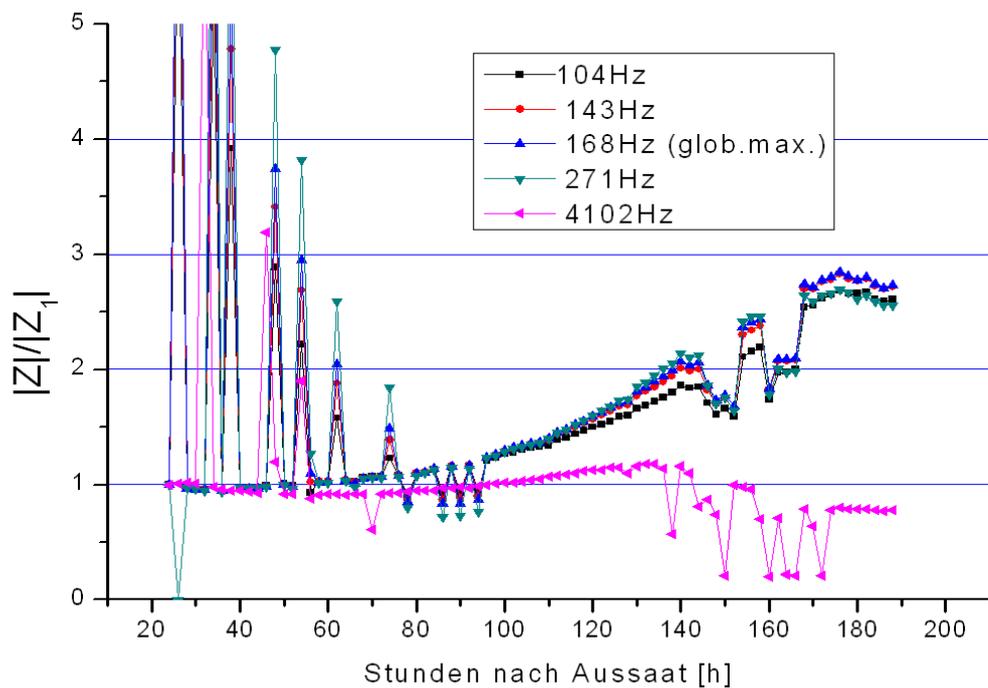


Abbildung 80: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_8: Verlauf der relative Impedanz ($|Z|/|Z_1|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen, für ausgesuchte Frequenzen.

In Abbildung 80 trägt für die Messungen in Zellkulturkammer_8 $|Z|/|Z_1|$ für ausgesuchte Frequenzen gegenüber der Zeit nach Aussaat auf. Aus Abbildung 86 können unter anderem neben dem globalen Maximum die eben genannten „Ausreißer“, die die Messtätigkeiten dieser Arbeit begleiteten betrachtet werden. Da diese „Ausreißer“ sich im zeitlichen Verlauf durch rückartige Messwertsdifferenzen von mehreren Größenordnungen auszeichnen, können sie von „wahren“ Impedanzmesswerten unterschieden werden (vgl. Abb.80).

4.3.2.1 Ergebnisübersicht der 3. Bioimpedanzmessung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der 3. Bioimpedanzmessung zusammengefasst.

In Tabelle 11 ist das globale Maximum $(|Z|/|Z_i|)_{\max}$ der relativen $(|Z|/|Z_i|)$ Bioimpedanzspektra für alle im vorherigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse der elektrischen Messung zusammengestellt. Dabei werden Parameter, wie die Frequenz, die Zeit nach Aussaat und der Index i (Referenzmessung bezüglich derer der Quotient $(|Z|/|Z_i|)$ gebildet wurde) angegeben, bei der das globale Maximum aufgefunden wurde. Außerdem wird die am Ende der Bioimpedanzmessung ermittelte Caco-2-Zellbedeckung der Chipoberfläche angegeben und die Zuverlässigkeit des elektrischen Messergebnisses diskutiert.

Zellkultur-kammer	Globales Maximum (gl.Max.) $(Z / Z_i)_{\max}$	Frequenz des gl. Max. [Hz]	Die seit Zellaussaat vergangen Stunden beim gl. Max. in [h]	Der Index i von $ Z / Z_i $ beim gl. Max. (/Zeit nach Aussaat)	Zell-Bedeckung 188h nach Aussaat	Zuverlässigkeit der Messergebnisse (vgl. Kap.4.1.4.1)
4	6,8	319	170	1.IS-Messung (/24 [h])	konfluent	Keine „Sprünge“ und keine „irregulären Messpunkte (MP) bei 1kHz“
2	4,8	979	124	10.IS-Messung (/44 [h])	konfluent	Es traten „irreguläre MP bei 2kHz“ und weitere „vereinzelte irreguläre MP“ auf
5	5,3	143	178	31.IS-Messung (/78 [h])	konfluent	Keine „Sprünge und keine „irregulären MP bei 1kHz“, jedoch viele „vereinzelte irreguläre MP“ auf
1	1,13	104	178	1.IS-Messung	nicht konfluent	Kaum „Sprünge“ und keine „irreguläre MP bei 1 kHz“
8	2,85	168	176	1.IS-Messung	teils konfluent	viele „Sprünge“ jedoch keine „irreguläre MP bei 1kHz“

Tabelle 11: Der Wert und weitere Charakteristika des globalen Maximums $(|Z|/|Z_i|)_{\max}$ der Bioimpedanzmessung mit dem ringförmigen-Platin-Elektroden-Chip (3. Bioimpedanzmessung).

Wie in Tabelle 11 dargestellt, findet man die globalen Maxima der relativen $(|Z|/|Z_i|)$ Bioimpedanzspektren vornehmlich zwischen 319Hz und 104Hz. Die globalen Maxima wurden oft erst kurz vor Messende (188h nach Zellaussaat) erreicht. Mikroskopische Aufnahmen, die am Ende der Messerien gemacht wurden, zeigten eine hohe Zellbedeckung der (Bottom-) Elektroden und noch keine Domes (siehe Kap.4.3.2). Die Messserie hätte folglich auch noch länger interessante impedanzspektroskopische Messergebnisse liefern können. Die 3. Bioimpedanzmessung zeigte, dass mit zunehmender Caco-2-Zellbedeckung der Chipoberfläche die transepitheliale Impedanz über ein Spektrum an Frequenzen ansteigt. Aus Tabelle 11 ist zudem ersichtlich, dass der Anstieg mit dem Maß an Zellbedeckung der Chipoberfläche korreliert.

4.3.3 Bioimpedanzmessungen mit dem IDES-Chip

Während für die 3. Bioimpedanzmessung der Chip mit dem ringförmigen Elektrodendesign verwendet wurde, werden in der 4., 5. und 6. Bioimpedanzmessung Caco-2-Zellen auf zweilagige IDES (interdigitated)-Bottom-Elektroden ausgesät und die Impedanz während des Caco-2-Gewebeaufbaus ermittelt. Der IDES-Elektroden-Chip ist in Kap. 2.2.9 beschrieben. In den nun folgenden Unterkapiteln werden erst die Messergebnisse der 4. und 5. Bioimpedanzmessung beschrieben. Dann erfolgt eine tabellarische Zusammenfassung von verschiedenen Charakteristika, wie dem globalen Maximum, die aus der Darstellung durch die *Differenz* oder durch den *Quotienten* (vgl. Kap.3.5) ermittelt wurden. Das Ende dieses Kapitels bildet die Auswertung der 6. Bioimpedanzmessung, die sich von der 4. und 5. durch den zusätzlichen Einsatz eines Permeation Enhancer (vgl. Kap. 1.7 und Kap. 3.7) unterscheidet.

4.3.3.1 Vierte Bioimpedanzmessung

In der 4. Bioimpedanzmessung wurde gegenüber der 3. Bioimpedanzmessung, die Versuchsdauer um ca. 2 Tage auf insgesamt 9 Messtage (210h nach Zellaussaat) verlängert, das Frequenzspektrum auf 20Hz-100kHz ausgedehnt und die Anzahl der Frequenzmesspunkte der IS-Messung, auf 100 Messpunkte erhöht. Der Messaufbau entspricht, bis auf die Verwendung des IDES-Elektroden-Chips, jenem der sich in der 2.(Pilot-) Messung und in der 3. Bioimpedanzmessung schon bewährt hat. Die Messparameter sind in Kapitel 4.3.1 tabellarisch zusammengefasst wenn sie nicht schon vorher in Kapitel 3.4 als Standardparameter festgelegt worden sind. Die Skalierung der Darstellungen der zeitlich veränderlichen Impedanzspektra wird in Kapitel 3.5 beschrieben. In der 3. Bioimpedanzmessung sind bei Messfrequenzen <100Hz viele „vereinzelte irreguläre MP“ im Datenblatt der IS-Messung aufgetreten sind und in diesem Frequenzbereich signifikante Änderungen im Impedanzspektrum festgestellt wurden, wurde in der 4. Bioimpedanzmessung der Frequenzbereich <100Hz genauer untersucht. So liegen in der 4. Bioimpedanzmessung die ersten 20 (von insgesamt 100) Impedanzmessungen der Messserie (im Spektrum 20Hz-100kHz) noch unter 100Hz.

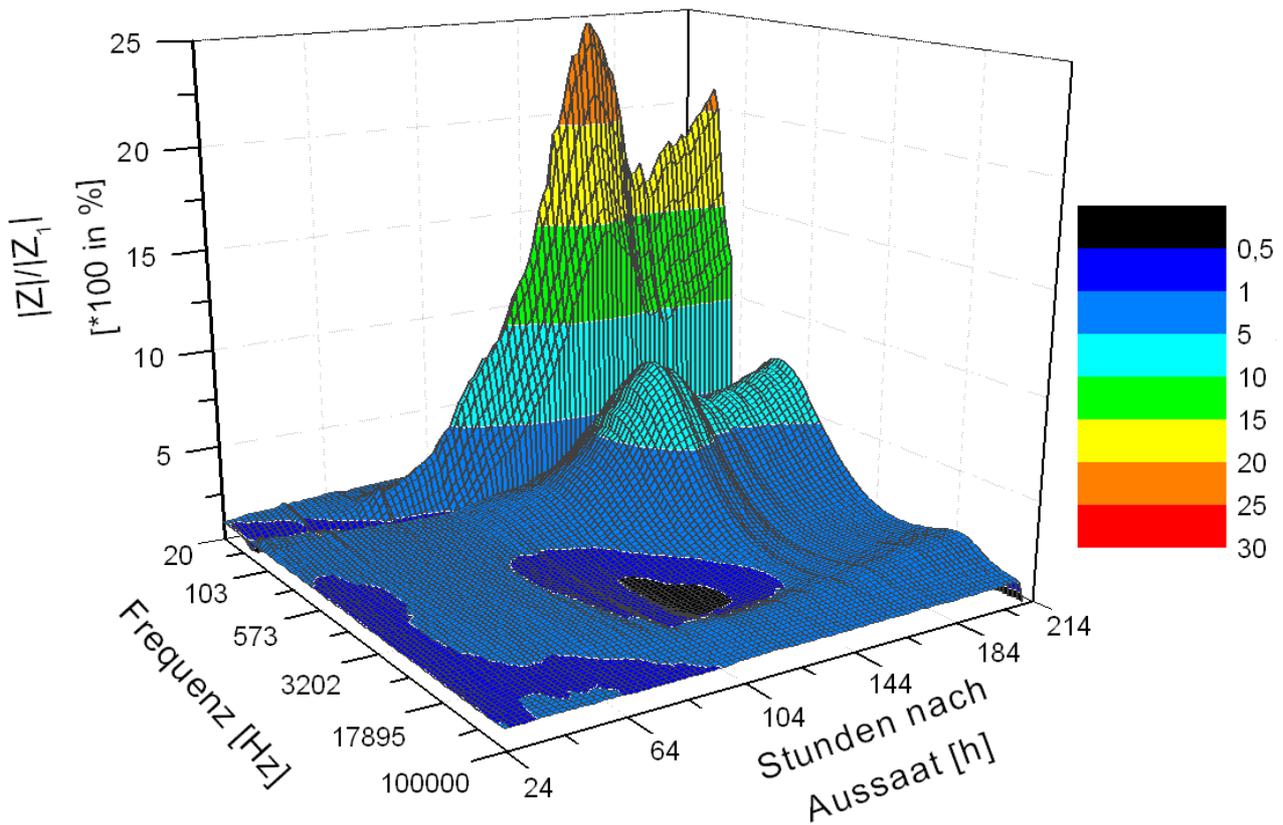


Abbildung 81: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen.

In Abbildung 81 wird für Zellkulturkammer_1 der 4. Bioimpedanzmessung das relative ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum dargestellt. Die transepitheliale Impedanz steigt mit der Zeit nach Aussaat der Caco-2-Zellen über ein Spektrum von Frequenzen an. Das globale Maximum, wurde in Zellkulturkammer_1 ($|Z|/|Z_1|$)_{max.}=24,8, bei einer Frequenz von 56Hz und 138h nach Zellaussaat festgestellt.

Abbildung 82 zeigt die zeitliche Änderung der Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) für die Frequenz, bei der das globale Maximum aufgefunden wurde, gegenüber der Zeit nach Aussaat. Daneben zeigt Abbildung 82 relative ($|Z|/|Z_1|$) Impedanzkurven für ausgewählte Frequenzen. Nach dem Erreichen des globalen Maximums (bei 56Hz und 138h nach Zellaussaat) fällt die Impedanz aller Messfrequenzen des signifikanten ($|Z|/|Z_1| > 2$) Frequenzbereichs (20Hz-3490Hz) bis etwa 184h nach Zellaussaat monoton ab. Dieser „Knick“ zum Zeitpunkt 184h nach Zellaussaat (vgl. Abb.81), wurde in der 3. Bioimpedanzmessung (vgl. z.B. Abb.75 oder Abb. 77) zu einem ähnlichen Zeitpunkt nach Zellaussaat beobachtet.

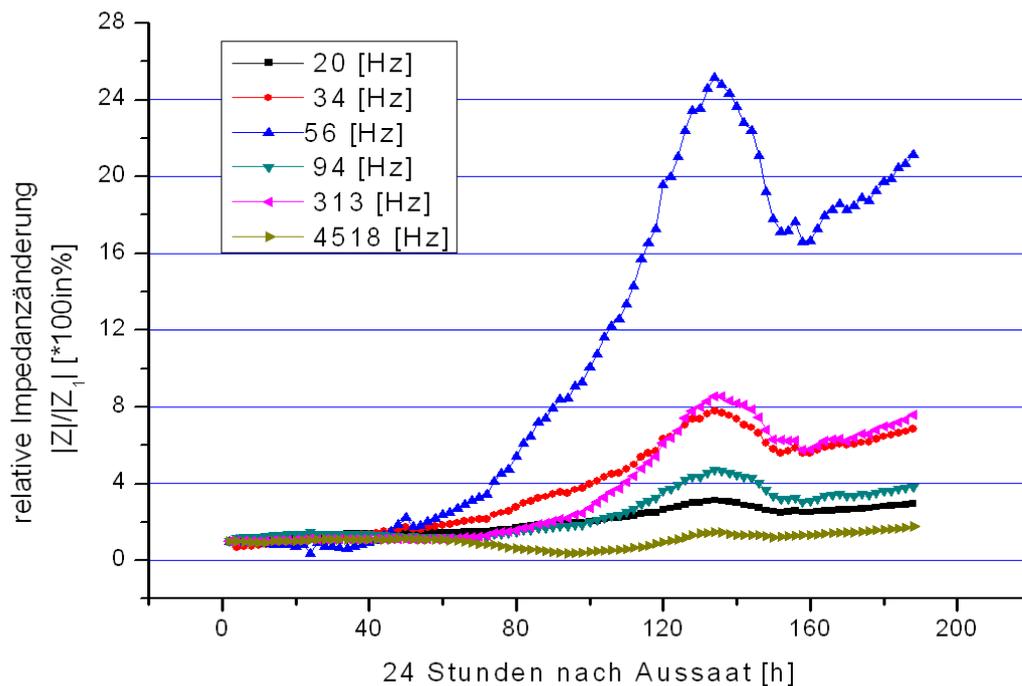


Abbildung 82: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; Verlauf der relative Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung für ausgewählte Frequenzen; Bei 56Hz wurde die größte zeitliche Änderung des Impedanzspektrums (globales Maximum) festgestellt und bei 313Hz ein lokales Maximum von $|Z|/|Z_1|$

Da in dieser Bioimpedanzmessung besonders der Bereich niedriger Frequenzen (<100Hz) untersucht werden sollte, werden in Abbildung 83 und 84 die Impedanzen der ersten Frequenzen des Frequenzmessbereichs im Detail abgebildet. In Abbildung 83 ist die relative Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) auf der vertikalen Achse und die Zeit nach Aussaat für alle Frequenzmesspunkte (FMP) zwischen 20Hz und 56Hz auf der horizontalen Achse aufgetragen. In Abbildung 84 gilt dies für den Frequenzbereich zwischen 56Hz und 121Hz. Zwischen dem Frequenzmesspunkt bei 86Hz und dem bei 94Hz ist ein „Sprung“ (vgl. Abb.83). An dieser „typischen“ (vgl. Kap.4.1.4.1) Sprungstelle kann die Impedanzänderung vermutlich nicht direkt auf die charakteristischen elektrischen Eigenschaften, der sich auf der Chipoberfläche zu einem Gewebe verdichtenden Caco-2-Zellen zurückgeführt werden (vgl. Kap.4.1.4.1).

Interessant ist, dass bei FMP >94Hz, (größer als die der Sprungstelle), die relative ($|Z|/|Z_1|$) Änderung der Impedanz, nachdem sie bei 94 Hz ihren Tiefpunkt erreichte, mit der Frequenz ansteigt, um bei 314Hz ein lokales Maximum von $|Z|/|Z_1|=8,56$ zu erreichen. Nach Erreichen des lokalen Maximums bei 314Hz fällt $|Z|/|Z_1|$ mit steigender Frequenz tendenziell monoton ab (siehe Abb.84 und evt. Abb.82 und Abb.81).

Die Abbildungen 83 und 84 zeigen zudem, dass die transepitheliale Impedanz auch bei niedrigen Frequenzen, als wie sie in der 3. Bioimpedanzmessung vermessen wurden, signifikant ($|Z|/|Z_1|>2$) ansteigt.

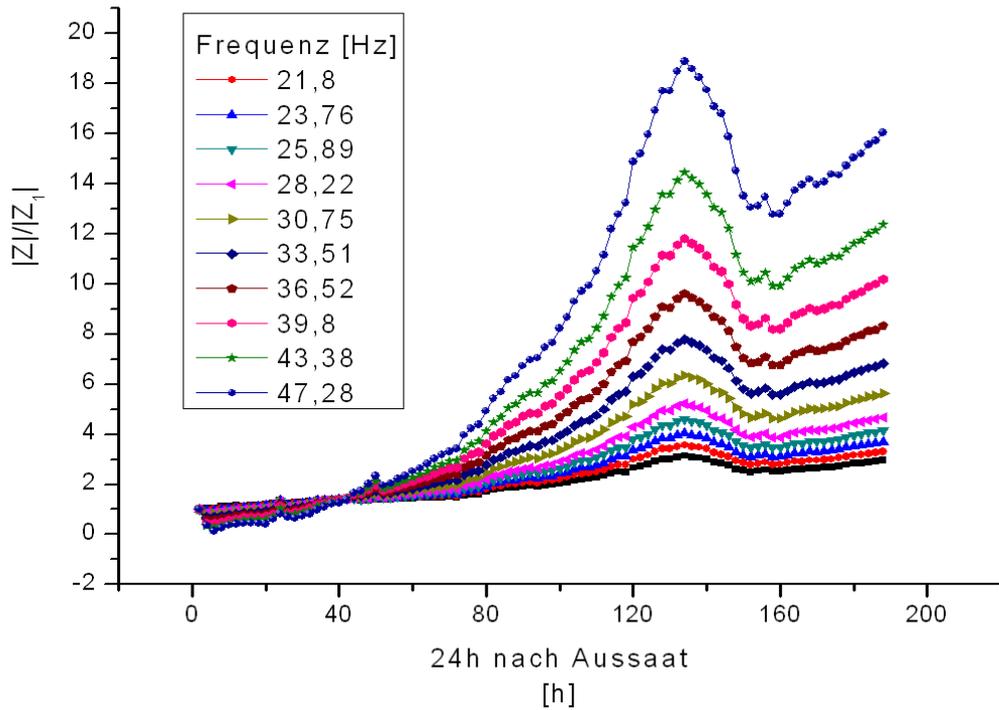


Abbildung 83: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1: Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_i|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung für ausgewählte Frequenzen;

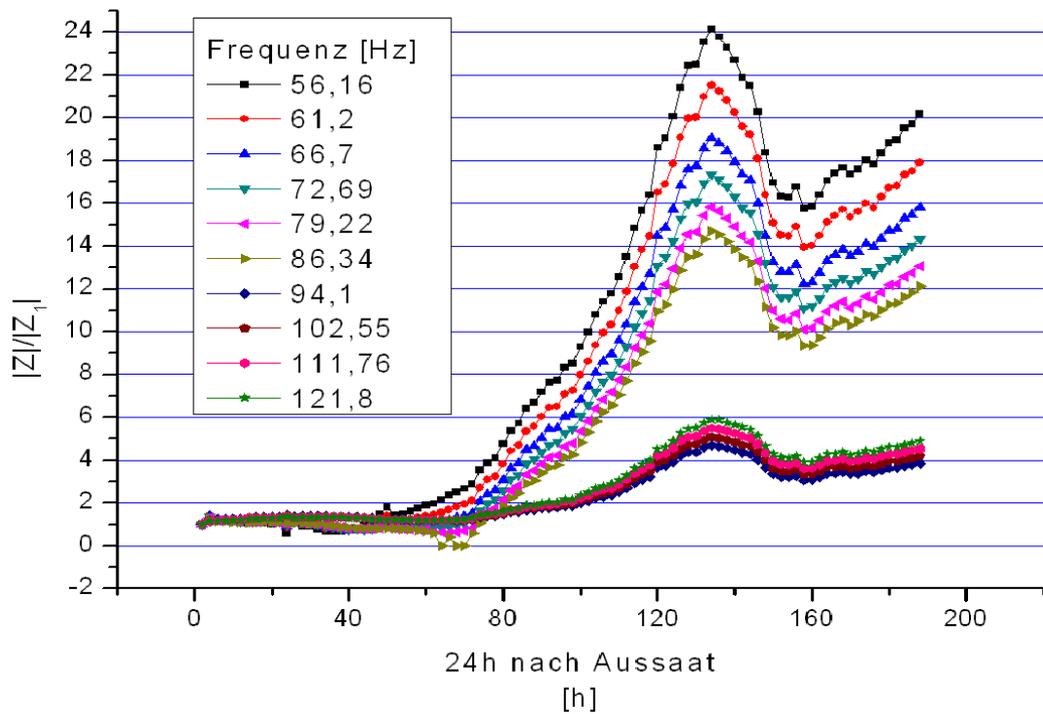


Abbildung 84: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1: Verlauf der relativen Impedanzänderung ($|Z|/|Z_i|$) bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung für ausgewählte Frequenzen

In Abbildung 85 wird für die Zellkulturkammer_4 der 4. Bioimpedanzmessung das relative ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum dargestellt. In dieser Abbildung tritt das globale Maximum ($|Z(\omega, t>1)|/|Z_1|_{\max}=22,54$) bei 103 Hz und 202h nach Aussaat auf. In Abbildung 85 ist ein „Sprung“ der Impedanz zwischen dem FMP bei 94Hz und dem bei 103Hz von ($|Z(\omega=94\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=22,54$) auf ($|Z(\omega=103\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=5,82$) zu erkennen.

Abbildung 86 zeigt die zeitliche Änderung der Impedanz ($|Z|/|Z_1|$) für die Frequenz, bei der das globale Maximum aufgefunden wurde, aufgetragen gegenüber der Zeit nach Aussaat. Daneben zeigt Abbildung 82 Impedanzkurven ausgesuchter Frequenzen.

In Abbildung 85 und Abbildung 86 ist ein „Sprung“ der Impedanz zwischen dem FMP bei 94Hz und dem bei 103Hz von ($|Z(\omega=94\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=22,54$) auf ($|Z(\omega=103\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=5,82$) zu erkennen, ein anderer bei ($|Z(\omega=3803\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=14,21$) auf ($|Z(\omega=4923\text{Hz}, t)|/|Z_1|_{\max}=16$).

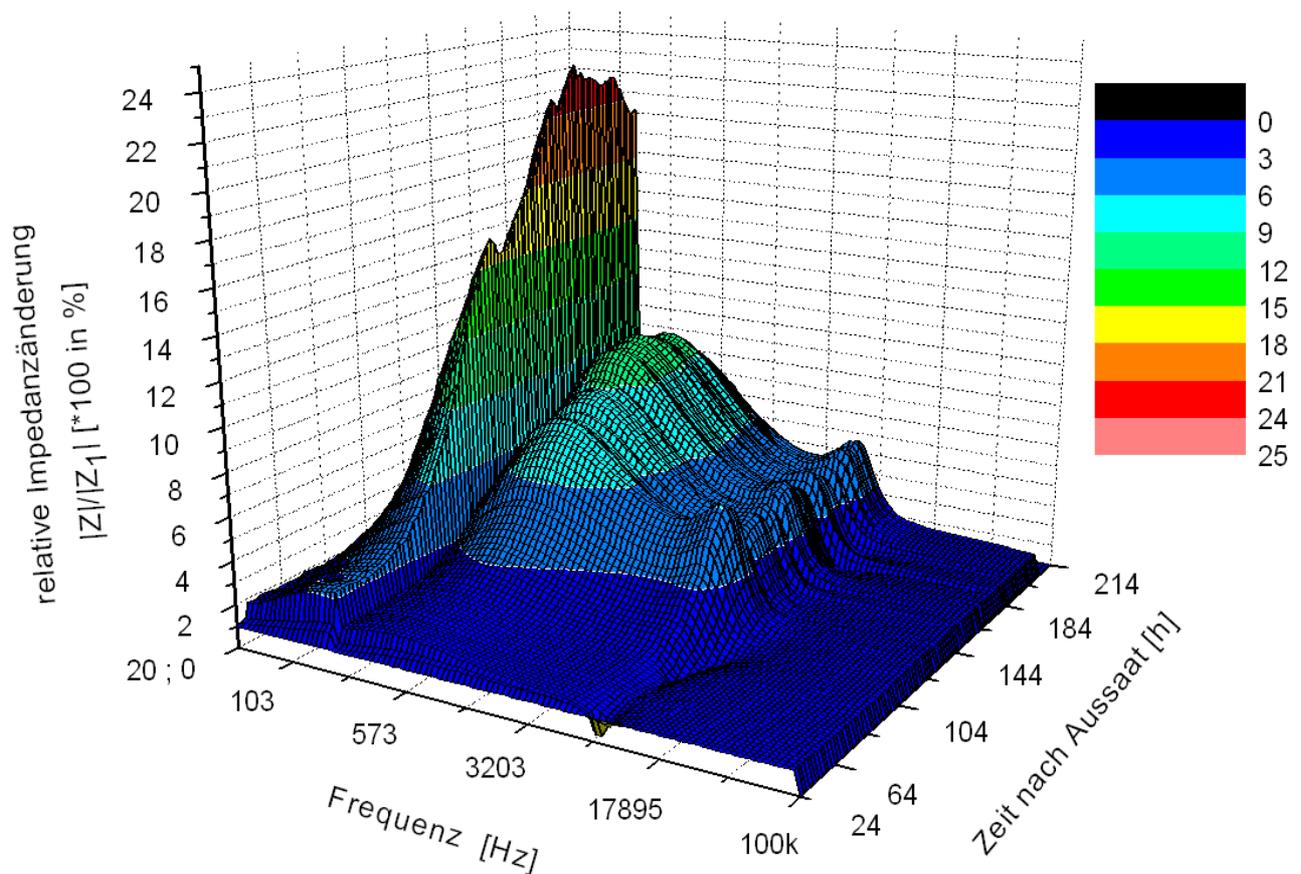


Abbildung 85: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen

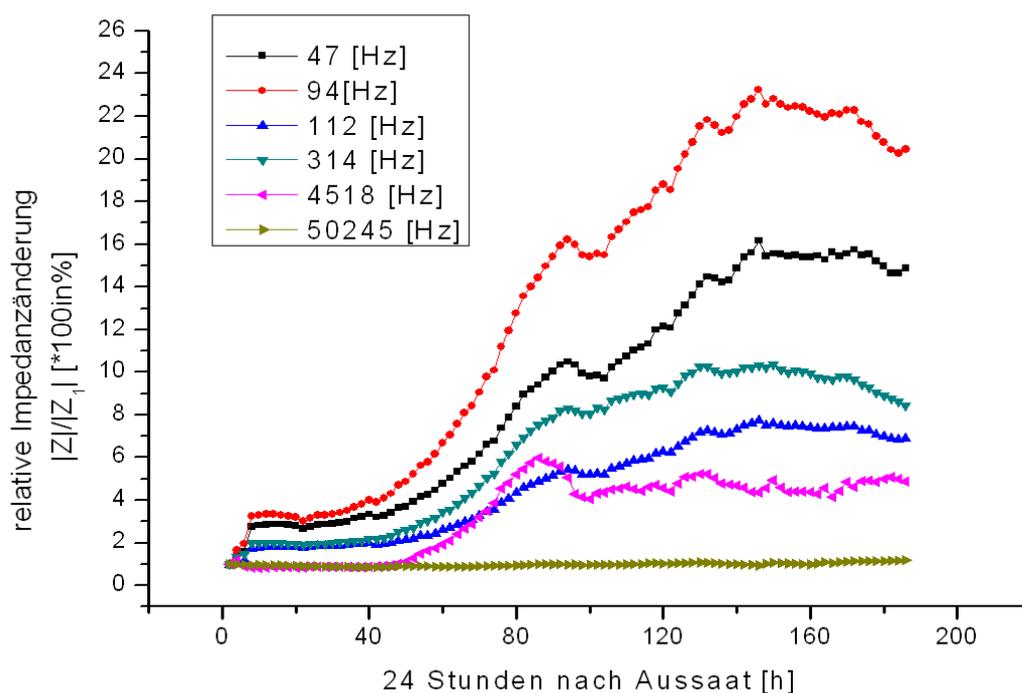


Abbildung 86: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|/|Z_i|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung für eine Auswahl an Frequenzen.

Da die Lage des globalen Maximums sowie die Form der relativen ($|Z|/|Z_i|$) Bioimpedanzspektra vom Index i bezüglich dessen der *Quotient* ($|Z|/|Z_i|$) gebildet wird abhängt und durch die Darstellungsform als *Quotient* bei Vorhandensein von den in Kapitel 4.1.4.1 definierten „Ausreißern“ stark verzerrt wird, wird als zweite Darstellungsform der Impedanzmesswerte in relativen Bioimpedanzspektra die *Differenz* ($|Z|-|Z_i|$) verwendet (vgl. Kap.3.5). Die Änderungen in der Darstellung als Differenz ($|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega)|$) ist zudem unabhängig vom a priori Impedanzwert (Impedanz des RMPI-Mediums) und stellt auch wenn die Impedanz unter den a priori Impedanzmesswert fällt, die Änderung im Impedanzspektrum unverzerrt (vgl. Kap.3.5) dar. Besonders bei den Ergebnissen aus Zellkulturkammer_1 der 4. Bioimpedanzmessung, die offensichtlich von Messfehlern behaftet sind, schafft diese Darstellungsart Klarheit.

In der Abbildung 87 wird das relative ($|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega)|$) Bioimpedanzspektrum der Messung in Zellkulturkammer_1 der 4. Bioimpedanzmessung dargestellt. Abbildung 87 zeigt, dass der Anstieg der transepithelialen Impedanz nach einer gewissen Zeit nach Zellaussaat bei niedrigen Frequenzen am stärksten ausgeprägt ist. Um das genauer zu veranschaulichen, werden in Abbildung 88 die zeitlichen Änderungen der Differenz

$|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega,t=24h)|$ für ausgesuchte Frequenzen dargestellt. Das globale Maximum ($|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega,t=24h)|_{\max}$) wurde 202h nach Zellaussaat bei einer Frequenz von 20Hz erreicht (siehe Abb.88).

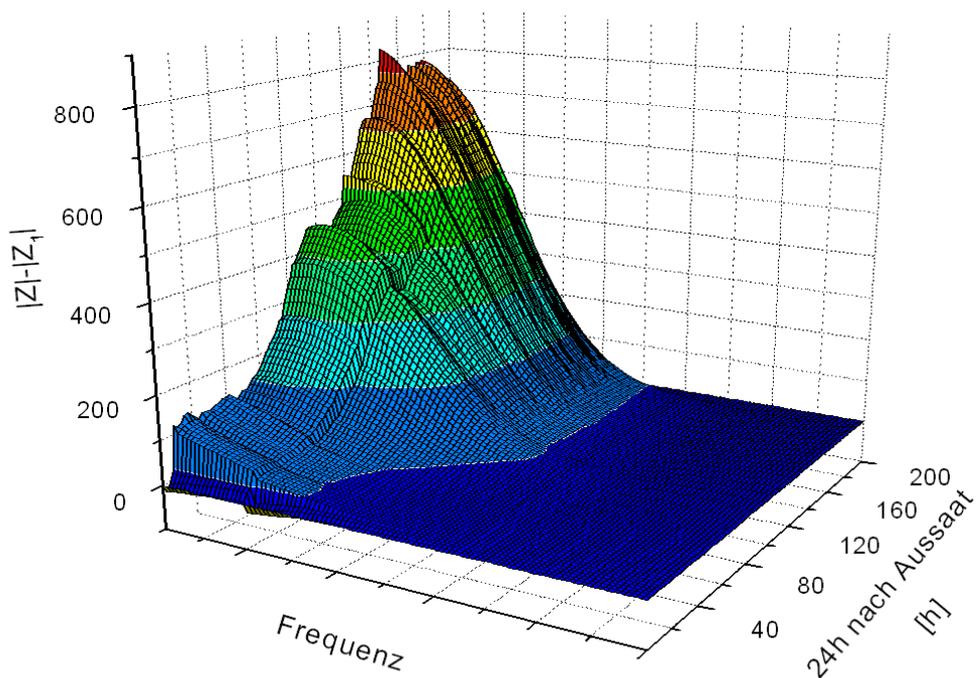


Abbildung 87: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung. (die Frequenzachse hier skaliert wie in Abb. 85.)

Abbildung 87 zeigt für die Zellkulturkammer_1 der 4. Bioimpedanzmessung, dass der Anstieg der transepithelialen Impedanz bei niedrigen Frequenzen am stärksten ausgeprägt ist. Um das genauer zu veranschaulichen, werden in Abbildung 88 die zeitlichen Änderungen der Differenz ($|Z(\omega, t)| - |Z_i(\omega, t=1)|$) von ausgesuchten Frequenzen dargestellt. Dabei wird das globale Maximum ($|Z(\omega, t)| - |Z_i(\omega, t=24\text{h nach Aussaat})|$)_{max} 202h nach Zellaussaat bei einer Frequenz von 20Hz erreicht (siehe Abb.88).

Das heißt, dass die transepitheliale Impedanz bei zunehmender Konfluenz des Caco-2-Zellgewebes bei niedrigeren Frequenzen stärker ansteigt, als aus der Darstellung durch den Quotienten ($|Z|/|Z_1|$) ersichtlich ist.. Aus diesem Grund, wird nach den nun folgenden Ergebnissen der 5. Bioimpedanzmessung, eine tabellarische Übersicht der globalen Maxima, die einmal durch Darstellung des Quotienten ($|Z(\omega, t)|/|Z_i(\omega)|$)_{max} und einmal durch Darstellen der Messergebnisse durch die Differenz ($|Z(\omega, t)| - |Z_i(\omega)|$)_{max} bestimmt wurden, angeführt. Diese Übersicht und eine weiterführende Diskussion ist in Kapitel 4.3.3.3 zu finden.

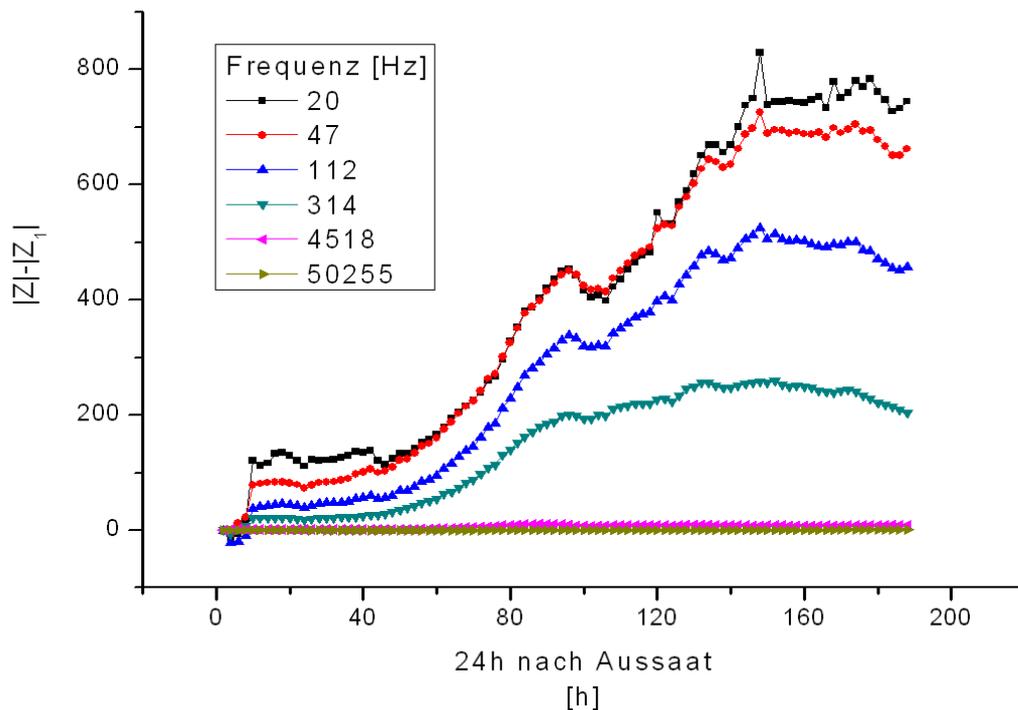


Abbildung 88: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z|-|Z_i|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung, für eine Auswahl von Frequenzen.

4.3.3.2 Fünfte Bioimpedanzmessung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der 5. Bioimpedanzmessung vorgestellt, beschrieben und diskutiert. In der 5. Bioimpedanzmessung wurde gegenüber der 4. Bioimpedanzmessung, die Versuchsdauer um ca. 2 Tage auf 9 Messtage verlängert und das Frequenzspektrum auf 1Hz-100kHz etwas ausgeweitet. Die Anzahl der Frequenzmesspunkte (FMP) im Impedanzspektrum blieb bei 100. Der Messaufbau entspricht dem der 4. Bioimpedanzmessung. Die Darstellungen der relativen Impedanzspektra sind in Kapitel 3.5 beschrieben. Neben den Darstellungen der zeitlich veränderlichen Impedanzspektra werden mikroskopische Auf- und Durchlichtaufnahmen, der Zellkulturen wie sie in Kapitel 3.6 beschrieben sind, präsentiert. Die Aufnahmen wurden am Ende der Messserie, also 258h nach Zellaussaat, gemacht. Die Größenverhältnisse in den mikroskopischen Aufnahmen können den Abmessungen des IDES-Chip (vgl. Kap.2.2.1.4) entnommen werden, dabei bietet sich als geeignetes Maß, der Abstand der unteren Bottom-Elektroden auf dem Glassubstrat an (vgl. auch Abb.90 (B)).

Da nach der 4. Bioimpedanzmessung bei Messfrequenzen $\leq 20\text{Hz}$ durch die Darstellung der relativen Bioimpedanzspektra als Differenz ($|Z(\omega,t)|-|Z_i(\omega)|$) signifikante ($|Z|/|Z_i|>2$ bzw. $|Z|-|Z_i|>100$) Änderungen beobachtet wurden, liegen in der 5. Bioimpedanzmessung 40 Frequenzmesspunkte (von insgesamt 100) der IS-Messung zwischen 1Hz und 100Hz.

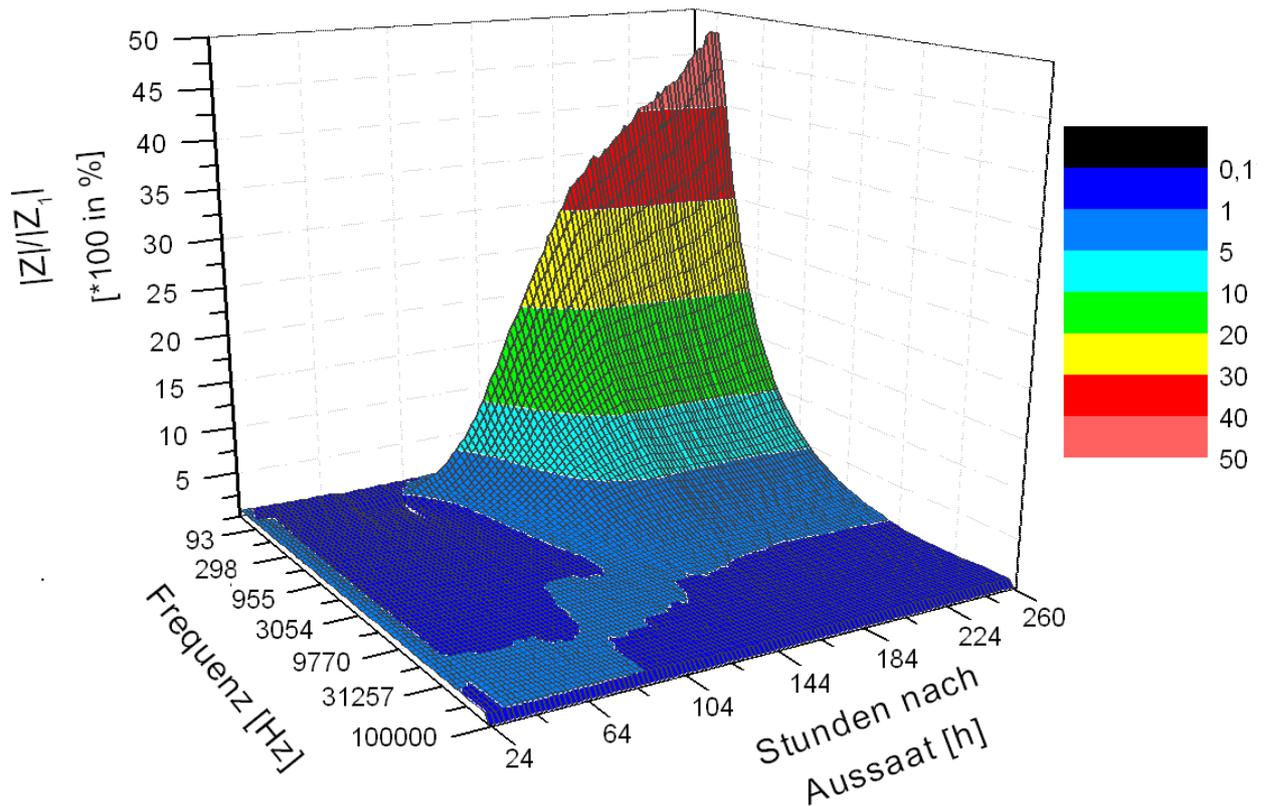


Abbildung 89: 5. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_3; relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum, bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen; Bemerkung: vor dem globalen Maximum, zwischen dem Frequenzmesspunkt bei 93Hz und dem bei 104Hz, ist ein „Sprung“.

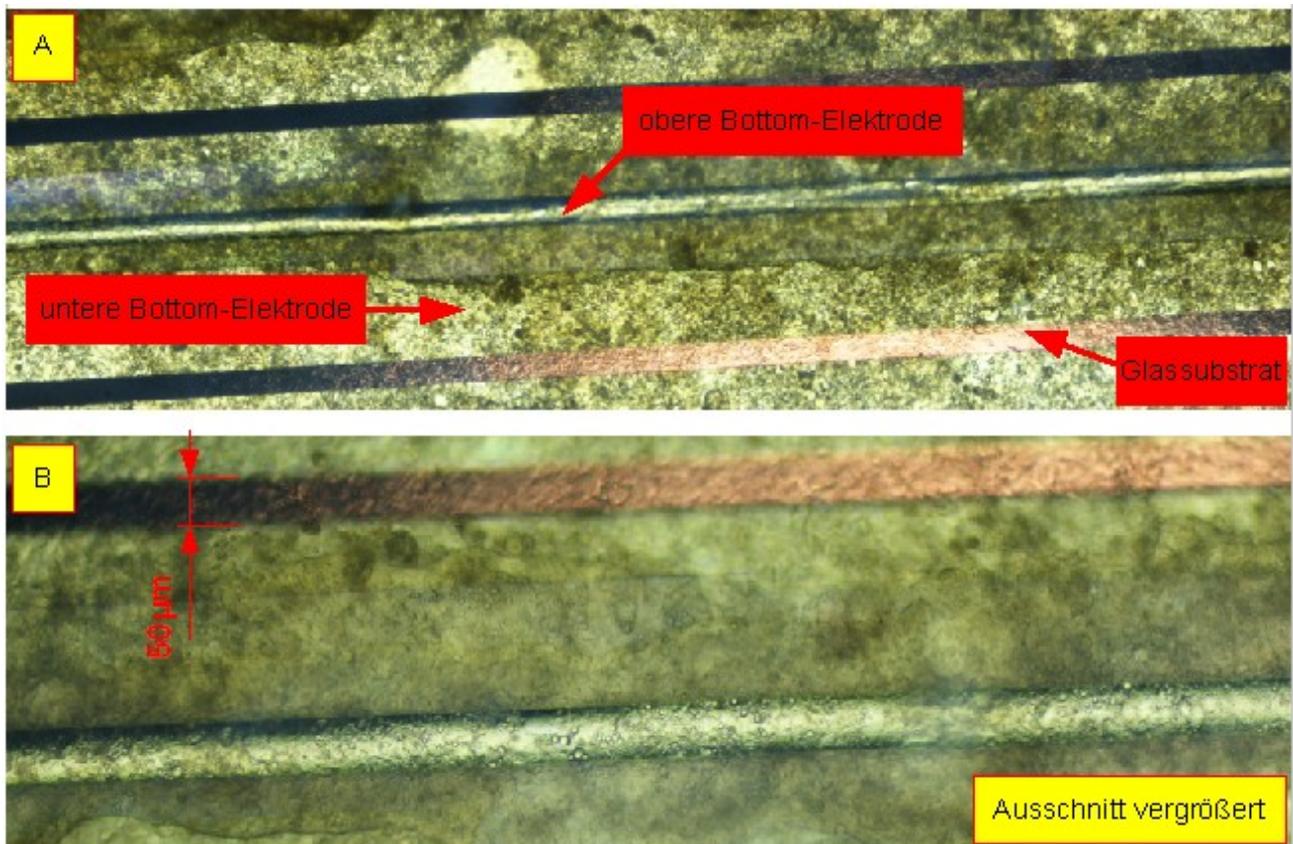


Abbildung 90: Mikroskopische Auflichtaufnahme; 5. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_3.

In der Abbildung 89 ist ein relatives ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum dargestellt, dem Messdaten von Zellkulturkammer_3 der 5. Bioimpedanzmessung zu Grunde liegen. Abbildung 90 zeigt zwei mikroskopische Auflichtaufnahmen von Zellkulturkammer_3, die 258h nach Zellaussaat mit unterschiedlichen Vergrößerungen (Abb.90 A,B) aufgenommen wurden. Zu sehen ist in Abbildung 90 die Oberfläche des IDES-Chip, die vollständig von Caco-2-Gewebe bedeckt ist. Aus dem Vergleich dieser beiden Abbildungen lässt sich wiederum schließen, dass mit Zunahme der Bedeckung der Chipoberfläche, die transepitheliale Impedanz angestiegen ist. Das relative ($|Z|/|Z_1|$) Bioimpedanzspektrum in Abbildungen 89 zeigt bis zum Ende der Bioimpedanzmessung einen monotonen Anstieg der Impedanz in einem signifikanten ($|Z|/|Z_1| > 2$) Frequenzbereich von 32Hz bis 3853Hz. Das globale Maximum ($|Z|/|Z_1|_{\max.} = 48$) wurde bei 104Hz und 258h nach Aussaat festgestellt (vgl. Abb.91).

Die Impedanzmesswerte bei Frequenzen $< 32\text{Hz}$ sind von vielen „vereinzelt irregulären MP“ geprägt und zwischen den Impedanzmesspunkten bei 94Hz und 103Hz ist ein „Sprung“ zu vermerken (vgl. Abb.91). Unter anderem wird deshalb in Abbildung 92 und 93 die Differenz ($|Z(\omega, t)| - |Z_1(\omega, t=1)|$) der Messwerte von Zellkulturkammer_3 der 5. Bioimpedanzmessung als ein relatives ($|Z| - |Z_1|$) Bioimpedanzspektrum dargestellt.

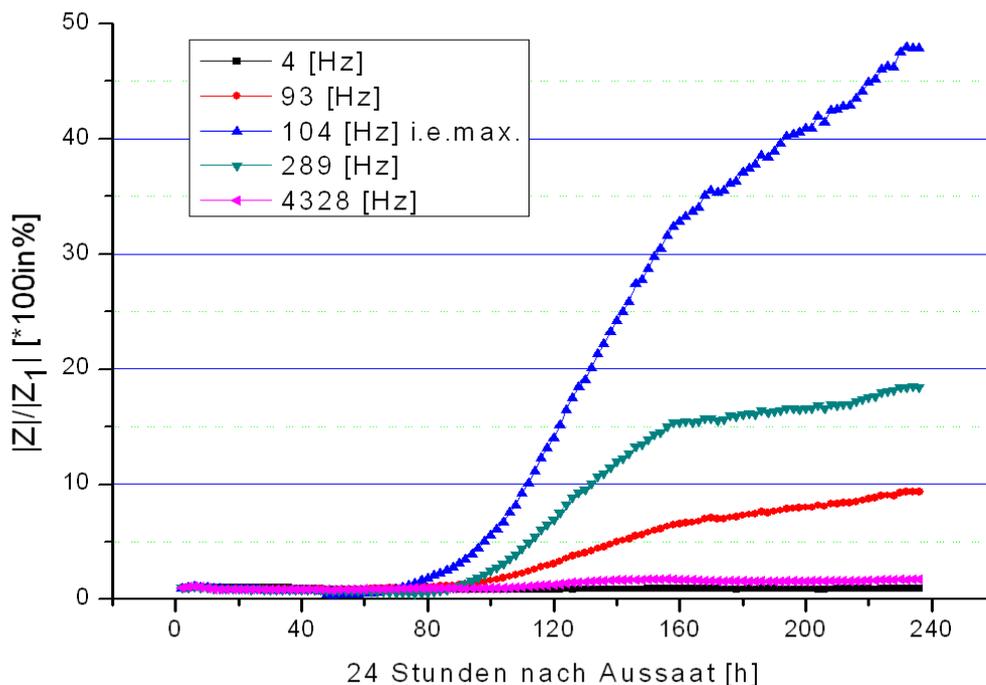


Abbildung 91: 5. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_3; Verlauf der relativen Impedanzänderung ($|Z|/|Z_1|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung. (Bem.: vor dem Maximum, d.h. zwischen den Messwerten bei 93Hz und 104Hz ist ein „Sprung“ der Impedanz)

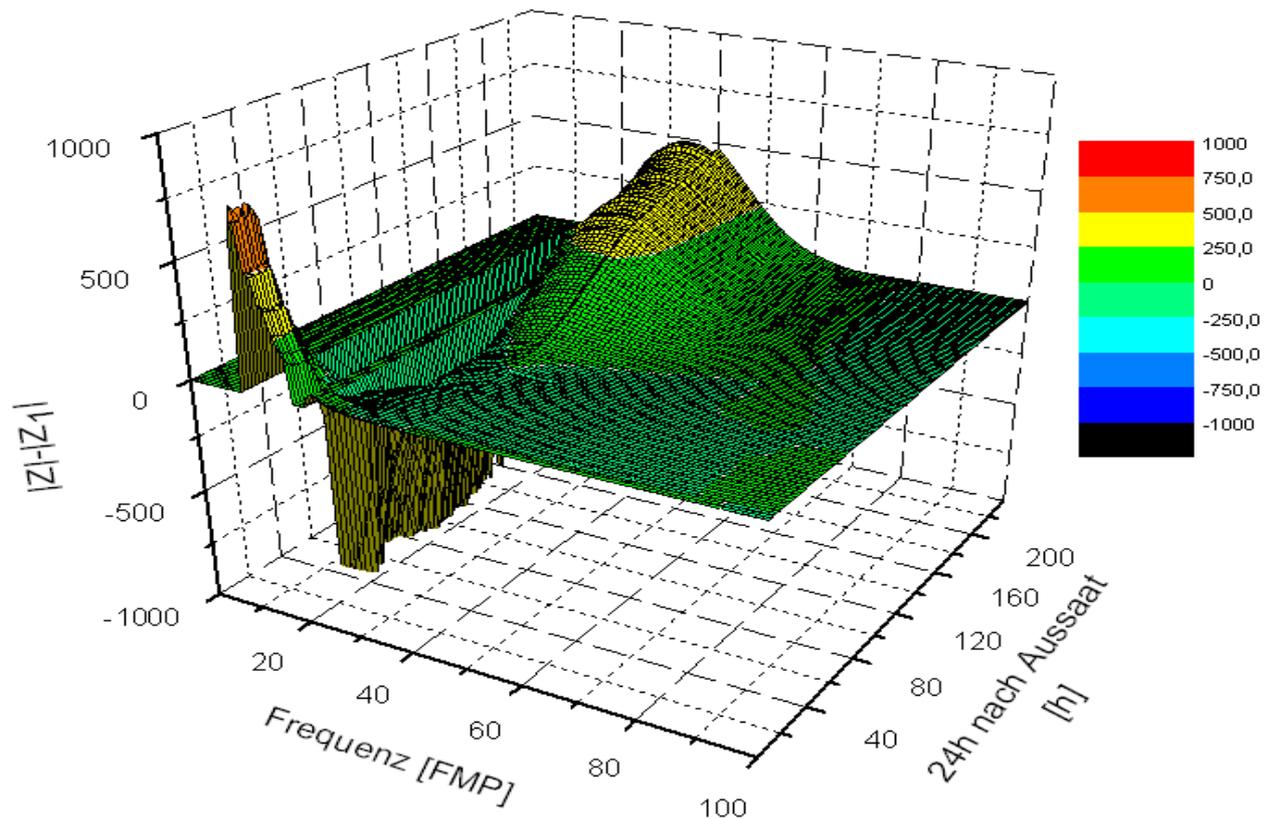


Abbildung 92: 5. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_3; Bioimpedanzdifferenzspektrum ($|Z| - |Z_1|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung/ 24 h nach Aussaat der Caco-2-Zellen (Frequenzmesspunkte (FMP) in [Hz]: 1 \rightarrow 1 [Hz], 20 \rightarrow 9 [Hz], 40 \rightarrow 93 [Hz], 60 \rightarrow 955 [Hz], 80 \rightarrow 9770 [Hz], 100 \rightarrow 100 [kHz]).

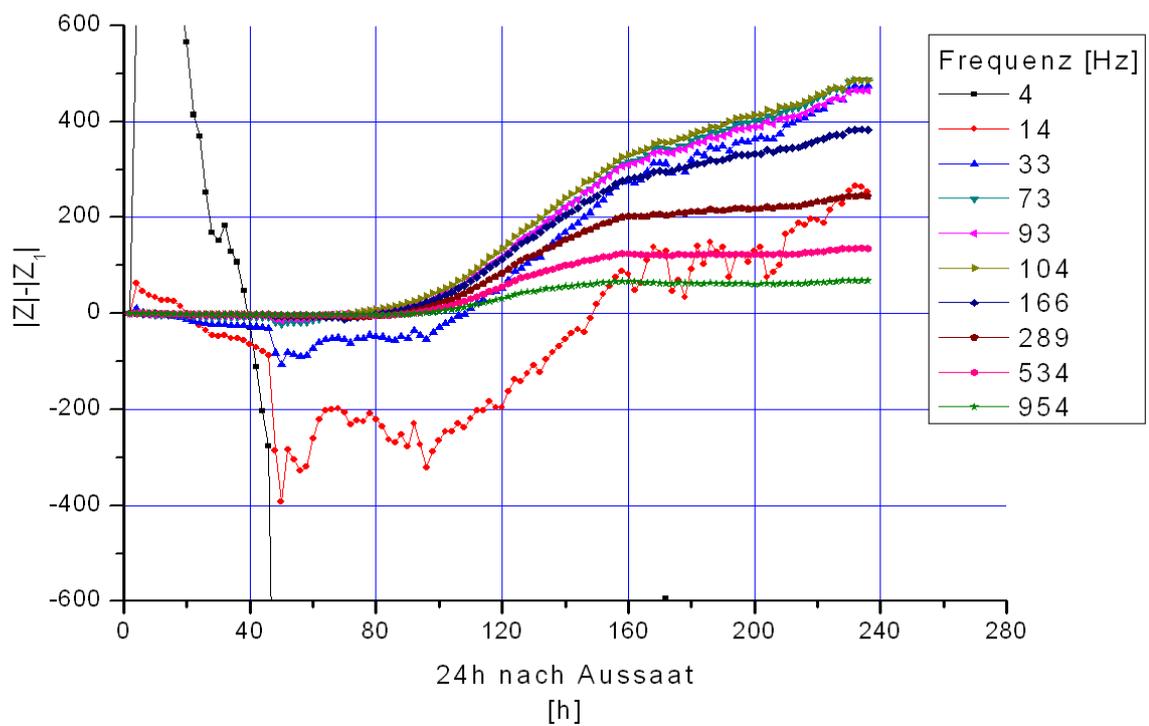


Abbildung 93: 5. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_3; Verlauf der Differenzänderungen der Impedanz ($|Z| - |Z_1|$), bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung.

Abbildung 93, in der Differenzänderungen Impedanz ($|Z|-|Z_1|$) (bezüglich der 1. impedanzspektroskopischen Messung) für ausgesuchte Frequenzen dargestellt sind, zeigt, dass für Messfrequenzen kleiner als 33Hz keine „reproduzierbaren“ Messergebnisse aufgenommen werden konnten. Ab 33Hz steigt die transepitheliale Impedanz mit der Zeit nach Aussaat bis zum Ende (ab 120h nach Zellaussaat) der Bioimpedanzmessung an. Das erhärtet den Verdacht, dass die transepitheliale Impedanz im niederen Frequenzbereich vehementer auf den Caco-2-Gewebeaufbau reagiert als in der Darstellung der relativen Impedanz $|Z|/|Z_1|$ ersichtlich war. Interessant ist zudem, dass auch hier, wie in Abbildung 93 dargestellt, durch die Darstellung des Quotienten $|Z|/|Z_1|$ ab etwa 184h nach Zellaussaat der Anstieg der transepithelialen Impedanz mit Zunahme der Gewebeverdichtung, etwas abflacht. Auch in der 3. und 4. Bioimpedanzmessung konnte dies in ähnlicher Form beobachtet werden, wobei manchmal zu diesem Zeitpunkt nach Zellaussaat, gar ein Abfall der Impedanz beobachtet wurde.

Weitere Ergebnisse werden in den Anhang gestellt bzw. erfolgen in tabellarischer Form im Anschluss.

Tabellarische Zusammenfassung der 5. Bioimpedanzmessung:

Gesucht ist eine Korrelation zwischen transepithelialer Impedanz und Bedeckungsgrad der Elektroden.

Die folgende tabellarische Zusammenstellung umfasst:

- In Tabelle 12; 2D-Kontur-Plots, die die zeitliche Veränderung in den Bioimpedanzspektren, die in verschiedenen Zellkulturkammern aufgenommen wurden, durch den Quotienten $|Z(\omega, t > i)|/|Z_i(\omega, t = i)|$ darstellen.
- In Tabelle 13 und 14; mikroskopische Auflichtaufnahmen der Caco-2-Zellkulturen, die am der Messserie, 258h nach Aussaat gemacht wurden, und relativen Impedanzänderungen entlang der Messzeit für ausgesuchte Frequenzen gegenübergestellt werden.
- In Tabelle 15; Differenzwerte ($|Z|-|Z_1|$) die gegenüber der Frequenz und der Zeit nach Aussaat in 3D-Diagrammen dargestellt werden.

Die Ergebnisse der folgenden tabellarischen Zusammenstellung werden ausführlich im anschließenden Kapitel 4.3.3.3 diskutiert.

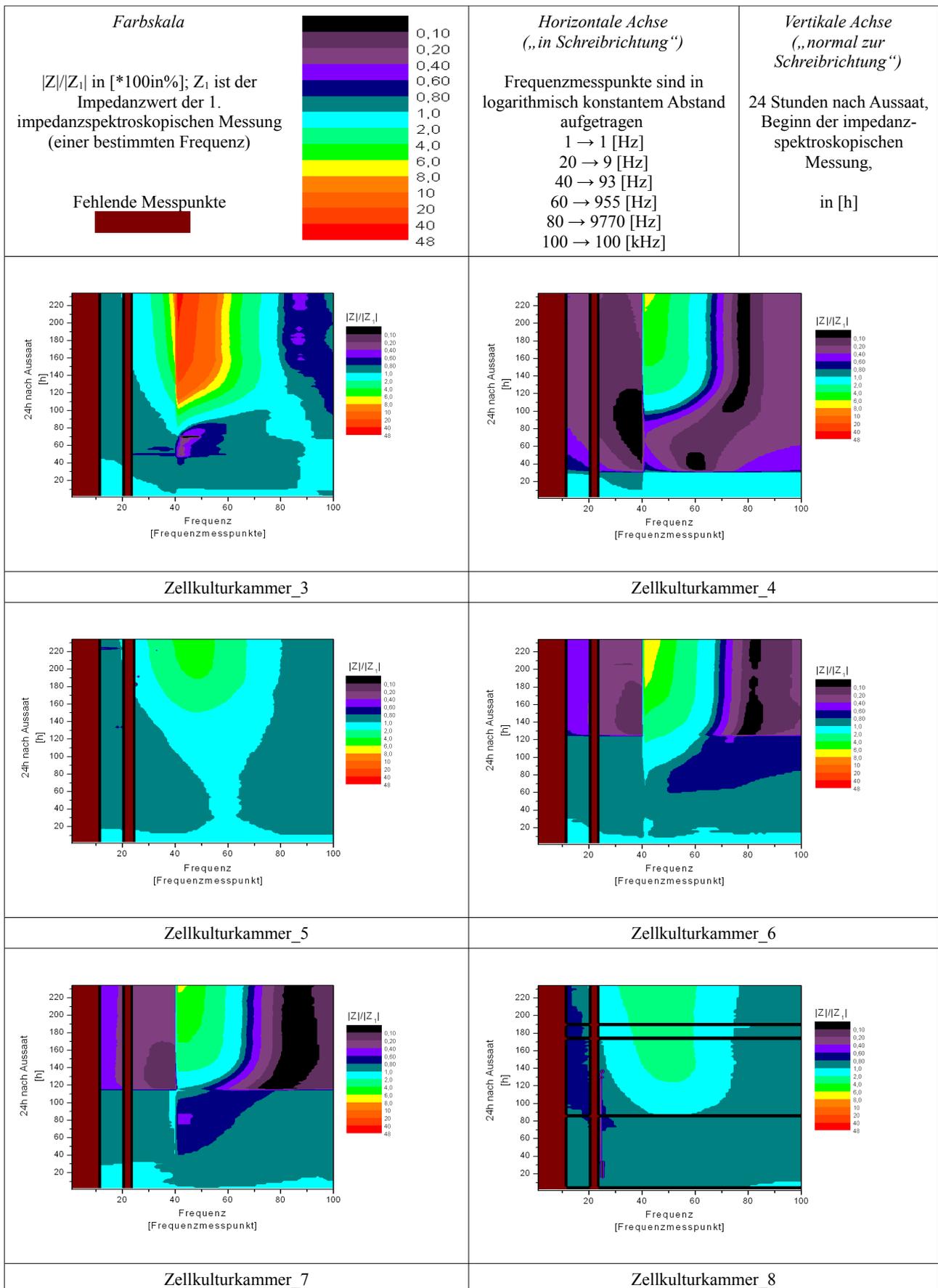


Tabelle 12: Zusammenstellung der zeitlichen Veränderungen in den Impedanzspektren ($|Z|/|Z_1|$) der 5. Bioimpedanzmessung als Kontur-Plot; Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 4.3.3.3.

In der Tabelle 13 und Tabelle 14 werden in der linken Spalte mikroskopische Aufnahmen präsentiert, die die Zellbedeckung der Chipoberfläche am Ende der 5. Bioimpedanzmessung (258h nach Zellaussaat) zeigen. In allen (3 bis 8) Zellkulturkammern wurden 258h nach Zellaussaat augenscheinlich konfluentes Caco-2-Zellgewebe festgestellt. Eine illustrative Beschreibung der Größenverhältnisse auf der Chipoberfläche ist in Abbildung 90 dargestellt. In der rechten Spalte von Tabelle 13 und 14 werden die dazugehörigen relativen ($|Z|/|Z_1|$) Impedanzänderungen der Frequenz, bei der das globale Maximum ($(|Z|/|Z_1|)_{\max}$) aufgetreten ist (wird

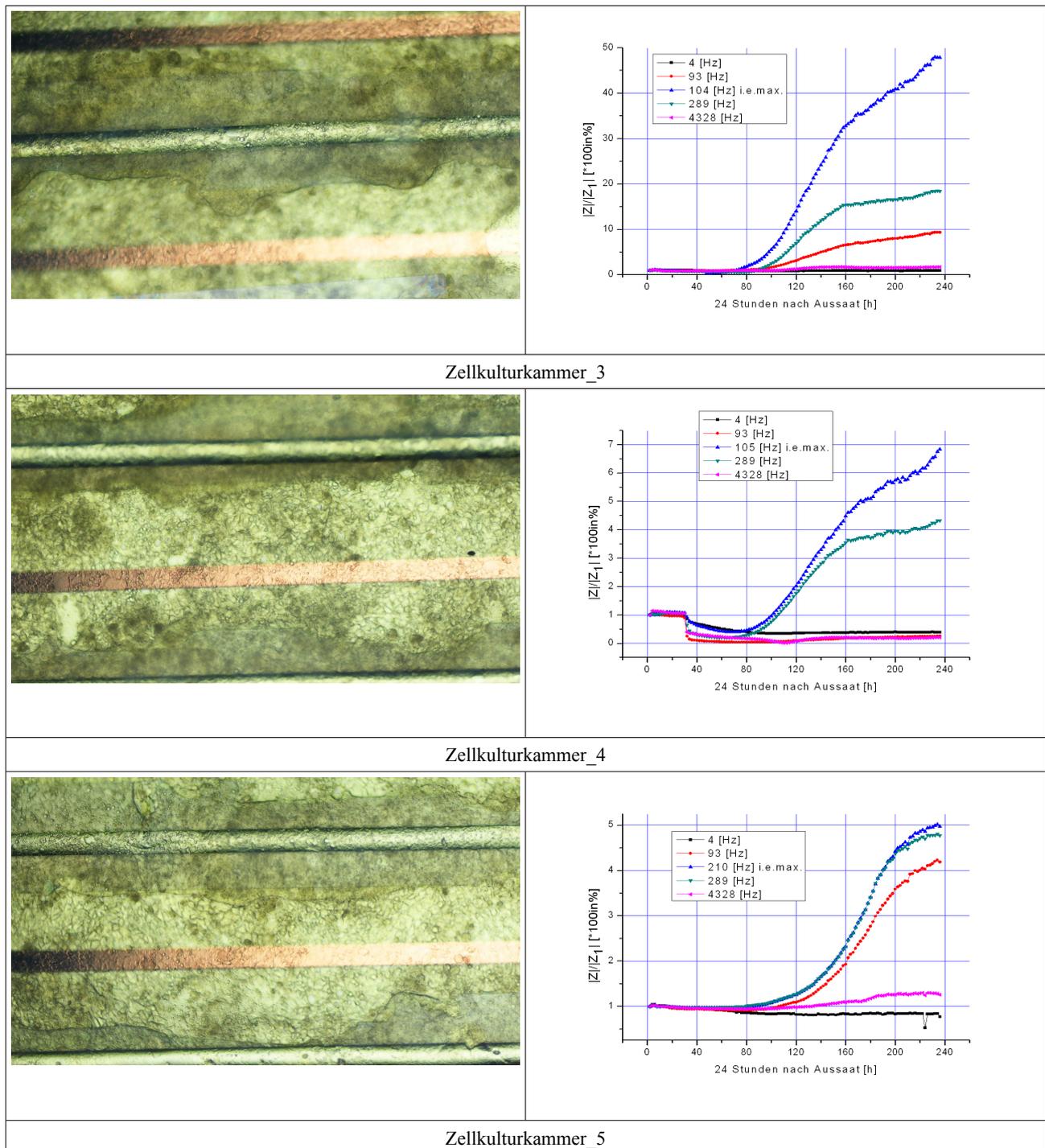


Tabelle 13: Zusammenstellung mikroskopischer Aufnahmen, die 258h nach Aussaat gemacht wurden (links), mit gleichzeitigem Vergleich der $|Z|/|Z_1|$ -Werte „ausgewählter“ Frequenzen (rechts) die gegenüber der Zeit nach Aussaat auftragen. (5. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammern 3-5); Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 4.3.3.3

als „i.e. Max.“ gekennzeichnet) und für 4 weitere Frequenzen (4Hz, 93Hz, 210Hz, 289Hz und 4328Hz), die in allen Diagrammen, der besseren Vergleichbarkeit wegen, jeweils gleich gewählt wurden gegenübergestellt. Anhand Tabelle 13 und 14 kann die Zunahme der transepithelialen Impedanz welche auf die Caco-2-Zellgewebeverdichtung zurückzuführen ist, beobachtet werden. (Die Ergebnisse von Tabelle 14 und 15 werden im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert.)

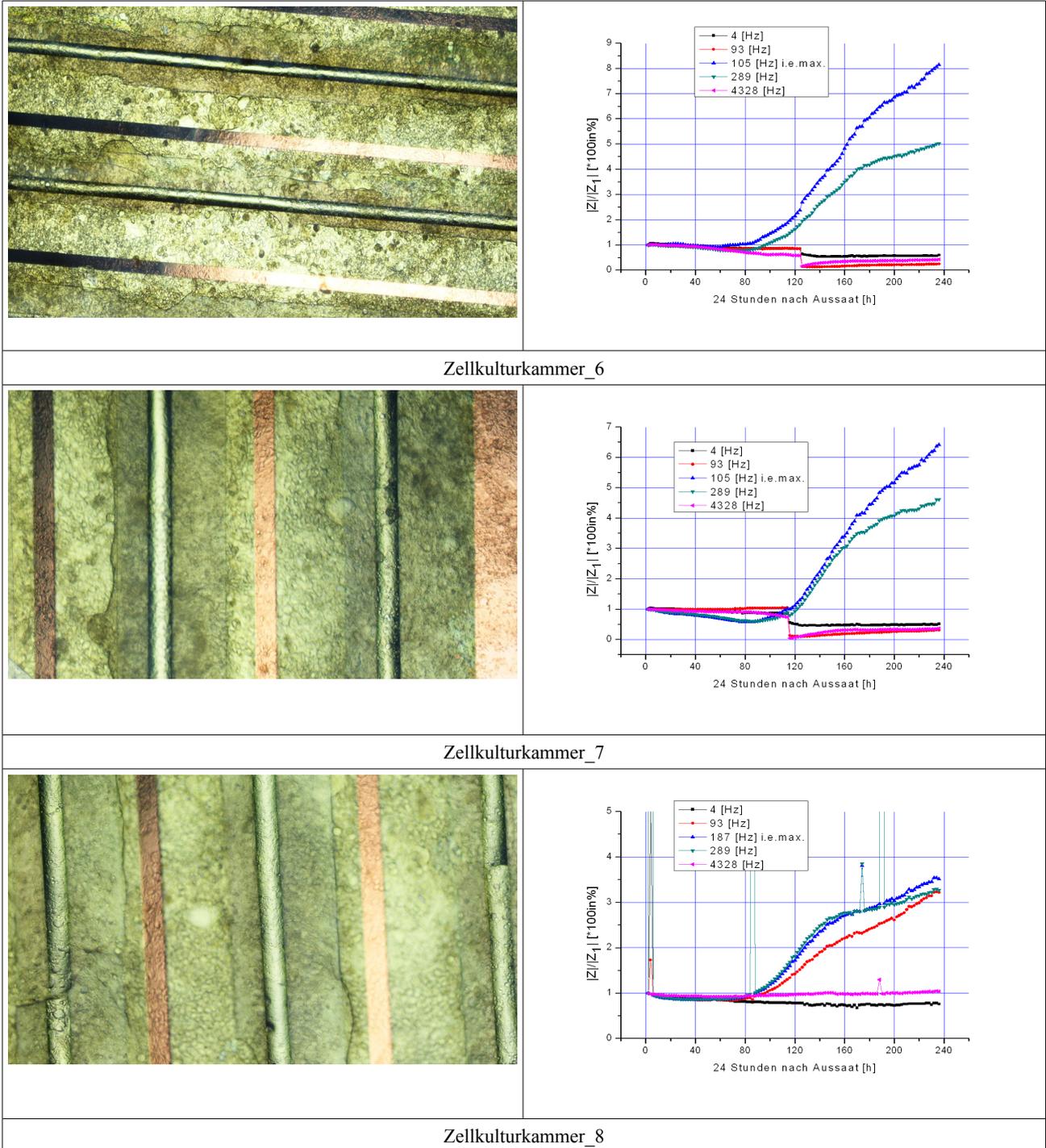


Tabelle 14: Zusammenstellung mikroskopischer Aufnahmen, die 258h nach Aussaat gemacht wurden (links), mit gleichzeitigem Vergleich der $|Z|/|Z_1|$ -Werte „ausgewählter“ Frequenzen (rechts), die gegenüber der Zeit nach Zellaussaat aufgetragen sind. (5. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammern 6-8); Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 4.3.3.3.

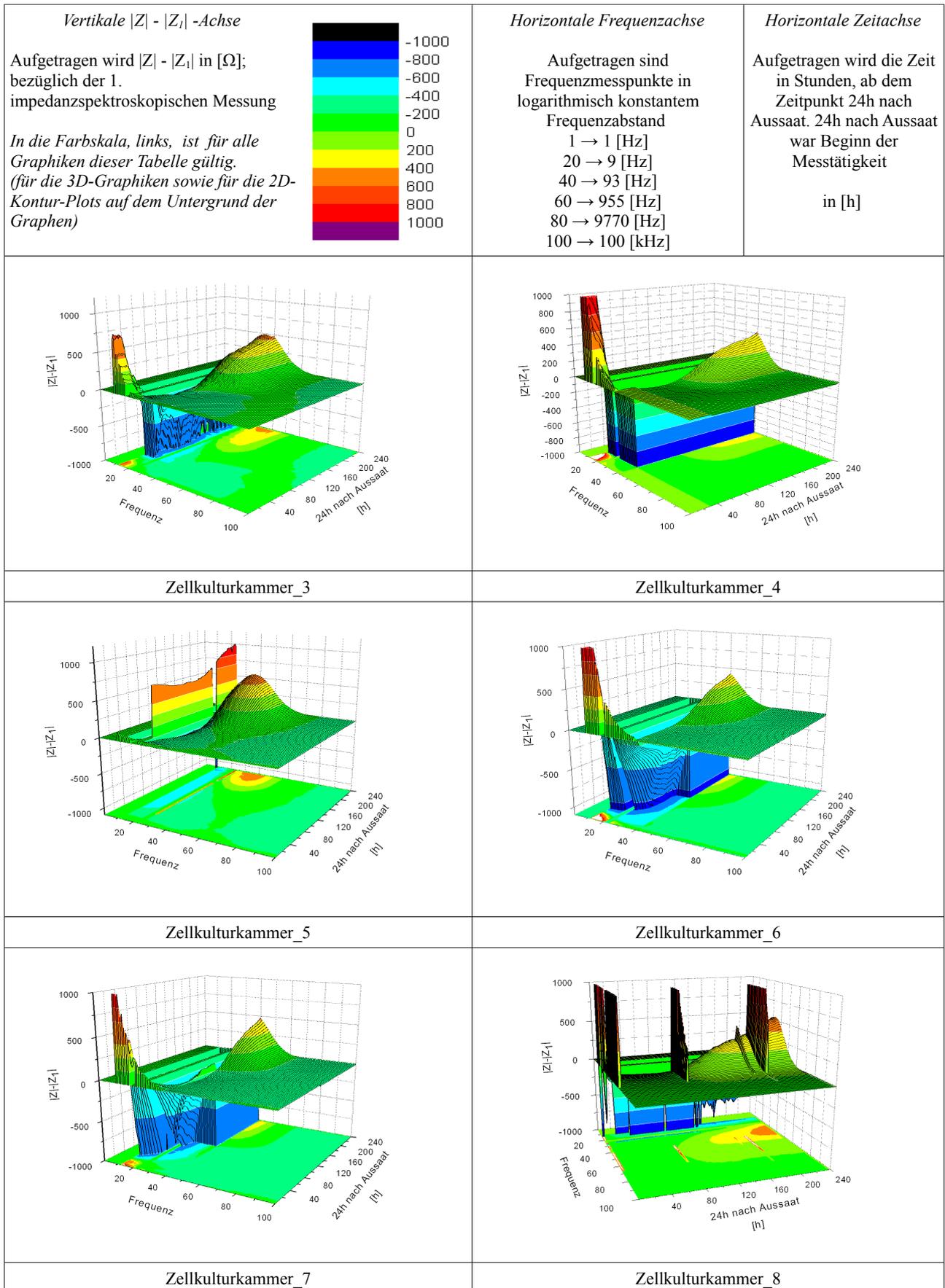


Tabelle 15: Zusammenstellung relativer ($|Z| - |Z_1|$) Bioimpedanzspektra der 5. Bioimpedanzmessung: Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 4.3.3.3.

In Tabelle 15 werden $|Z|/|Z_1|$ -Werte, gegenüber der Frequenz und der Zeit nach Aussaat dargestellt. Auf die Grundfläche der 3D-Graphen wurden die Änderungen der Differenz ($|Z|/|Z_1|$) in Form von Kontur-Plots projiziert.

4.3.3.3 Ergebnisübersicht der 4. und 5. Bioimpedanzmessung

Im Folgenden werden Ergebnisse der 5. Bioimpedanzmessung und im Anschluss die der 4. Bioimpedanzmessung beschrieben und Charakteristika zum einfachen Vergleich der Messergebnisse herausgearbeitet. Besonderes Augenmerk liegt in der Detailbeschreibung der Inhalte der Tabellen 12, 13, 14 und 15.

Kurz, in Stichworten, zur 5. Bioimpedanzmessung: Verwendung von IDEs-Elektroden; Gesamtdauer: bis 258h nach Aussaat =118 IS-Messungen in der Messserie; Frequenzbereich: 1Hz-100kHz mit 100 Frequenzmesspunkten.

Zellkulturkammer_1 und Zellkulturkammer_2 zeigten keine Ergebnisse. (Zellkulturkammer_1: Das Ergebnis einer „offenen Messung“ (vgl. Tabelle 7 und 8); Zellkulturkammer_2: Nur eine sehr geringe Änderung im Impedanzspektrum) Die Ergebnisse von Zellkulturkammer_1 und Zellkulturkammer_2 wurden nicht dargestellt und werden deshalb nicht weiter behandelt.

Die Impedanzmesswerte (der Messungen in den restlichen Zellkulturkammern_3 bis _8) der ersten 12 Frequenzmesspunkte (12.FMP) zeigten stets den Wert =0, d.h. es liegen keine Impedanzmesswerte für Frequenzen $\omega < 3,3\text{Hz}$ vor. Im Frequenzbereich $\omega < 30\text{Hz}$, das betrifft die ersten 30 Frequenzmesspunkte (von insgesamt 100), konnten oft keine durchgehend „sinnvollen“ (z.B. durch Auftreten von „vereinzelte irreguläre Messpunkte“) Impedanzmesswerte gemessen werden. Dies ist gut in der vorherigen tabellarischen Zusammenstellung (Tabelle 12) der $|Z|/|Z_1|$ -2D-Kontur-Plots zu erkennen. In den $|Z|/|Z_1|$ -2D-Kontur-Plots zeigen die Zellkulturkammern_4, _6 und _7 erst ab dem 41. Frequenzmesspunkt, das entspricht einer Frequenz von 104,76 Hz, zeitliche Veränderungen des Impedanzspektrums in Richtung $|Z|/|Z_1| > 1$.

Änderungen von $|Z|/|Z_1| > 2$ (im $|Z|/|Z_1|$ -Kontur-Plot in Tabelle 12 entsprechen einer Türkis-grünen Färbung) traten hauptsächlich im Frequenzbereich von 50Hz (35.FMP, bei Zellkulturkammer_8, _5 und _3) bzw. 105 Hz (41.FMP, bei Zellkulturkammer_7, _6 und _4) bis etwa 955Hz (60.FMP) auf. Zellkulturkammern_8, _5 und _6 zeigen Änderungen von $|Z|/|Z_1| > 2$ bis zu höheren Frequenzen von bis 2kHz.

Vom Zeitpunkt der Zellaussaat, bis zum ersten Erreichen der signifikanten $|Z|/|Z_1| > 2$ Marke, sind wenigstens 115h (Zellkulturkammer_3) und maximal 170h (Zellkulturkammer_8) verstrichen. Mit Erreichen der $|Z|/|Z_1| > 2$ Niveaus, blieb der $|Z|/|Z_1|$ -Wert konstant oder stieg mit der Zeit nach Aussaat tendenziell monoton weiter an. Es wurde beobachtet, dass die Änderung von $|Z|/|Z_1|$ im zeitlichen Verlauf bei unterschiedlichen Frequenzen verschieden ist. Deshalb ist unter anderem die Angabe des Index i von Bedeutung.

In der tabellarischen Zusammenstellung in Tabelle 13 und 14, wurden mikroskopische Aufnahmen gezeigt, die in allen Zellkulturkammern einen hohen Zell-Bedeckungsgrad der Bottom-Elektroden des IDEs-Chips

zeigen. Direkt rechts neben den mikroskopischen Aufnahmen (in den Tabellen 13 und 14), wurden $|Z|/|Z_1|$ -Werte für die Frequenz, bei der das globale Maximum $(|Z|/|Z_1|)_{\max}$ aufgetreten ist und für 4 weitere, für alle Zellkulturkammern gleich gewählte Frequenzen, $|Z|/|Z_1|$ gegenüber der Zeit nach Aussaat auftragen. Es zeichnete sich dort ab, dass der $|Z|/|Z_1|$ -Wert bei Frequenzen kleiner als die Frequenz des globalen Maximums $(|Z|/|Z_1|)_{\max}$ später und vehementer mit der Zeit nach Aussaat ansteigt, als das bei vergleichsweise höheren Frequenzen der Fall ist. Wie schon vorher erwähnt ist interessant, und in Tabelle 13 und 14 schön durch den kompakten Vergleich der Ergebnisse zu sehen ist, flacht ab einem bestimmten Zeitpunkt nach Zellaussaat der Anstieg der transepithelialen Impedanz mit Zunahme der Gewebeverdichtung, etwas ab. Dieser Zeitpunkt scheint frequenzabhängig zu sein, sodass je höher die Messfrequenz ist, desto später flacht der Anstieg ab.

Die zeitliche Änderung der Differenz $|Z|-|Z_1|$ wurde in 3D-Graphen im vorigen Kapitel in Tabelle 15 zusammengefasst vorgestellt. Die Differenz $|Z|-|Z_1|$ ändert sich zur derselben Zeit nach Aussaat und Frequenz wie der Quotient $|Z|/|Z_1|$, nur skalieren diese Änderungen in der Darstellung jeweils verschieden. So zeigen sich die größten Änderungen der transepithelialen Impedanz in der Darstellung der *Differenz* bei den niedrigsten eingepprägten Messfrequenzen. (Im Gegensatz dazu zeigt der Quotient, dessen Wert vom Absolutbetrag der Impedanz abhängt, die größten Änderungen im Impedanzspektrum bei höheren Frequenzen.

Um all diese Sachverhalte übersichtlicher darzustellen wird in der Tabelle 16, das Charakteristikum „partielles-globales Maximum“ beider Darstellungsformen für alle Zellkulturkammern der 5. Bioimpedanzmessung gegenübergestellt. Dabei bedeutet „partielles-globales Maximum“, das entsprechende Maximum $(|Z|-|Z_1|)_{\max}$ bzw. $(|Z|/|Z_1|)_{\max}$, das in einem abgegrenzten Frequenzintervall innerhalb des gesamten Messzeitraumes (24h bis 258h nach Aussaat) festgestellt wurde.

Ad Tabelle16:

Die $|Z|-|Z_1|$ und $|Z|/|Z_1|$ -Werte wurden alle bezüglich der 1. IS-Messung der Messserie (d.h. Index $i=1$) gebildet. „Vereinzelte irreguläre Messpunkte“ (vgl. Kap.4.1.4.1) wurden aus der Auswertung herausgenommen ($=0$) und als eine „Besonderheit“ in Tabelle 16 genannt. In **roter** Schrift markiert sind „Ausreißer“ (vgl. Kap.4.1.4.1). Ist der Hintergrund **rot** markiert, zeigt das die vermeintliche Ursache an, weshalb die Werte in dieser Zeile **rot** markiert sind (wenn z.B. das globale Maximum schon zu Beginn der Bioimpedanzmessung festgestellt wurde). In **blauer** Schrift markiert wird der Wert der globalen Maxima $(|Z|-|Z_1|)_{\max}$ und $(|Z|/|Z_1|)_{\max}$. Die in Tabelle 16 angeführten Ergebnisse, die der bisherigen Erfahrung nach auffällig vom (unbeschriebenen) Regel-Normalfall abweichen, wurden **gelb** markiert.

In Tabelle 16 werden in der ersten Spalte (ganz links) die Zellkulturkammern angegeben. In den weiter rechts folgenden Spalten werden die Maxima von $|Z(\omega, t > i)| - |Z_i(\omega, t = i)|$ und $|Z(\omega, t > i)| / |Z_i(\omega, t = i)|$ die in abgegrenzten Frequenzintervallen ($1\text{Hz} < \omega < 30\text{Hz}$, $30\text{Hz} < \omega < 90\text{Hz}$, $90\text{Hz} < \omega < 1\text{kHz}$ und $\omega > 1\text{kHz}$) festgestellt wurden, aufgelistet. In der Spalte mit dem Titel „Besonderheit“ wird die Zellbedeckung und das

Auflösungsvermögen beschrieben, wobei das Auflösungsvermögen auf „Ausreißer“ (vgl. Kap.4.1.4.1), wie sie auch schon beim Messen von einfachen Elektrolytlösungen festzustellen waren, hinweist.

Zellkultur-kammer bzw. Frequenzbereich	$(Z(\omega, t > 1) - Z_1(\omega, t = 1))_{\max}$			$(Z(\omega, t > 1) / Z_1(\omega, t = 1))_{\max}$			Besonderheit
	$ Z - Z_1 $ [Ω]	Frequenz [Hz]	Zeit nach Aussaat [h]	$ Z / Z_1 $ [*100 in%]	Frequenz [Hz]	Zeit nach Aussaat [h]	
_3							Zellbewuchs/ Auflösung (vgl. Kap.4.1.4.1)
1Hz < ω < 30Hz	760	3,6	26	1,85	29	258	
30Hz < ω < 90Hz	560	14,5	252	7,73	83	252	
90Hz < ω < 1kHz	478	105	252	47,98	105	258	
$\omega > 1$ kHz	60	1072	254	6,27	1072	256	
_4							Konfluent/ $ Z(\omega < 3,3\text{Hz}) = 0$
1Hz < ω < 30Hz	2028	3,6	28	1,06	4,5	26	
30Hz < ω < 90Hz	330	14,5	26	1,02	33 - 93	26-30	
90Hz < ω < 1kHz	426	105	258	6,35	105	258	
$\omega > 1$ kHz	20	1072	256	1,5	1072	254	
_5							Konfluent / $ Z(\omega < 3,3\text{Hz}) = 0$; für $ Z(3,3\text{Hz} < \omega < 104\text{Hz}) $ traten viele „vereinzelte irreguläre Messpunkte“ auf.
1Hz < ω < 30Hz	446	29	256	2,1	29	256	
30Hz < ω < 90Hz	560	66	256	4,23	93	256	
90Hz < ω < 1kHz	537	105	256	5,2	210	256	
$\omega > 1$ kHz	85	1072	246	2,77	1072	246	
_6							Konfluent / $ Z(\omega < 3,3\text{Hz}) = 0$; für $ Z(3,3\text{Hz} < \omega < 104\text{Hz}) $ traten viele „vereinzelte irreguläre Messpunkte“ auf.
1Hz < ω < 30Hz	2075	3,6	28	1,06	3,6	24 - 30	
30Hz < ω < 90Hz	159	33	26	1,03	93	28	
90Hz < ω < 1kHz	429	105	258	8,15	105	258	
$\omega > 1$ kHz	37	1072	258	2,03	1072	254 - 258	
_7							Konfluent / $ Z(\omega < 3,3\text{Hz}) = 0$; für $ Z(3,3\text{Hz} < \omega < 104\text{Hz}) $ traten viele „vereinzelte irreguläre Messpunkte“ auf.
1Hz < ω < 30Hz	13	3,6	26	1,04	3,6-4	26	
30Hz < ω < 90Hz	112	30	26	1,05	93	134	
90Hz < ω < 1kHz	481	105	258	6,42	105	258	
$\omega > 1$ kHz	28	1072	258	1,74	1072	254-258	
_8							Konfluent / $ Z(\omega < 3,3\text{Hz}) = 0$ IS-Messungen der Messserie wurden gelöscht (vgl. Abb.118), d.h. Impedanzmesswerte wurden 0 gesetzt.
1Hz < ω < 30Hz	470	29	256	2	29	256	
30Hz < ω < 90Hz	553	65	256	3,33	93	256	
90Hz < ω < 1kHz	504	105	256	3,46	210	256	
$\omega > 1$ kHz	51	1072	256	1,86	1072	256	

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Maximalwerte von $|Z| - |Z_1|$ und $|Z| / |Z_1|$ global und für abgegrenzter Frequenzintervalle (5. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammern _3 bis _8).

Zu den Ergebnissen der 4. Bioimpedanzmessung

Die folgende tabellarische Zusammenfassung (siehe Tab.17) basiert auf Impedanzmessdaten der 4. Bioimpedanzmessung, die in Kapitel 4.3.3.1 schon vorgestellt und beschrieben wurden und hier diskutiert wird.

Kurz, in Stichworten, zur Messung selbst: Verwendung von IDEs-(Bottom)-Elektroden; Gesamtdauer: bis 200h nach Aussaat =94 IS-Messungen in der Messserie; Frequenzbereich: 20Hz-100kHz mit 100 Frequenzmesspunkten (FMP) Zellkulturkammern_5 bis _8 zeigten keine Ergebnisse.

Zellkulturkammer	Index i; Bezugszeitpunkt	$(Z(\omega, t > i) - Z_i(\omega, t = i))_{\max}$			$(Z(\omega, t > i) / Z_i(\omega, t = i))_{\max}$			Besonderheit
		$ Z - Z_i $ [Ω]	Frequenz z [Hz]	Zeit nach Aussaat [h]	$ Z / Z_i $ [*100 in%]	Frequenz [Hz]	Zeit nach Aussaat [h]	
_1	1. IS Messung (i-1)*2+24= [h] nach Aussaat	366	20	158	24,8	56	138	nicht bekannt/ Sprungstelle zwischen dem FMP bei 86Hz und dem bei 94Hz; Knick und lokales Maximum $ Z(\omega=314\text{Hz}, t=158\text{h}) / Z_i(\omega=314\text{Hz}) $ =8,56
_2	1. IS Messung	1645	102	206	-	-	-	nicht bekannt/ Sprungstelle zwischen dem Frequenzmesspunkt (FMP) bei 94Hz und dem bei 102Hz
	2. IS Messung	-	-	-	8	1140	206	
	5. IS Messung	1714	102	206	7,64	5367	206	
_3	1. IS Messung	1380	103	188	2,98	1243	188	nicht bekannt/ FMP <100Hz viele „vereinzelte irreguläre Messpunkte“; zwischen 94Hz und 103Hz ist eine „Sprungstelle“
_4	1. IS Messung	784	20	202	22,54	103	202	nicht bekannt/ „Sprungstelle“ zwischen dem FMP bei 94Hz und dem bei 103Hz. Bei etwa 4kHz trat eine „Singularität“ auf.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der globalen Maximalwerte von $|Z| - |Z_i|$ und $|Z|/|Z_i|$ (Zellkulturkammern _1 bis _4 der 4. Bioimpedanzmessung)

In Tabelle 17 werden in der ersten Spalte (ganz links) die Zellkulturkammern (dem System in Abb. 40 folgend) angegeben. In der zweiten Spalte wird der Bezugszeitpunkt (Index i) bezüglich dessen der *Quotient* und die *Differenz* gebildet und dargestellt wurden angegeben, da sich die globalen Maxima der *Differenz* und des *Quotienten* in den weiter rechts folgenden Spalten mit dem Verschieben des Bezugszeitpunktes auch ändern. In Tabelle 17 wurden Werte, die der bisherigen Erfahrung nach auffällig vom (unbeschriebenen) Regel-Normalfall abweichen **gelb** markiert und ein eventueller Grund mit **rotem** Hintergrund dargestellt. In der Spalte in Tabelle 17 die mit $(|Z(\omega, t)| - |Z_i(\omega)|)_{\max}$ betitelt ist, werden die globalen Maxima der *Differenz* angegeben. Dabei wird der Werte des globalen Maximums und der Zeitpunkt nach Aussaat der Zellen, sowie die Frequenz, bei der das globale Maximum festgestellt worden ist, angegeben. Gleiches gilt für die Spalte ($|$

$Z(\omega, t > i) / |Z_i(\omega, t = i)|_{\max}$ durch Darstellen des Quotienten. In der Spalte mit dem Titel „Besonderheit“ wird die Zellbedeckung und das Auflösungsvermögen beschrieben, wobei das Auflösungsvermögen in Kapitel 4.1.4.1 definiert wurde.

Zusammenfassung bisheriger Bioimpedanzmessergebnisse:

Hier werden nur die Ergebnisse diskutiert, die in den vorigen Tabellen als Zuverlässig erachtet wurden und nicht rot oder gelb markiert wurden.

Die globalen Maxima $(|Z(\omega, t > i) / |Z_i(\omega, t = i)|)_{\max}$ bzw. $(|Z(\omega, t > i) - |Z_i(\omega, t = i)|)_{\max}$ in der 4. und 5. Bioimpedanzmessung wurden meist zwischen 56Hz und 210Hz (*Quotient*) bzw. 14Hz und 104Hz (*Differenz*) gefunden. In diesem Frequenzbereich wurden, in Zellkulturkammern, in denen am Ende der Bioimpedanzmessung der Zelllayer als konfluent festgestellt wurde, maximal Werte zwischen $48 > |Z| / |Z_i| > 3,46$ bzw. $560 > |Z| - |Z_i| > 426$ erreicht.

Zeitliche Änderungen im Impedanzspektrum ($|Z| / |Z_i|$ und $|Z| - |Z_i|$) wurden meist ab etwa 100h nach Zellaussaat signifikant (d.h.: $|Z| / |Z_i| > 2$, bzw. $|Z| - |Z_i| > 100$). Ab der 50.h bis zur 180.h nach Aussaat, zeigte der Frequenzbereich von etwa 10Hz-3kHz den stärksten Anstieg der $|Z| / |Z_i|$ und $|Z| - |Z_i|$ -Werte. Ab etwa der 180.h nach Aussaat flachten die zeitlichen Änderungen der Impedanz etwas ab, stiegen aber meist weiter an, und erreichten die globalen Maxima meist erst am Ende der Bioimpedanzmessung.

In der 5. Bioimpedanzmessung sind entlang der gesamten Messdauer in den Zellkulturkammern _5 und _8 über dem 30.FMP (=30Hz) keine „Sprünge“ und „irreguläre Messpunkte bei 1kHz“ (jedoch „vereinzelte irreguläre Messpunkte“) festgestellt worden. Dort traten die Änderungen von $|Z| / |Z_i|$ beinahe symmetrisch um den 50.FMP (=300Hz) bezüglich der logarithmisch skalierten Frequenzachse auf (vgl. tabellarische Zusammenfassung der 5. Bioimpedanzmessung in $|Z| / |Z_i|$ -Kontur-Plots; Tabelle 15). Dort wurde das globale Maximum

$(|Z(\omega, t > 1) / |Z_1(\omega, t = 1)|)_{\max} = 5,2$ bei 210 Hz bzw. $(|Z(\omega, t > 1) - |Z_1(\omega, t = 1)|)_{\max} = 3,46$ bei 210Hz festgestellt. 210Hz ist gegenüber anderen Messungen im Mittel zu höheren Frequenzen verschoben. Da ein ähnliches globales Maximum $(|Z(\omega, t > 1) / |Z_1(\omega, t = 1)|)_{\max} = 6,8$ bei 319Hz (148h nach Aussaat) in der 3. Bioimpedanzmessung in Zellkulturkammer _4 gefunden wurde, und diese Messung bis auf eine Sprungstelle bei 75Hz keine weiteren „Sprungstellen“ oder „irreguläre Messpunkte bei 1kHz“ und einen kontinuierlich glatten Kurvenverlauf zeigen, wurden die Messergebnisse dieser Messungen als besonders bedeutend gewertet.

Die bisherigen Ergebnisse der Bioimpedanzmessungen (3., 4., und 5.) zusammengefasst betrachtet, kann es als gegeben erachtet werden, dass ein ansteigender Wert der transepithelialer Impedanz auf eine Zunahme der Zellbedeckung der Chipoberfläche hinweist. Impedanzen im Frequenzbereich zwischen 30Hz (auflösungsbedingt) und 4kHz reagieren dabei am stärksten auf die Zunahme der Zellbedeckung. Da die transepithelialen Impedanzen mit der Zeit nach Aussaat bis zum Ende der Bioimpedanzmessungen (Dauer bisher bis maximal 258h nach Aussaat; 5. Bioimpedanzmessung) meist monoton angestiegen sind, kann davon ausgegangen werden, dass, bei einer längeren Dauer der Impedanzmessung, die transepitheliale

Impedanz mit der Zeit noch weiter angestiegen wäre. Aus dem Vergleich der zeitlichen Veränderungen in transepithelialen Impedanzspektra, die mit verschiedenen Chiptypen durchgeführt wurden, lässt sich schließen, dass die Elektroden des „Chips mit den ringförmigen Elektroden“ schneller vollständig bedeckt werden, als das beim IDEs-Chip der Fall ist. Denn die signifikante Marke $|Z|/|Z_i| > 2$ wurde beim Chip mit dem ringförmigen Elektroden meist nach 90h und beim IDEs-Chip meist erst nach 110h erreicht, wobei die apriori-Impedanz (vgl. Abb.53 und 54; IS-Messung eines Elektrolyten) beider Chiptypen in der gleichen Größenordnung liegt. Zum Vergleich: Die signifikante Marke $|Z|/|Z_i| > 100$ wurde beim „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ (3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; vgl. Abbildung im Anhang) 54h nach Zellaussaat (bei 104Hz) festgestellt und beim IDEs-Chip erst nach 114h nach Zellaussaat (bei 104 Hz).

4.3.3.4 Sechste Bioimpedanzmessung: Einsatz von Permeation Enhancer (PE)

Die 6. Bioimpedanzmessung, war, nachdem eine eindeutige Korrelation zwischen Konfluenz des Caco-2-Zellgewebes und der impedanzspektroskopischen Messung, aufgrund der des Auftretens von Messfehlern noch zweifelhaft war, Ausgangspunkt eines biochemischen Experiments.

In einem Auswahlverfahren (vgl. Kap.3.7 mit Tab. 18) wurde Bromelain aus vier verschiedenen als geeignetster Permeation Enhancer (PE) ermittelt. Permeation Enhancer (vgl. Kap.1.7) sind chemische Substanzen, die dem parazellulären Ionenstrom durch Öffnen der Tight Junctions die interzelluläre Barriere nehmen. Bromelain ist ein PE, der enzymatisch wirkt. Wird Bromelain (das gilt auch für andere PE), einem Epithelgewebe zugeführt, können sich Ionen über den parazellulären Transportweg leichter hinwegbewegen und die transepitheliale Impedanz, besonders bei niederen Frequenzen, wo Ladungsflüsse frei beweglicher Ladungsträger detektiert werden, sinkt. Die Wahl fiel auch deshalb auf Bromelain, weil angenommen wurde, dass bei Bromelain, im Gegensatz zu anderen PE, das Caco-2-Zellgewebe sich nicht irreversibel vom Untergrund, i.e. der Chipoberfläche, ablöst und nach kurzer Zeit in Abwesenheit von Bromelain, die Tight Junctions die parazellulären Spalte wieder schließen und das Impedanzspektrum wieder Werte wie vor der Bromelain-Behandlung annehmen kann.

Art des PE	PE-Konzentration im RPMI-Medium	Abweichungen im Impedanzspektrum (vgl. Gl.1-4)	Handhabbarkeit
Bromelain	Auf 4,5ml RPMI kommen 0,5ml Bromelain (5mg/ml - Konzentration des „reinen“ PE 5mg/ml)	y=3,2 (Standardabweichung: 2,8) x=14260 (Standardabweichung: 13466)	Aufgrund der enzymatischen Wirkungsweise werden Probleme beim Auswaschen befürchtet.
DOC (11-Deoxycorticosteron)	Auf 4,5ml RPMI kommen 0,5ml DOC (0,8 [Masse%] -Konzentration des „reinen“ PE)	y=8,78 (Standardabweichung: 4,65) x=27988 (Standardabweichung: 22289)	Lässt sich gut mit RPMI-Medium vermengen und aus den Wells auswaschen.
Chilosan	Chilosan (3 Vol.% -Konzentration des „reinen“ PE)	-	Sehr zähflüssig; in ph-neutralen Lösungsmitteln schwer löslich.
Na-Carpat	Auf 4,5ml RPMI kommen 0,5ml Na-Carpat (200mM -Konzentration des „reinen“ PE)	y=24,45 (Standardabweichung: 48,31) x=207265 (Standardabweichung: 371397)	Lässt sich gut mit RPMI-Medium vermengen und aus den Wells auswaschen.

Tabelle 18: Permeation Enhancer im Testvergleich.

260h nach Zellaussaat, wurde Bromelain der RPMI-Nährlösung beigemischt. Dieser „Mediumswechsel“ wurde so arrangiert, dass „das Messmodul“ dabei geschlossen blieb und die Elektrodenpositionen somit nicht verändert wurden. Eine Stunde nach Zufügen von Bromelain zur RPMI-Nährlösung, war im Impedanzspektrum ein Abfall der transepithelialen Impedanz sichtbar. Das Bromelain-RPMI-Nährlösungsgemisch wurde anschließend mit reinem RPMI-Medium gründlich ausgewaschen und damit wieder ersetzt. In Abwesenheit von Bromelain können sich die Tight Junctions wieder neu ausbilden. Um diese Auswirkungen auf die Impedanz in Erfahrung zu bringen, wurde die Messung noch etwa 4,5 Tage fortgesetzt.

4.3.3.5 Ergebnisse der 6. Bioimpedanzmessung; Auswertung des PE-Versuchs

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von Zellkulturkammer_1 der 6. Bioimpedanzmessung vorgestellt.

Kurz, in Stichworten, zur Messung selbst: Verwendung von IDES-Elektroden; Gesamtdauer: bis 260h nach Aussaat +54h nach PE (Bromelain) -Behandlung =118 (im 2h Abstand) + 54 (im 1h Abstand) =172 IS-Messungen in der Messserie; Frequenzbereich: 1Hz-100kHz mit 100 Frequenzmesspunkten (vgl. auch Kap.4.2.1; Übersicht über die Messparameter)

Abbildung 94 zeigt das relative ($|Z|/|Z_{21}|$) Bioimpedanzspektrum der 6. Bioimpedanzmessung von Zellkulturkammer_1. Die Darstellung in Abbildungen 94 und 95 beginnt 62h nach Zellaussaat, da die Impedanzmesswerte zwischen dem 60. und 70. FMP bis zur 21. IS-Messung der Messserie (62h nach Zellaussaat) Null sind (vgl. Abb.99). Der in Abbildung 94 und 95 auf der vertikalen Achse auftragende Quotient $|Z|/|Z_i|$ wurde deshalb bezüglich dieser (i=21) IS-Messung der Messserie gebildet.

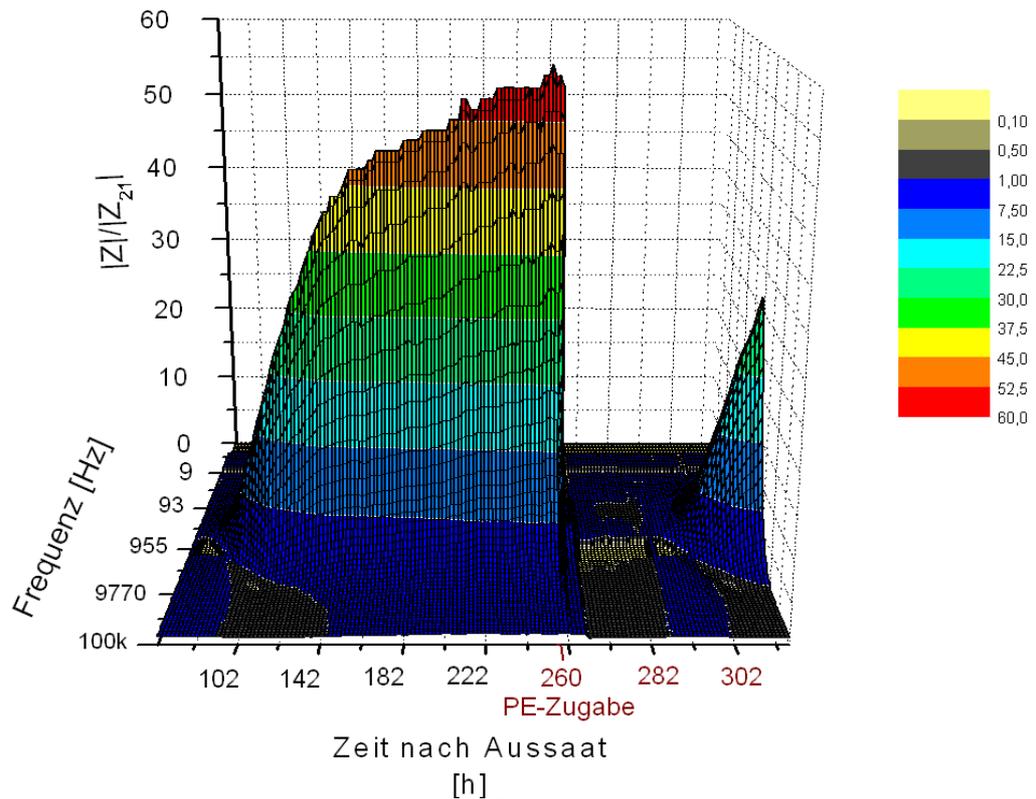


Abbildung 94: 6. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_1; zeitliche Änderung des Impedanzspektrums ($|Z|/|Z_{21}|$; bezüglich der 21. impedanzspektroskopischen Messung ; 62h nach Aussaat) gegenüber der Frequenz und der Zeit nach Aussaat.

Bis zum Zeitpunkt der Bromelain Zugabe (260h nach Zellaussaat) stieg die transepitheliale Impedanz in Abbildung 94 und 95 monoton, über ein Spektrum von Frequenzen, an. Mit der Zugabe von Bromelain, 260h nach Zellaussaat, fällt die Impedanz ruckartig auf ihren (zwischen 60. und 70 FMP „singulären“) Anfangswert zurück. Nach 40h Abwesenheit von Bromelain steigt die transepitheliale Impedanz wieder monoton bis zum Ende der Messserie (314h nach Zellaussaat) an.

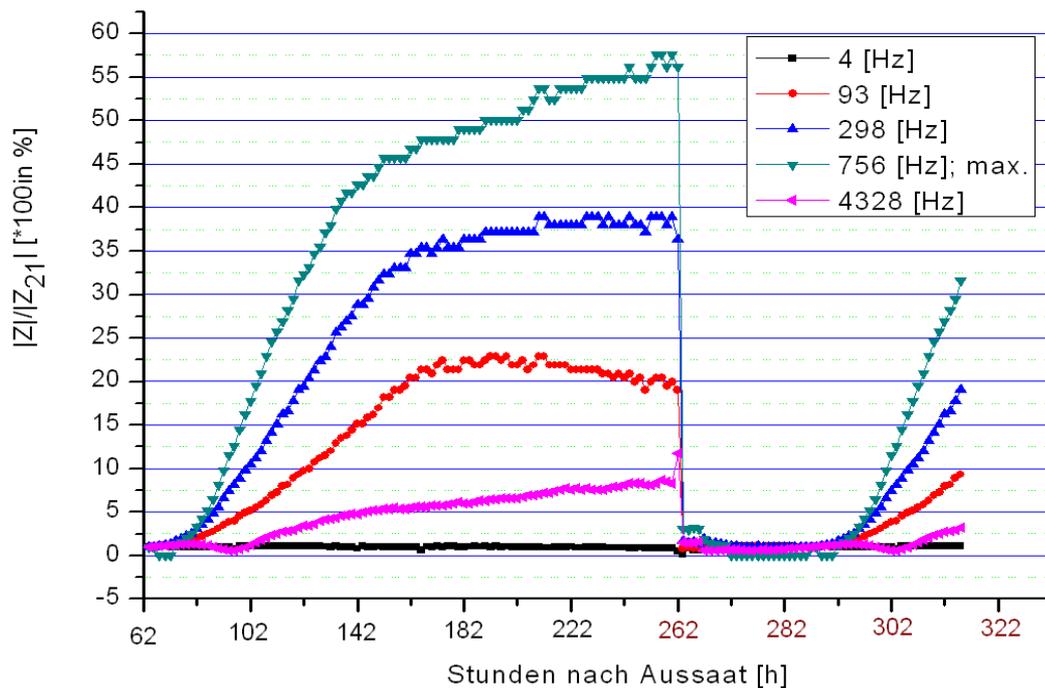


Abbildung 95: 6. Bioimpedanzmessung; Zellkulturkammer_1; Verlauf der relativen Impedanz ($|Z||Z_{21}|$) ab der 62. Stunde nach Zellaussaat für ausgesuchte Frequenzen;. Das ist die 21. impedanzspektroskopischen Messung.

In Abbildung 96 wurde der Quotient $|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=260\text{h})|/|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=0)|$ aus einer IS-Messung mit frischer RPMI-Nährlösung und einer teils verbrauchten RPMI-Lösung, die 260h nach Aussaat entnommen wurde (noch bevor Bromelain Zugefügt wurde), gegenüber der Frequenz dargestellt. Es sind die Messergebnisse für die IS-Messungen in (allen) 8 Zellkulturkammern abgebildet werden. Es zeigten sich nur geringe Änderungen der Impedanz von $(|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=260\text{h})|/|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=0)|)_{\text{max.}} < 1,2$.

Ein ähnlicher Quotient $|Z_{\text{RPMI+evt.Spuren von Bromelain}}(t=314\text{h})|/|Z_{\text{RPMI}}(t=0)|$ wurde zwischen RPMI-Lösung, welche 314h nach Zellaussaat, also ganz am Ende der Messserie aus dem RPMI-Reservoir des Fluidik-Systems entnommen wurde und frischer RPMI-Lösung gebildet (siehe Abb.97). In Abbildung 97 zeigen sich maximale Änderungen von $(|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=314\text{h})|/|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=0)|)_{\text{max.}} < 1,2$.

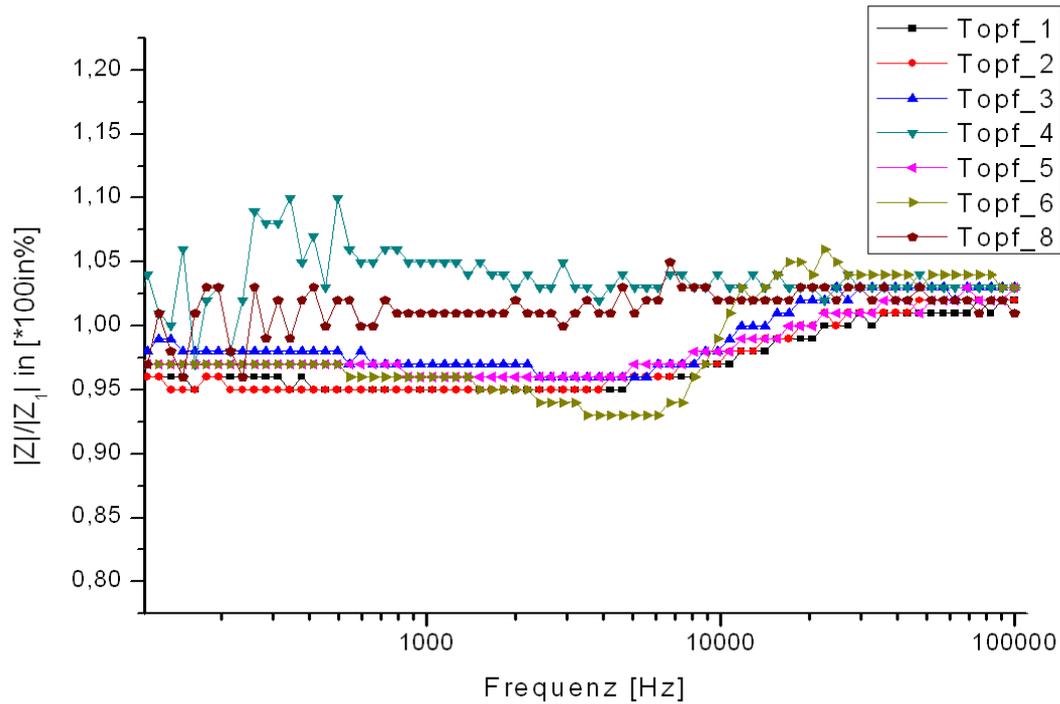


Abbildung 96: 6. Bioimpedanzmessung; Relative Änderungen der Impedanz $|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=260)|/|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=0)|$ zwischen frischer RPMI-Nährlösung zur Stunde =0 und der bereits „teils-verbrauchten“ 260h nach Aussaat, (noch bevor Bromelain zugeführt wurde). Ein Topf bezeichnet eine Zellkulturkammer.

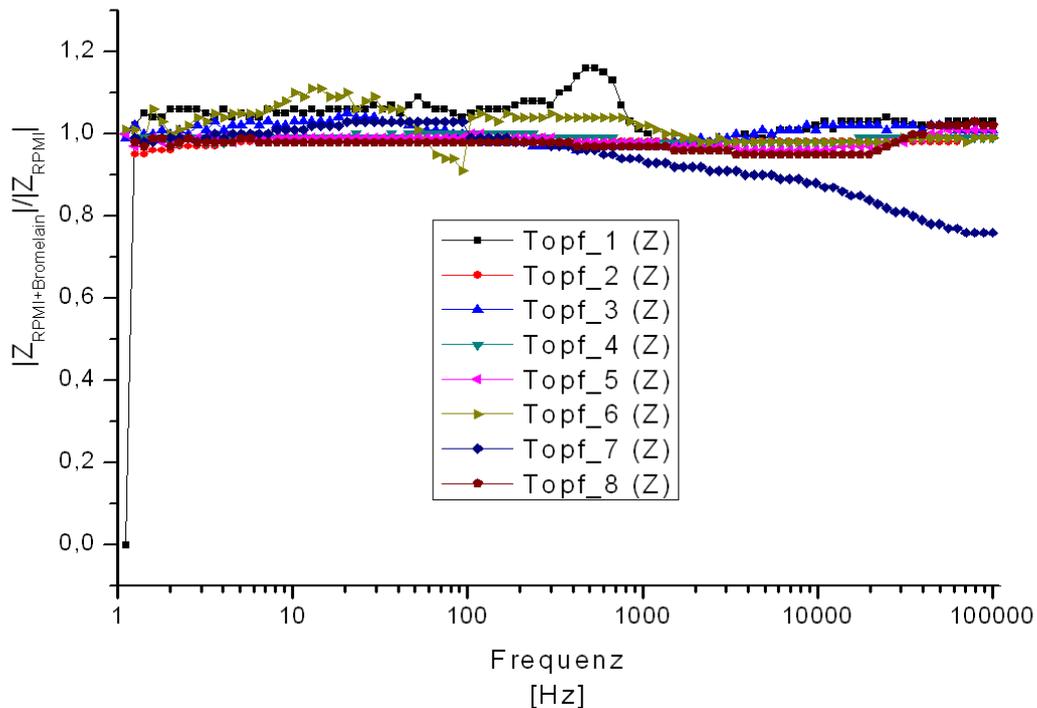


Abbildung 97: Relative Änderungen der Impedanz $(|Z_{\text{RPMI}}(\omega)|/|Z_{\text{RPMI+Bromelain}}(\omega)|)$ zwischen frischer RPMI-Nährlösung und RPMI-Lösung mit Bromelain. Ein Topf bezeichnet eine Zellkulturkammer.

Abbildung 98 zeigt die Änderung des Impedanzspektrums durch Zugabe von Bromelain zur RPMI-Lösung gegenüber der reinen RPMI-Lösung. Hier ist die Änderungen des Quotienten $(|Z_{\text{RPMI}}(\omega) / |Z_{\text{RPMI+Bromelain}}(\omega)|)_{\text{max}} < 1,2$.

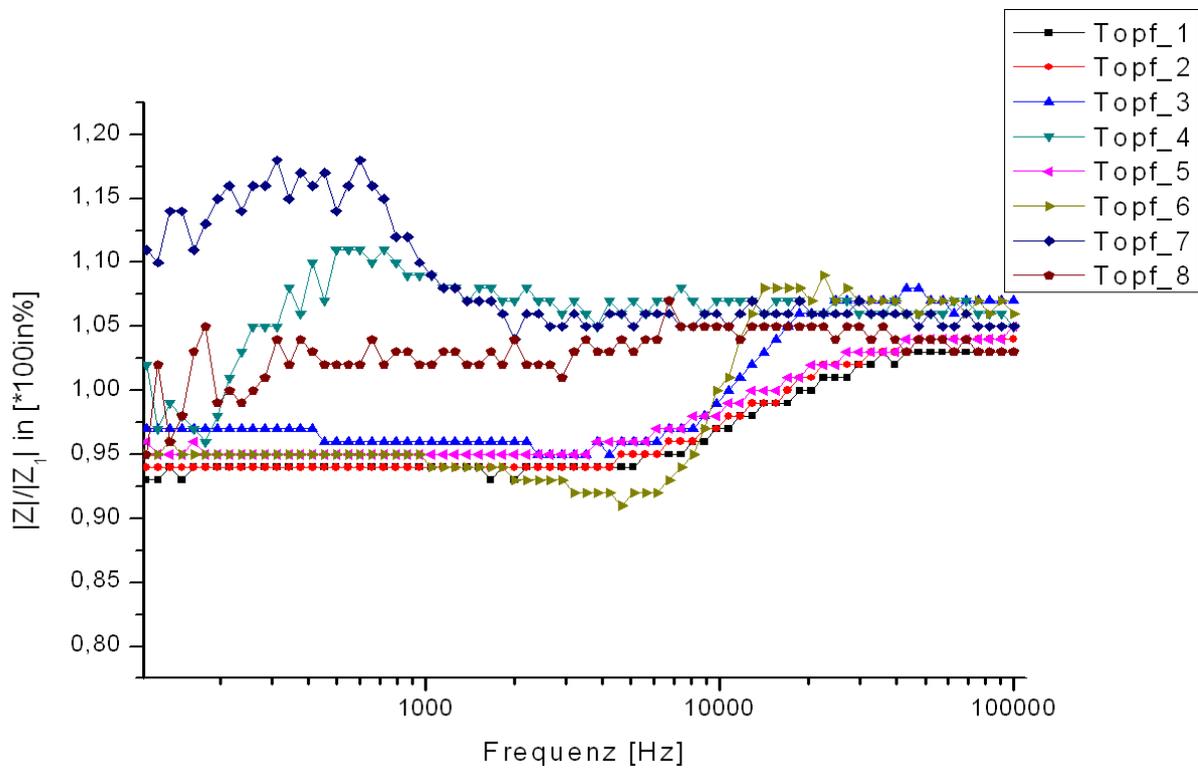


Abbildung 98: 6. Bioimpedanzmessung; Relative Änderungen der Impedanz $|Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=314) / |Z_{\text{RPMI}}(\omega, t=0)|$ zwischen frischer RPMI-Nährlösung zur Stunde=0 und der bereits „teils-verbrauchten“ RPMI-Lösung mit noch möglichen Spuren von Bromelain 314h nach Aussaat, (nach der Bromelain Kur, 260h nach Aussaat)

Somit wurde angenommen, dass die Änderungen der Impedanz, die durch den Verbrauch des RPMI-Mediums und durch Zugabe von Bromelain zum RPMI-Medium verursacht wird, vergleichsweise gering sind. Im Gegensatz dazu ist der vermessene Anstieg der transepithelialen Impedanz in Zellkulturkammer_1 der 6. Bioimpedanzmessung $(|Z_{\text{cell}}(\omega=756\text{Hz}, t=258\text{h}) / |Z_{\text{noCekk}}(\omega, t=62\text{h}(i=21))|)_{\text{max}} = 57,6$ (siehe Abb.94 und Abb.95) signifikant.

Wenn die (enzymatische) Wirkung von Bromelain auf die Tight Junctions zum Abfall der Impedanz in Zellkulturkammer_1 führte, kann umgekehrt behauptet werden, dass die Caco-2-Gewebeverdichtung vorerst zum Anstieg der Impedanz geführt hatte! Präziser ausgedrückt heißt das, dass die vermessenen Impedanzänderungen die nicht direkt auf die Morphologie des Gewebes zurückzuführen sind (vgl. Abb.96, 97 und 98), vergleichsweise gering sind, kann die detektierte Impedanzänderung während einer Bioimpedanzmessung auf eine Zunahme der Konfluenz der Caco-2-Gewebebeschicht auf den Bottom-Elektroden zurückgeführt werden. In dem Moment in dem sich die „Tight Junctions“ öffnen fällt in die Impedanz erheblich ab. Der Abfall der Impedanz bei Zugabe von Bromelain zu einem Caco-2-Gewebe kann

somit als durch den Anstieg des parazellulären Ionenstroms verursacht, verstanden werden.

In Abbildung 99 ist ein „original“ $\log(|Z|)$ Bioimpedanzspektrum, mit auf die Grundfläche projiziertem Konturplot, abgebildet. Die Frequenzachse in Abbildung 99 trägt Frequenzmesspunkten (FMP) auf, wobei (für die 6. Bioimpedanzmessung) folgende Umrechnungsformel zwischen Frequenz in [Hz] und FMP gilt:

$$\text{Frequenz [Hz]} = \exp((\ln 10^5)/100 * \text{FMP})$$

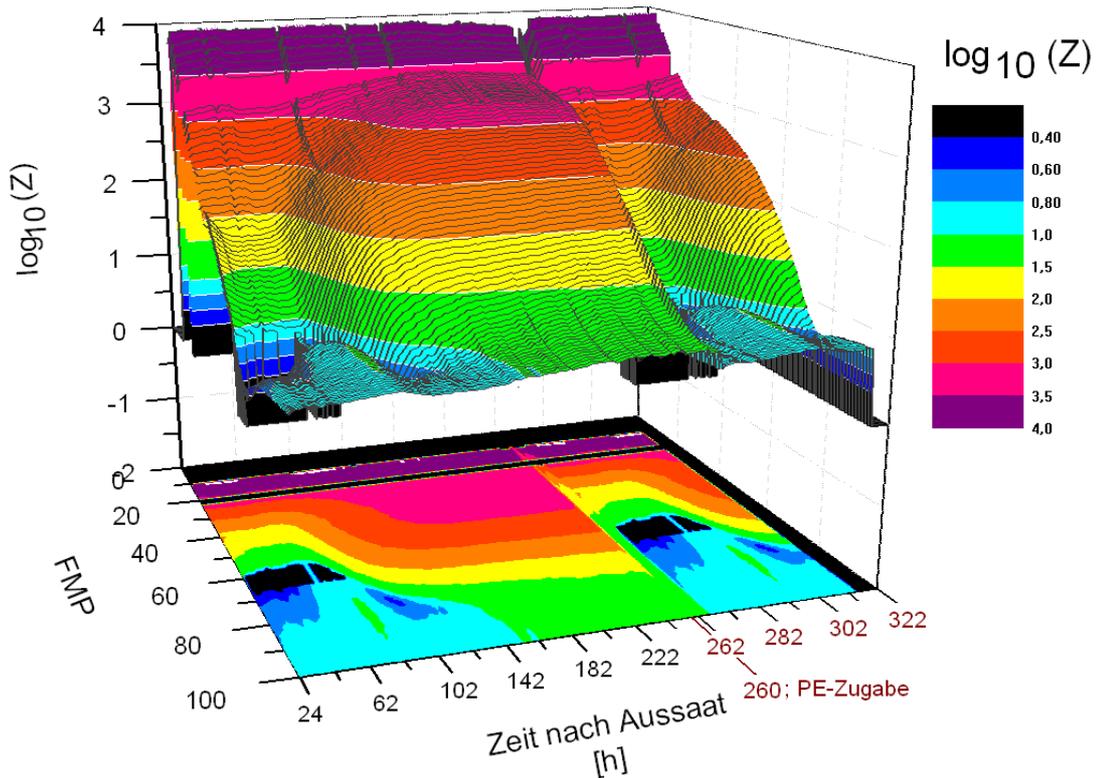


Abbildung 99: 6. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; $\log Z$ gegenüber der Zeit nach Zellaussaat und der Frequenz.

Anhand Abbildung 99 ist die Begründung einsehbar, weshalb in den Abbildungen 94 und 95 erst ab der 62h nach Zellaussaat (das ist die 21. IS-Messung der Messserie) der Quotient $|Z|/|Z_{21}|$ gebildet wurde. Der Grund dafür ist, dass die Impedanzmesswerte zwischen dem 60. und dem 70. FMP anfangs (bis zur 62h nach Aussaat) =0 (in schwarzer Farbe) sind.

5. Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Durchführung von transepithelialer Impedanzspektroskopie (IS) in 4-Punkt-Messtechnik mit mikrostrukturierten Elektroden an sich vermehrenden Caco-2-Zellkulturen. Ein zum Ziel führender Aufbau wurde konstruiert und getestet. Dabei knüpft die vorliegende Arbeit an die Arbeiten von M. Fischender [2] und M. Hufnagel [1] an, deren Aufbau übernommen und erweitert wurde. Davon ausgehend konnten in dieser Arbeit, mit dem Anwenden der 4-Punkt-Messtechnik transepitheliale Impedanzen bis zu niedrigen Frequenzen von 10Hz festgestellt werden. Jedoch wird die Messung im unteren Frequenzbereich (10Hz-100Hz) oft von Artefakten im Messsystem gestört. Die Elektrodenpolarisation verhindert dabei den Ladungsaustausch an der Sensorelektrode und damit die Aufnahme von Impedanzmesswerten (vgl. Kap.4.1.4). Das Messen von Impedanzen von biologischem Material bei niedrigen Frequenzen <kHz ist ein gängiges Problem [11], wobei die Wirkung der Elektrodenpolarisation durch die Anwendung der 4-Punkt-Methode vermindert [2] werden kann. Der Messaufbau wurde durch ein Kanalsystem und eine Pumpe (Fluidik-System) erweitert, sodass die Caco-2-Zellkulturen kontinuierlich mit Nährstoffen versorgt werden konnten (vgl. Kap.2.3). Da in den Arbeiten von M. Hufnagel [1] und M. Fischender [2] mit dem RPMI-Nährmediumwechsel ein Abfall im Impedanzspektrum korrelierte, der seit Verwenden des Fluidik-Systems nicht mehr auftrat, wurde geschlossen, dass ein Verletzen des bereits gewachsenen Zellgewebes beim Nährmediumwechsel mit der Pipette die wahrscheinlichste Ursache für diesen Abfall war.

Der entstandene Aufbau stellt 8 unabhängige mit Elektroden ausgestattete Zellkulturkammern bereit (vgl. Kap.2.2), in denen Caco-2-Zellen kultiviert und gleichzeitig transepitheliale impedanzspektroskopische 4-Punkt-Messungen durchgeführt werden können. Der Messaufbau wurde als biokompatibel bewertet und es konnte eine gute Zelladhäsion auf der Chipoberfläche beobachtet werden (vgl. Kap. 4.2). Insgesamt wurden 6 Bioimpedanzmessungen durchgeführt, die die zeitliche Entwicklung des transepithelialen Impedanzspektrums von einer vereinzelt Caco-2-Zellen bedeckten bis, über die Zellvermehrung, zu einer von einem konfluenten Caco-2-Zellmonolayer bedeckten Chipoberfläche dokumentieren (vgl. Kap.4.2). Diesen Bioimpedanzspektren wurden mikroskopische Aufnahmen gegenübergestellt, die die Zellbedeckung auf den jeweiligen Chipelektroden zeigen.

Die 3. Bioimpedanzmessung (vgl. Kap.4.2.3) wurde mit dem „Chip mit ringförmigen-Platin-Elektroden“ durchgeführt. Es wurden 50-95h nach Zellaussaat signifikante ($|Z|/|Z_i| < 2$ oder $|Z| - |Z_i| > 100$; im Rahmen dieser Arbeit definierte Maße) Anstiege der Impedanz festgestellt. Die $|Z|/|Z_i|$ -Werte erreichten bei Frequenzen zwischen 104Hz und 319Hz und gegen Ende der Bioimpedanzmessung (188h nach Aussaat) ihr Maximum. Die Impedanzspektren einer entlang der Bioimpedanzmessung spärlich mit Caco-2-Zellen bedeckten und eine mit zunehmend konfluenter werdenden Zellgewebe bedeckten Chipoberfläche wurden gegenübergestellt. Dabei wurde bei 319Hz und 170h nach Zellaussaat ein Wert von $|Z|/|Z_1|_{\text{Gewebe}} - |Z|/|Z_1|_{\text{kein Gewebe}} = 5,8$ (das entspricht einer 580%igen Impedanzänderung aufgrund unterschiedlicher Zellbedeckung) festgestellt.

Die Bioimpedanzmessung, die mit dem Chip mit IDES-Elektroden durchgeführt wurden, zeigen die signifikanten ($|Z|/|Z_i| < 2$ oder $|Z| - |Z_i| > 100$) Impedanzänderungen ab etwa 110h nach Zellaussaat. Die Maxima von $|Z|/|Z_i|$ wurden bei Messfrequenzen zwischen 103Hz und 210Hz und am Ende der Bioimpedanzmessung festgestellt. Es wurde so unter anderem daraus geschlossen, dass die von Gewebe zu bedeckende Chipoberfläche beim dem Chip mit IDES-Elektroden größer ist, als die beim „Chip mit den ringförmigen Elektroden“ um das Signifikanz-Plateau $|Z|/|Z_i| < 2$ oder $|Z| - |Z_i| > 100$ zu erreichen.

Abschließend wurde der Permeation Enhancer „Bromelain“ einem konfluenten Caco-2-Zellgewebe zugeführt und die Reaktion im Impedanzspektrum beobachtet. Der Einsatz von Permeation Enhancern unterstrich die Validität der Messergebnisse, da er zeigte, dass die vermessenen zeitlichen Änderungen im transepithelialen Impedanzspektrum auf morphologische Veränderungen des Caco-2-Zellgewebe zurückgeführt werden können (vgl. Kap.4.3.3.5). So fiel, mit dem Beimischen von Bromelain zur Nährstoffzufuhr, die transepitheliale Impedanz bei 756Hz ruckartig von $|Z|/|Z_{21}| = 55$ auf ihren Anfangswert ($|Z|/|Z_{21}| < 2$), auf den Wert einer mit vereinzelt Zellen bedeckten Chipoberfläche, ab. Es wurden die alleinigen Auswirkungen durch den Verbrauch des Nährmediums und durch das Beimischen von Bromelain vermessen, wobei deren Änderungen $|Z|/|Z_{21}| < 1,2$ waren. Somit zeigt dieser Versuch letztlich auch, dass wenn spezifische Arzneien einem Caco-2-Zelllayer auf der Chipoberfläche zugeführt werden, signifikante Auswirkungen im Impedanzspektrum gemessen werden können.

Um die Arzneimittelresorption anhand von Modellen aus Widerständen und Kapazitäten (sog. Äquivalentschaltbilder) zu studieren, sind eine Vielzahl an Messungen notwendig [31]. Anhand dieser Modelle kann auch auf die Größe und die morphologische Form der Zellen geschlossen werden, die mit Hilfe der Impedanzspektroskopie vermessen werden können [32]. Die Durchlässigkeit der Tight Junctions (TJ) und die damit zusammenhängende Polarität des Epithelgewebes, die mit Permeation Enhancer beeinflusst werden kann [26], bestimmt nicht nur den transepithelialen Widerstand, sondern gibt auch Auskunft über die Integrität des Gewebes. Dabei kann die Integrität (Konfluenz) des Gewebes aus dem transepithelialen Widerstand ermittelt werden [33]. Die Zelllayer-Integrität und somit die parazelluläre Durchlässigkeit sind kritische Parameter, die bei pharmazeutischen Transportstudien kontrolliert werden müssen. Die Gewebeimpedanz wird dabei hauptsächlich über den parazellulären und weniger über den zellulären Widerstand bestimmt [34]. Dabei reicht es nicht aus, den TEER-Wert zu messen, um die parazelluläre Durchlässigkeit zu bestimmen [35], die ja in Äquivalentschaltmodellen in erster Näherung als rein ohmsche Widerstände dargestellt werden [24]. Die Impedanzspektroskopie mit gleichzeitigem Einsatz von Permeation Enhancern kann hier Problemlösungen anbieten, indem der parazelluläre Transportweg stimuliert wird und von den resultierenden Veränderungen im Impedanzspektrum auf das morphologische und biochemische Verhalten (und umgekehrt) geschlossen werden kann [22]. Diese Untersuchungen leisten Basisarbeit für das Modellieren von Epithelgewebe anhand von Computermodellen. Die Modellparameter dieser Computersimulationen müssen dabei aus verschiedenen experimentellen Ergebnissen bestimmt werden, um die Voraussagen im Medikamententransport zu verbessern [36]. Ein weiterhin gängiges Problem

beim Messen von Gewebeimpedanzen ist die Elektrode-Elektrolyt Phasengrenze. Um die makroskopischen physikalischen Prozesse, von beispielsweise einer blanken Platinoblerfläche, für den Anwendungsbereich der Messung von Gewebeimpedanzen zu optimieren, werden auch Computermodelle herangezogen. Damit können komplexe biomedizinische Situationen, wie das Anhaften von Proteinen auf einer Elektrodenoberfläche, simuliert werden [37]. Besonders kritisch ist der Ladungsaustausch an der Phasengrenze Elektrode-Elektrolyt im niederen ($<100\text{Hz}$) Frequenzbereich. Hier tritt die Alpha-Dispersion auf, deren Mechanismen noch schlecht verstanden werden und die sich oft nicht klar von der Beta-Dispersion abgrenzen lässt. Mit 4-Punkt-Impedanzmessungen können diese Mechanismen möglicherweise entkoppelt und verstanden werden [38].

In einer zukünftigen Arbeit könnte es von Vorteil sein,

- i. die Elektrodenpolarisation weiter zu erniedrigen; dies kann z.B. durch spezielle Behandlung/Beschichtung der Elektrodenoberflächen ([9], [14] [38]) geschehen.
- ii. die Elektroden kreisförmig mit einem Durchmesser von $\sim 200\mu\text{m}$ zu wählen, da so die größten Veränderungen im Impedanzspektrum zwischen einer mit Caco-2-Zellen bedeckten und einer unbedeckten Elektrodenoberfläche detektiert werden [25].
- iii. die IS-Untersuchung auf niedrigere Frequenzen ($<10\text{Hz}$) weiter auszuweiten., da einerseits in dieser Arbeit dort die größten Änderungen von $|Z|-|Z_1|$ detektiert wurden und in dieser Frequenzbereich auch hinsichtlich der Aufklärung der Alpha-Dispersion und bei der Feststellung der Integrität des Zellgewebes von Bedeutung ist.
- iv. den Bedeckungsgrad der Chip-Elektroden mit Caco-2-Zellgewebe kontinuierlich über den Versuchszeitraum mikroskopisch zu bestimmen, um von morphologischen Charakteristika des Gewebeaufbaus direkt auf das elektrische Messergebnis und umgekehrt schließen zu können.
- v. die (DC-) Membranspannung zwischen apikaler und basolateraler Gewebeseite zu messen; das würde die Untersuchung und möglicherweise die Feststellung der Konfluenz mit einem zusätzlichen Parameter erweitern (vgl. Kap 1.6).
- vi. den Aufbau der 4-Punkt-Messung, ähnlich der einer „Ussing Chamber“ zu gestalten, sodass die Signalelektroden die Messelektroden gleichmäßig polarisieren.
- vii. die Zugabe der Bromelain-Konzentration geringer und zu wählen [22], um verschiedene Transportmechanismen durch das Gewebe zu entkoppeln und zu bewerten.

6. Anhang

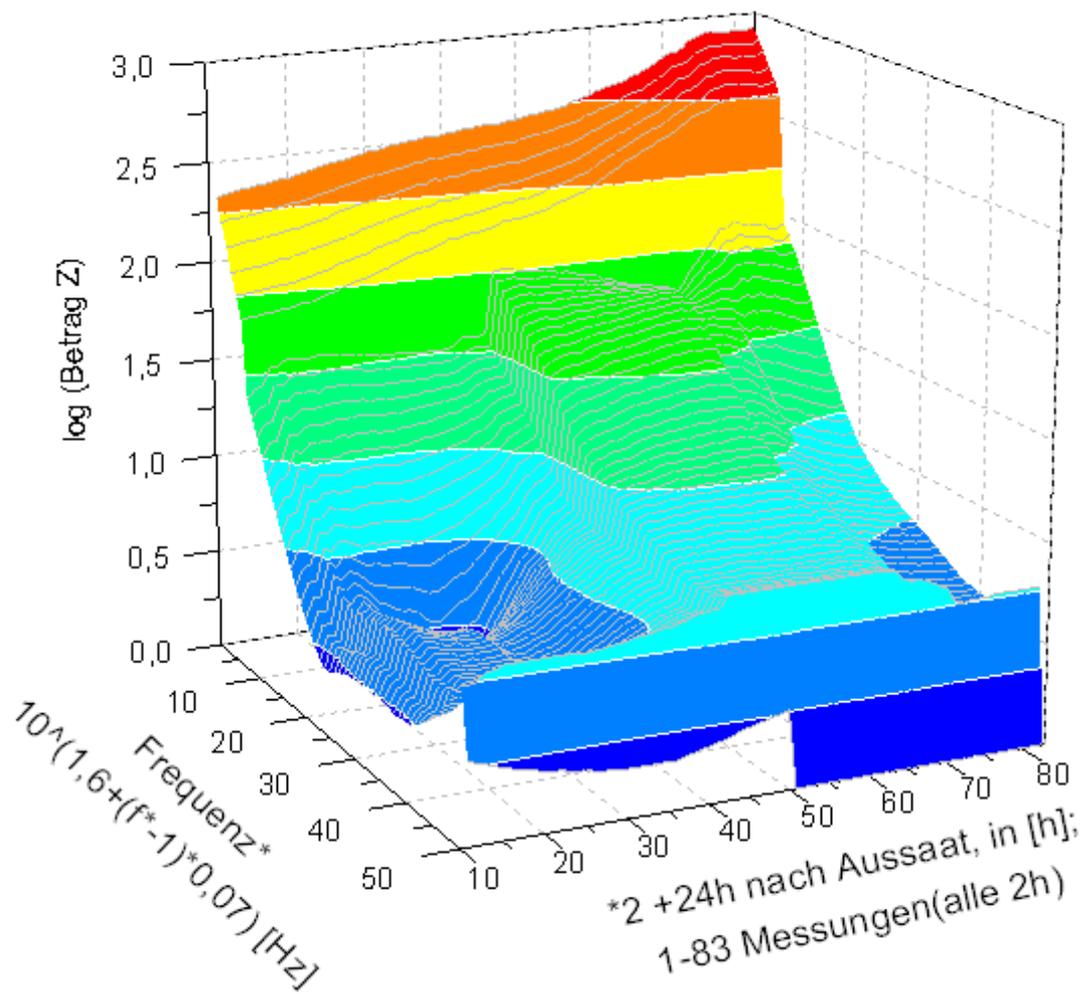


Abbildung 100: 3. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_2; Der Logarithmus des Absolutbetrags der Impedanz (Vertikale) ist gegenüber der Zeit nach Aussaat und der Frequenz aufgetragen. (vgl. mit Abb. 76, die bis aus die vertikale Achse gleichbedeutende Achsenbeschriftungen hat.)

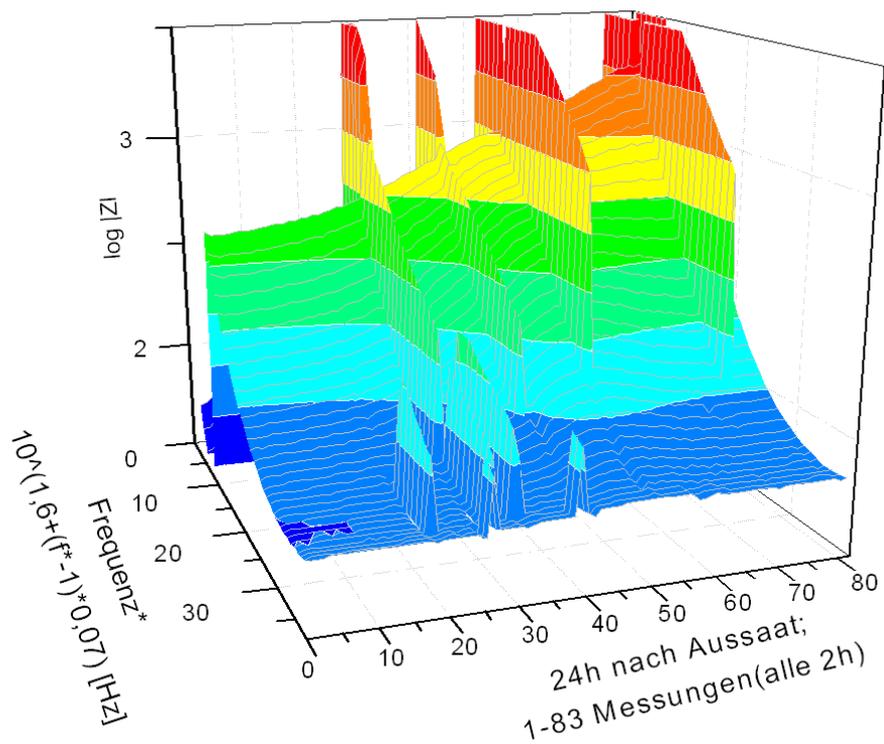


Abbildung 101: 3.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_5; Der Logarithmus des Absolutbetrags der Impedanz (Vertikale) ist gegenüber der Zeit nach Aussaat und der Frequenz (40Hz-100kHz) aufgetragen. (vgl. mit Abb. 76, die bis aus die vertikale Achse gleichbedeutende aber einfachere Achsenbeschriftungen hat.)

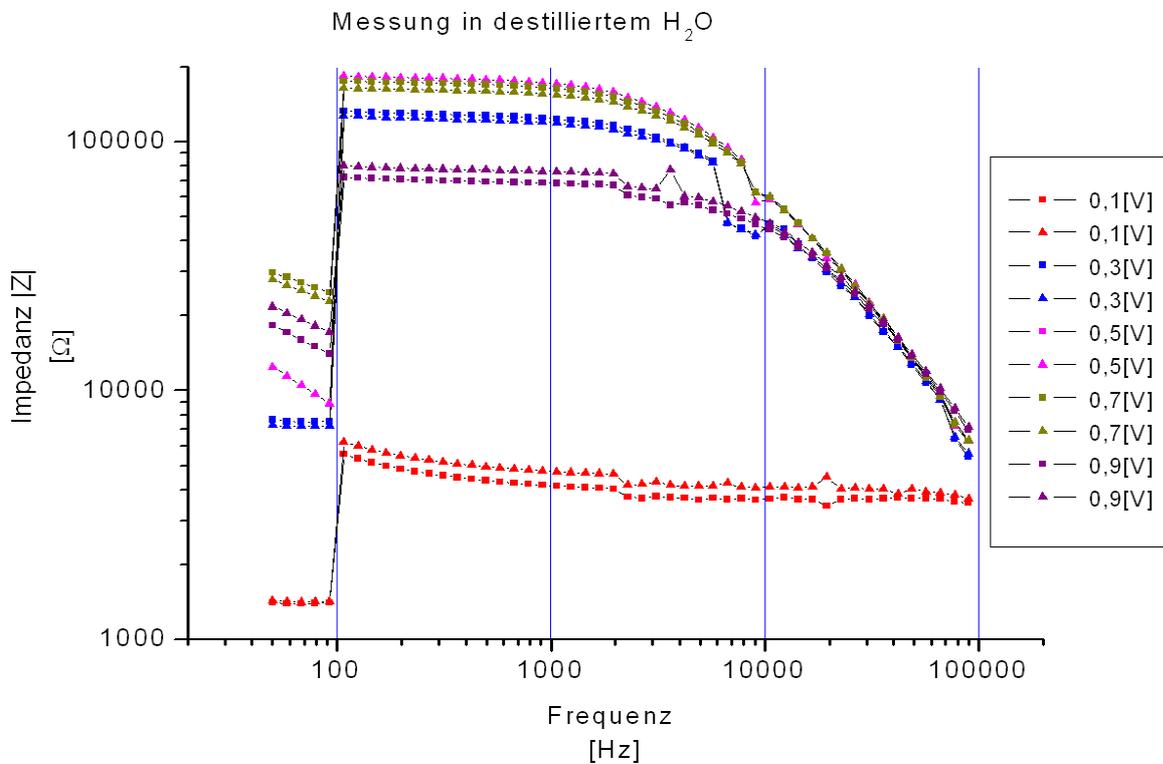


Abbildung 102: IS-Messung in destilliertem Wasser

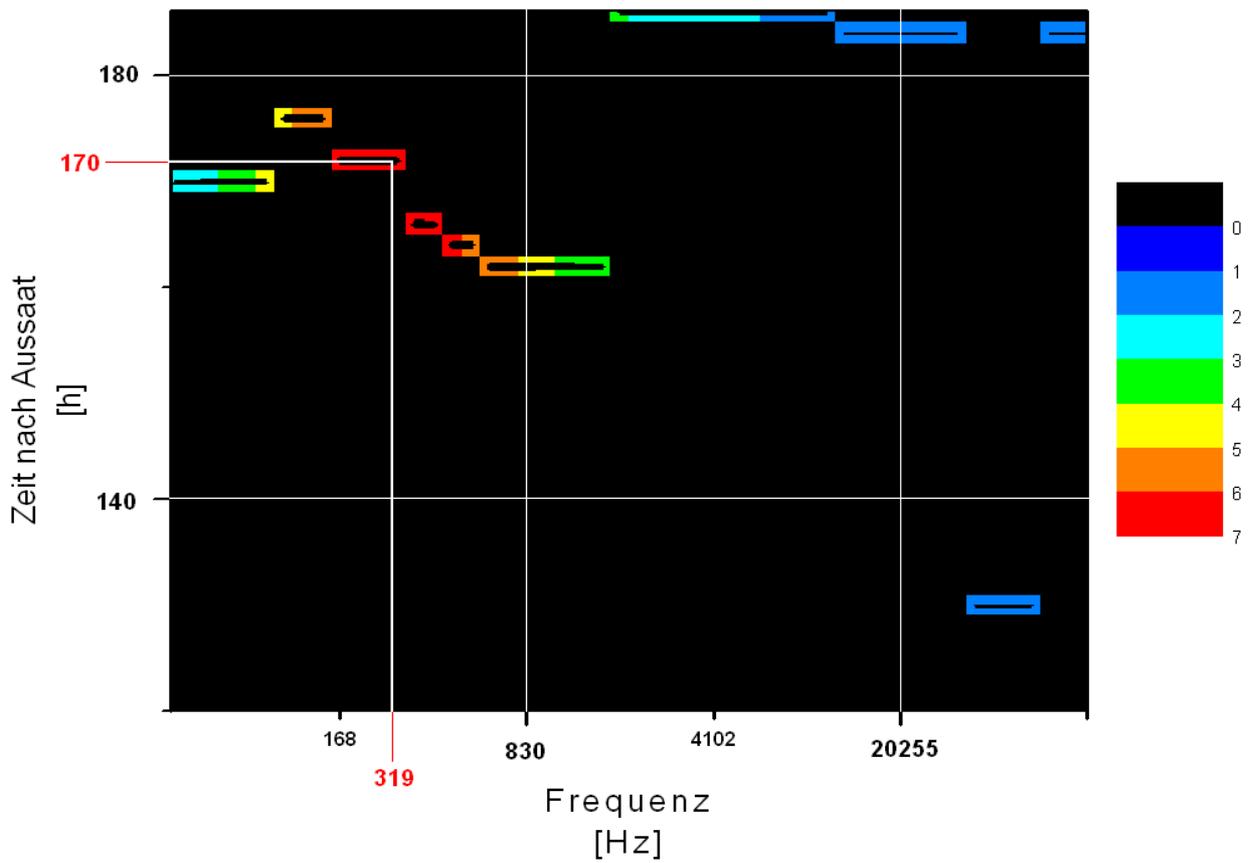


Abbildung 103: 3.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; $|Z|/|Z_1|$ -Maxima des Frequenzspektrums im zeitlichen Rahmen der Bioimpedanzmessung.

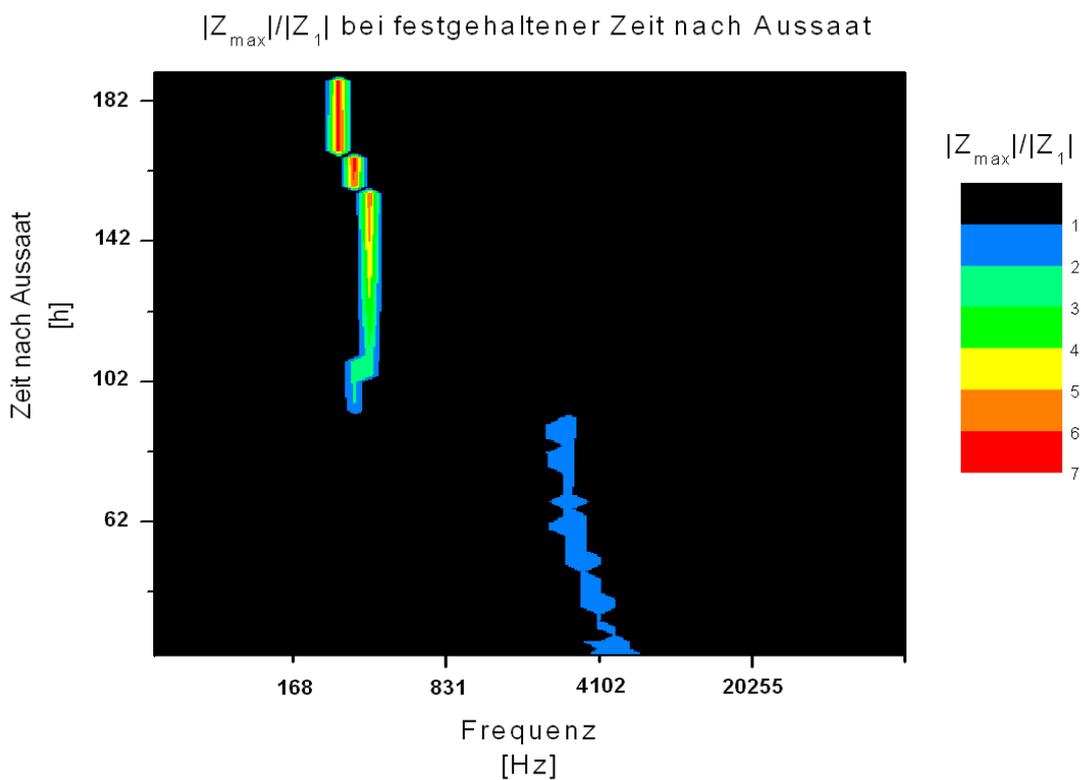


Abbildung 104: 3.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; Maxima; zeitlicher Verlauf der Maxima entlang

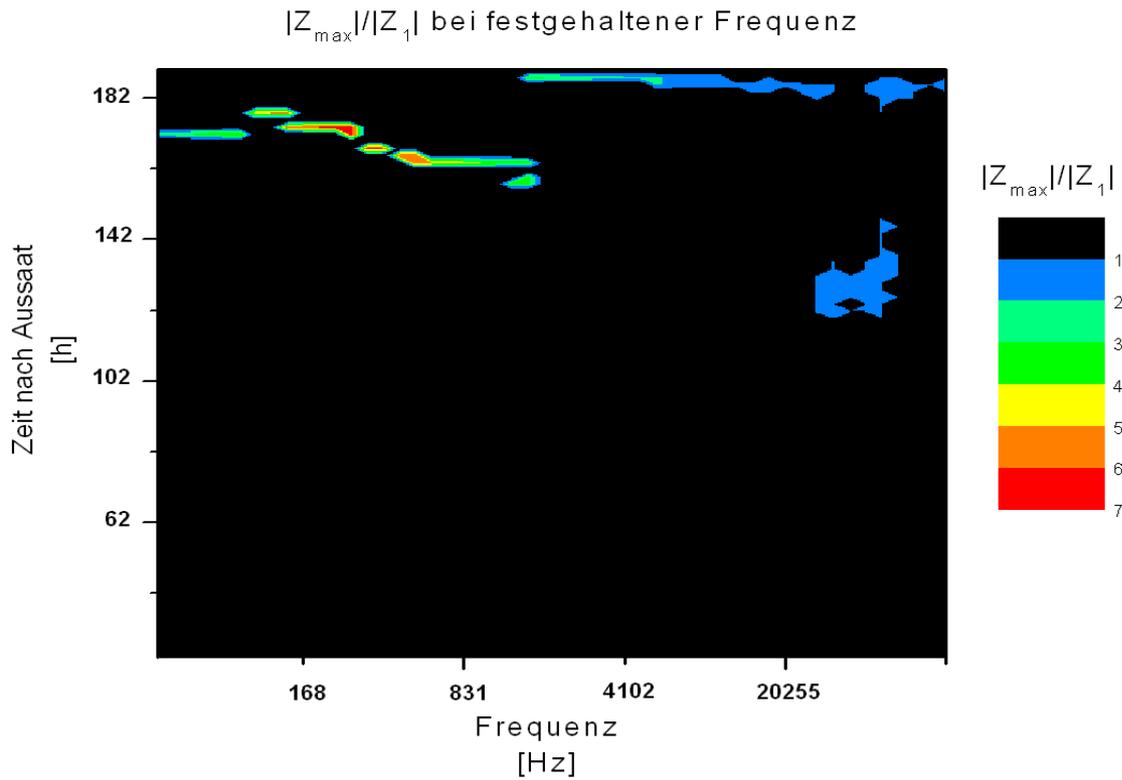


Abbildung 105: 3.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; $|Z|/|Z_1|$ -Maxima des Frequenzspektrums im zeitlichen Rahmen der Bioimpedanzmessung.

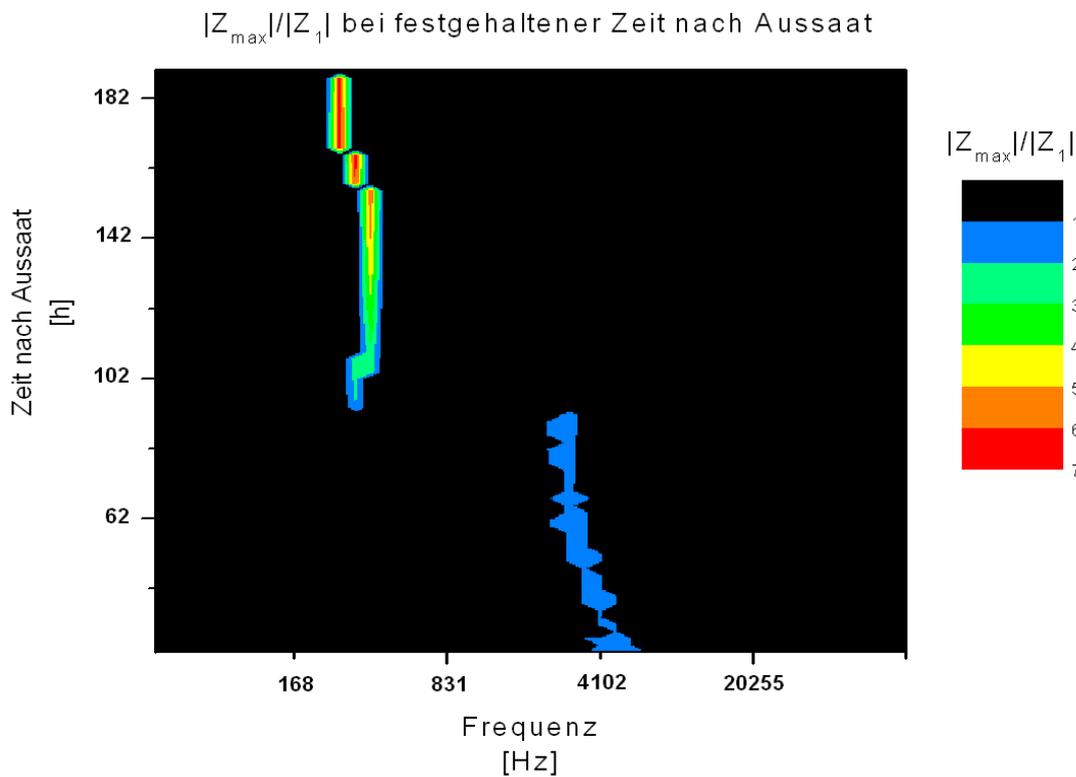


Abbildung 106: 3.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_4; $|Z|/|Z_1|$ -Maxima entlang der Zeit nach Zellaussaat innerhalb der gesamten Frequenzspektrums. (d.h. halte Zeitpunkt fest und suche das $|Z|/|Z_1|$ -Maximum – finde Maximum bei bestimmter Frequenz)

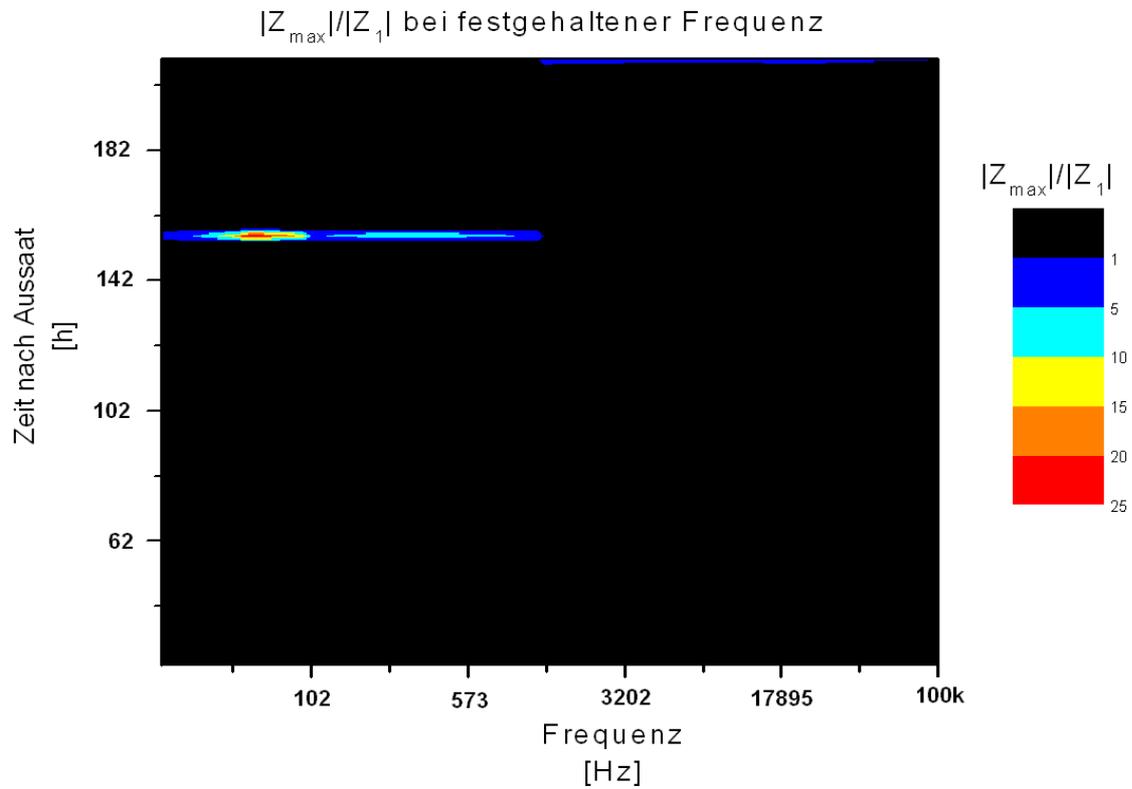


Abbildung 107: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; $|Z|/|Z_1|$ -Maxima des Frequenzspektrums im zeitlichen Rahmen der Bioimpedanzmessung.

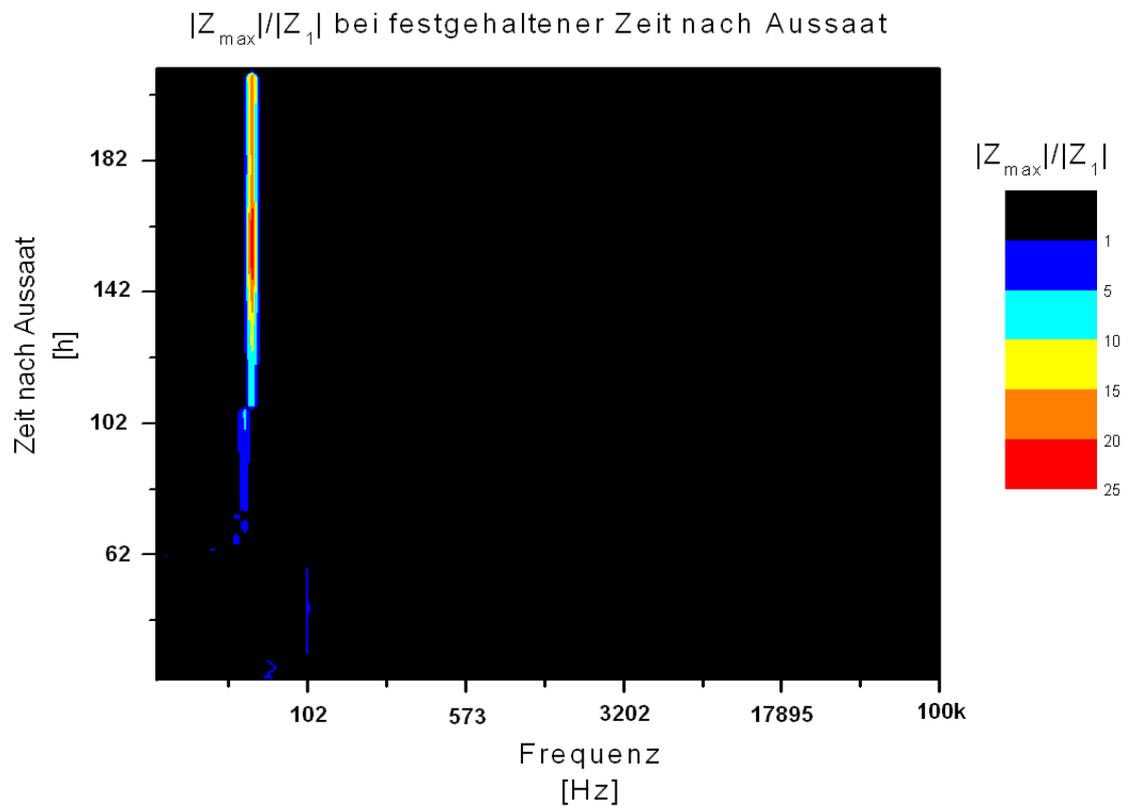


Abbildung 108: 4. Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; $|Z|/|Z_1|$ -Maxima entlang der Zeit nach Zellaussaat innerhalb der gesamten Frequenzspektrums. 7

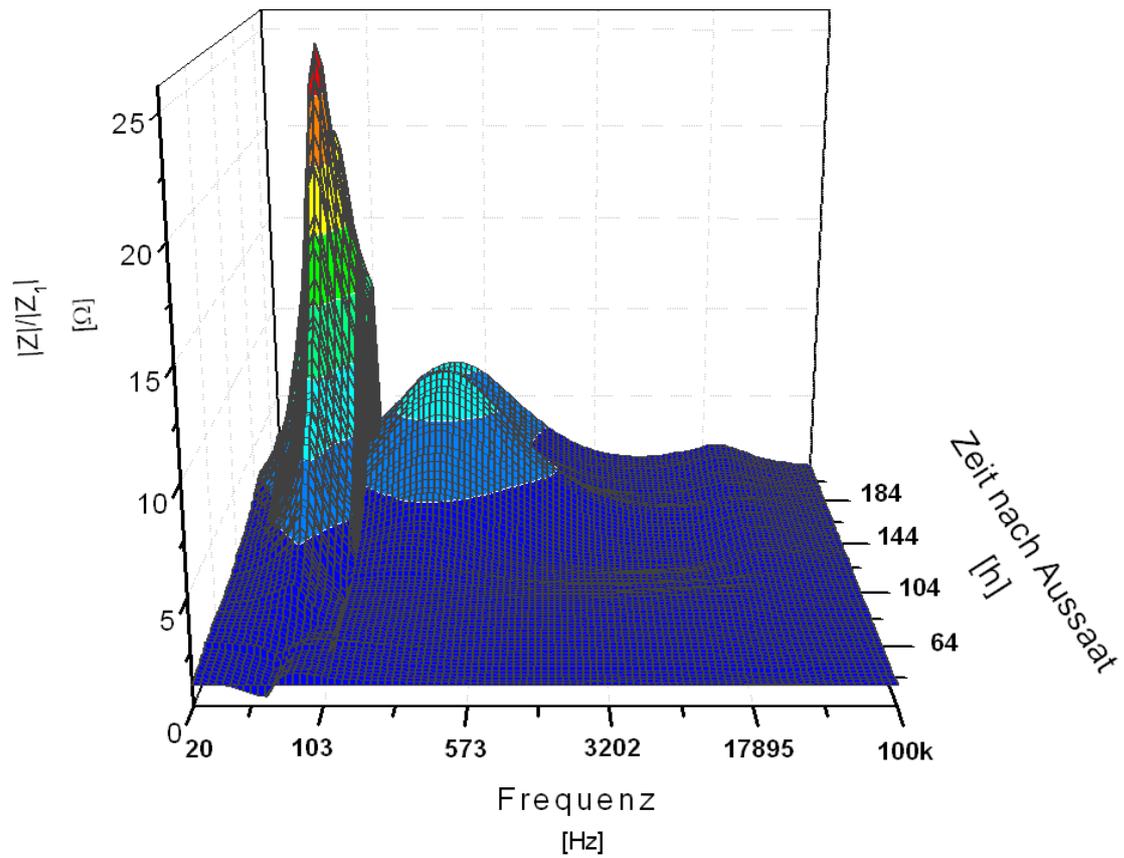


Abbildung 109: 4.Bioimpedanzmessung,Zellkulturkammer_1

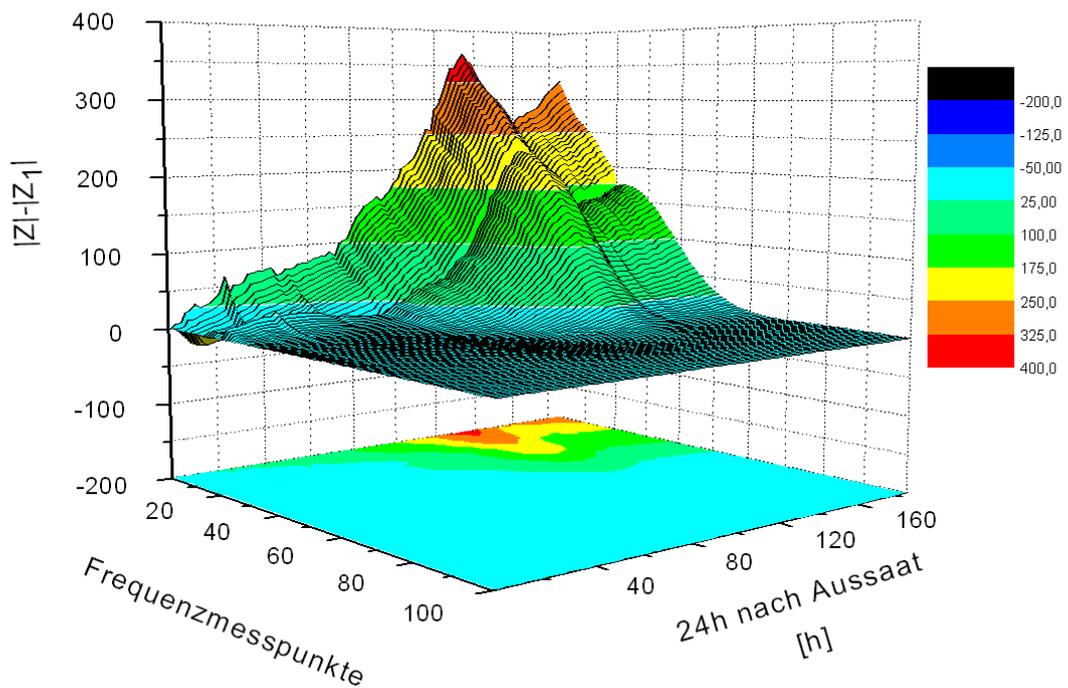


Abbildung 110: 4.Bioimpedanzmessung, Zellkulturkammer_1; $|Z| - |Z_1|$

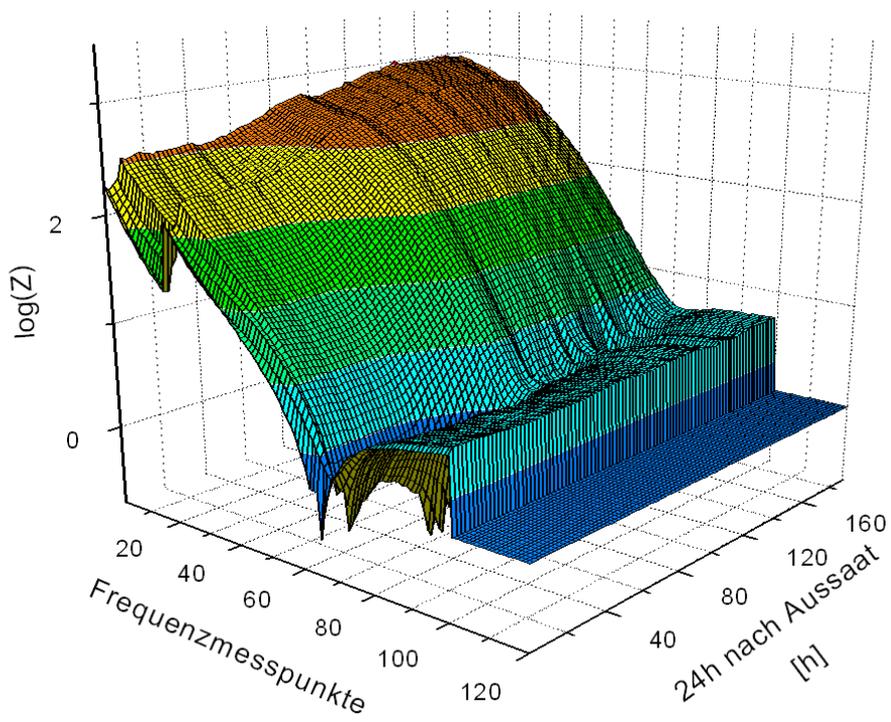


Abbildung 111: 4. Biomessung, Zellkulturkammer_4: $\log(Z)$.

Literaturverzeichnis

- 1 M. Hufnagl, Monitoring of Transepithelial Impedance Spectroscopy of Caco-2 Cell Monolayers using Lithographically Patterned Electrode Arrays, Diplomarbeit, FKE, TU-Wien, 2010.
- 2 M. Fischender, In-situ impedanzmessung an biologischen Caco-2 Zellen mit ides-
elektroden, Diplomarbeit, FKE, Technische Universität Wien, 2009.
- 3 S.M. Krug, M. Fromm, D. Günzel, Two-Path Impedance Spectroscopy for Measuring
Paracellular and Transcellular Epithelial Resistance Biophysical Journal, Vol.97, 2202–
2211, 2009.
- 4 Saure, Original uploader was Saure at de.wikipedia, Deutsch: Impedanz eines Kondensators
im HF-Bereich, Original uploader was Released under the GNU Free Documentation
License. 2009-6-3 (3. Juni 2009 (first version); 11. Juni 2009 (last version)).
- 5 Hyperstryke, Original uploader was Hyperstryke at de.wikipedia, Deutsch:
Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom durch induktive, Original uploader was
Released under the GNU Free Documentation License. 2009-6-3, Last Original uploader
was Hyperstryke at de.wikipedia, 27. Oktober 2008 (original upload date).
- 6 C.H. Hamann, W. Vielstich, Elektrochemie, Wiley-VCH GmbH & Co.KGaA, Weinheim,
S.145ff, 2005.
- 7 G. Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, Chemie Weinheim 1982.
- 8 R. Jansen, Galvanotechnik, Elektrochemische Grundlagen, SurTec GmbH,
Oberflächentechnik, S.2ff, 1997.
- 9 T. Boehme, Pulsuntersuchungen an Ag/AgCl-Polymerelektroden in wässrigen
Elektrolyten im Frequenzbereich 1 Hz bis 1000 Hz, Dissertation, Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, S.5ff, 2001.
- 10 A.-M. Kelterer, Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen, Technische Universität Graz,
Physikalische und Theoretische Chemie, S.2ff, 2004/2005.
- 11 A. Loidl, P. Lunkenheimer, R. Gulich, A. Wixforth, M. Schneider, P. Hänggi, G. Schmid,
Untersuchungen zur Fragestellung ob makroskopische dielektrische Gewebeeigenschaften
auch auf Zellebene bzw. im subzellulären Bereich uneingeschränkte Gültigkeit besitzen,
Abschlussbericht, Institut für Physik, Universität Augsburg, S.19ff, April 2006.
- 12 N.M. Barlea, S.I. Barlea, E. Culea, Maxwell-Wager-Effekt on the Human Skin, Romanian
J. Biophys. Vol.18, No.1, S.87-98, 2008.
- 13 R. Pethig, D.B. Kell, The passive electrical properties of biological systems; their
significance in physiology, biophysics and biotechnology, Phys. Med. Biol. Vol. 32,

No.8, S.933-970, 1987.

- 14 B. Habel, Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen, Biophysik-Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, S.36ff, 2004.
- 15 B. Habel, Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen, Dissertation an Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, S.15, 2004.
- 16 D.D. Macdonald, E. Sikora, G. Engelhardt, Characterizing electrochemical systems in the frequency domain, *Electrochimica Acta*, Vol. 43, Issue: 1-2, S.87-107, 1997.
- 17 C. Bode, A. Parlesak, Lässt sich einem Konsum von Bier und Bierinhaltsstoffen eine ‚präbiotische‘ Wirkung zuordnen?, Universität Hohenheim Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft Abteilung Ernährungsphysiologie, S.8ff, 29.8.2004.
- 18 I.J. Hidalgo, T.J. Raub, R.T. Borchardt, Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (CaCo-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, *Gastroenterology* 96, S.736 – 749, 1986.
- 19 P. Arturssona, K. Palm, K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.46, Issues 1-3, S.27-43, 2001.
- 20 P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra, Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption, *Biotechnol. Prog.* 22, S.186-198, 2006.
- 21 S. Schlichter, Einfluss des Flavonoids Quercetin auf die epitheliale Barrierefunktion der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2, Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam, S.10ff, 2007.
- 22 M. J. Hug, Transepithelial measurements using the Ussing chamber, Universität Münster, Deutschland, Provided through: The European Working Group on CFTR Expression, S.2ff, 2002.
- 23 S.R. Bolsover, J.S. Hyams, E.A. Shephard, C.G. Wiedemann, *Cell Biology*, Wiley-Liss Jersey, S.23ff, 2004.
- 24 F. Asphahani, M. Zhang, Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection, *The Analyst* 132, S.835–841, 2007.
- 25 S. Cho, H. Thielecke, Influence of the electrode radius on the impedance spectra of cell-covered disc electrode, *Microelectronic Engineering* 87, S.719–72, 2010.
- 26 D.Günzel, S.M.Krug, R.Rosenthal and M.Fromm, Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability, *Current Topics in Membranes*, Vol.65, Chapter 3, 2010.
- 27 “MICROSET 101” Silicone Polymer Compounds“, Isomark Ltd., 261 Weddington Road, Nuneaton, Warwickshire, CV10 0HE U.K., 2006

- 28 D. Erdösi, Elektrische und strukturelle Charakterisierung von lebenden Zellen auf mikrostrukturierten Festkörperelektroden, Diplomarbeit, TU-Wien, Institut für Festkörperelektronik, S.41, 2006.
- 29 bio-one Greiner, FlexiERM micro 12, Millicell® ERS-2 User Guide, 2004.
- 30 SYLGARD® 184 Silicone Elastomer Kit, suter-kunststoffe ag, Ch-3303 jegenstorf, 2010
- 31 A.H. Gitter, M. Fromm, J.-D. Schulzke, Impedance analysis for the determination of epithelial and subepithelial resistance in intestinal tissues, J. Biochem. Biophys. Methods 37, S.35–46, 1998.
- 32 Q. Liu, J. Yu, L. Xiao, J.C. On Tang, Y. Zhang, P. Wang, M. Yang, Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode array, Biosensors and Bioelectronics 24, S.1305–1310, 2009.
- 33 M. J. Hug, Transepithelial measurements using the Ussing chamber, Universität Münster, Provided through: The European Working Group on CFTR Expression, S.3ff, 2002.
- 34 E. Grasset, M. Pinto, E. Dussalux, A. Zweibaum, J.-F. Desjeux, Epithelial properties of human colonic carcinomacell line Caco-2: electrical parameters, Journal of Physiology 247 (Cell Physiol. 16): C260-C267, 1984.
- 35 M. Muendoerfer, U.F. Schaefer, P. Koenig, J.S. Walk, P. Loos, S. Balbach, T. Eichinger, C.-M. Lehr, Online monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing, International Journal of Pharmaceutics 392, S.134–140, 2010.
- 36 C. Clausen, S.A. Lewis, J.M. Diamond, Impedance Analysis of Tight Epithelium using a Distributed Resistance Model, Biophys. J. Biophysical Society, Vol.26, S.291-318, 1979.
- 37 W. Franks, I. Schenker, P. Schmutz, A. Hierlemann, Impedance Characterization and Modeling of Electrodes for Biomedical Applications, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, Vol.52, No.7, S.1295-1302, 2005.
- 38 S. Grimnes, Ø.G. Martinsen, Alpha-dispersion in human tissue, International Conference on Electrical Bioimpedance IOP Publishing Journal of Physics: Conference Series 224; 012073, 2010 .

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das Studieren ermöglicht haben, meiner Schwester Eva fürs Korrekturlesen und Clara Tichl für die Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Experimente im Verlauf dieser Arbeit.

...am meisten jedoch danke ich mir selbst und klopfe mir dabei respektbekundend auf die eigene Schulter.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Christian Peter

geb. am 4.2.1983 in Bregenz, Österreich

Studium und Schulausbildung

Okt. 2003-Feb.2012	Studium der Physik an der Universität Wien
Okt.2007-Feb.2008	Studium der Physik an der Universidad Autonoma de Barcelona (Erasmus-Program)
Okt.1998-Jun.2002	BORG Lauterach: Abschluss allgemeiner Hochschulreife (Matura)
Okt.1993-Jul.1998	Mehrerau Bregenz
Okt. 1989-Jul.1993	Volksschule Hard-Markt

.....
Datum

.....
Unterschrift