

Universität Bielefeld
Fakultät für Physik

DESIGN UND IMPLEMENTIERUNG EINER INKUBATIONSPROBENKAMMER FÜR SLOT

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M.Sc.)

angefertigt am
Laser Zentrum Hannover e.V.

vorgelegt von
Tanja Beckmann

Januar 2016

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti, Universität Bielefeld

Dr.-Ing. Heiko Meyer, Laser Zentrum Hannover e.V.

Betreuer:

Dr. Marko Heidrich, Laser Zentrum Hannover e.V.

Kurzzusammenfassung

Die Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) zählt zu den optischen 3D-Mikroskopieverfahren der Lebenswissenschaften und basiert, ebenso wie seine Vorläufermethode, die optischen Projektionstomographie, auf dem Grundprinzip der Computertomographie. Das tomographische Bildgebungsverfahren SLOT ermöglicht eine zerstörungsfreie, volumetrische Abbildung mesoskaliger Proben durch Aufnahme von Projektionsbildern aus verschiedenen Richtungen, wobei als Kontrastmechanismen Absorption, Streuung und Fluoreszenz nutzbar sind.

Aufgrund der guten, biologischen Verträglichkeit dieser Technik ist SLOT prädestiniert für die Untersuchung lebender Proben. Um Langzeitmessungen lebender Proben durchführen zu können, wird allerdings eine künstliche Probenumgebung benötigt, die die natürlichen Umgebungsbedingungen weitestgehend nachahmt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Inkubationsprobenkammer zu entwickeln und umzusetzen, die eine solche künstliche Umgebung bereitstellt. Gleichzeitig soll ein vollständig neues Grundkonzept zur Probenhalterung und Rotation in SLOT umgesetzt werden, das im Gegensatz zur bisher verwendeten Technik eine aufrechte Probenhalterung und Rotation von unterhalb der Probe vorsieht.

Die Basis für die Entwicklung des Inkubationssystems stellt neben dem Grundkonzept ein Anforderungskatalog dar, der die technischen Anforderungen für SLOT und die biologischen Anforderungen für die Inkubation zusammenfasst. Die Konstruktion und Umsetzung des Systems beinhaltet eine Probenkammer, die mit einem minimalisierten Aufbau zur Bildaufnahme in SLOT einsetzbar ist. Darüber hinaus wird die Kammer zu einem Gesamtinkubationssystem erweitert, sodass sie als Probeninkubator, der für SLOT optimiert ist, nutzbar ist. Anhand von verschiedenen Testmessungen soll das System auf seine Funktionalität überprüft werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wird erstmalig ein Konzept zur aufrechten Probenhalterung und Probenrotation in SLOT von unterhalb der Probe realisiert und ein darauf basierendes System zur Langzeitinkubation lebender Proben vorgestellt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Technische Grundlagen: Scanning Laser Optical Tomography	4
2.1.1	Funktionsprinzip und grundlegender Messaufbau	4
2.1.2	Datenerfassung und -verarbeitung	7
2.1.3	Probenspektrum	8
2.2	Biologische Grundlagen: Inkubation	9
2.2.1	Nährmedium und pH-Wert	9
2.2.2	Temperatur	10
2.2.3	Sterilität und Kontaminationen	11
3	Anforderungen an die Inkubationsprobenkammer	13
3.1	Technische Anforderungsspezifikationen	13
3.1.1	Statischer Zustand der Probe	13
3.1.2	Rotation der Probe	13
3.1.3	Optische Zugänglichkeit der Probe	14
3.1.4	Immersion der fixierten Probe	15
3.2	Biologische Anforderungsspezifikationen	15
3.2.1	Bereitstellung und Austausch von Nährmedium und Gas	15
3.2.2	Einstellung der Umgebungstemperatur	15
3.2.3	Sterilität und Sterilisierbarkeit	16
3.2.4	Biokompatibilität verwendeter Materialien	16
4	Entwicklung und Umsetzung der Inkubationsprobenkammer	17
4.1	Konzept des Systems	17
4.2	Proben- und Rotationseinheit	21
4.2.1	Sockel und Schale	21
4.2.2	Rotationsmotor und -teller	23
4.2.3	Basishalter mit Küvette	24
4.2.4	Kontaminationsbarriere der Proben- und Rotationseinheit	26
4.3	Fixierung der Probe	28
4.3.1	Einbettung im Agarosezylinder	28
4.3.2	Halterung im Agarosetopf	29
4.4	Geschlossenes Immersionssystem	30

4.5	Offenes Immersionssystem	33
4.5.1	Mediumzufluss und -abfluss	33
4.5.2	Gaszufluss und -abfluss	37
4.5.3	Druckausgleich	40
4.6	Heizsystem	42
4.6.1	Isolationshaube	42
4.6.2	Heizelement	42
4.6.3	Thermometer	43
4.7	Steuerung der Inkubationsprobenkammer	45
4.7.1	Arduino: Hardware und Software	45
4.7.2	Temperaturregelung des Heizsystems	47
4.7.3	Basis der Steuerungsprogramme	48
4.7.4	Programm zur Steuerung des Pumpsystems	49
4.7.5	Programm zur Steuerung des Heizsystems	50
4.8	Integration in den SLOT-Aufbau	52
4.8.1	SLOT-Aufbau	52
4.8.2	Halterung des Rotationsmotors	54
4.8.3	Gabel für Basishalter	54
4.8.4	Halterung des Medium-Vorratsbehälters	55
5	Charakterisierung des entwickelten Systems	56
5.1	Bildaufnahme mit SLOT	56
5.1.1	Vorbereitung der Messungen und Bildaufnahmemodalitäten	56
5.1.2	Testmessungen an Silikatpartikeln und hES-Zell-Sphäroiden	58
5.1.3	Analyse der Bildaufnahme mit SLOT	63
5.2	Heizsystem mit Temperaturregelung	65
5.2.1	Messaufbau für Testung	65
5.2.2	Messung der Sprungantwort des Systems	66
5.2.3	Testung der Temperaturregelung des Heizsystems	67
5.2.4	Analyse des Heizsystems mit Temperaturregelung	69
5.3	Sterilisierbarkeit und Sterilität der Inkubationsprobenkammer	70
5.3.1	Funktionstest der Kontaminationsbarriere	70
5.3.2	Inkubationstest mit Zellkulturmedium	71
5.3.3	Analyse der Sterilisierbarkeit und Sterilität	73
5.4	Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden	75
5.4.1	Inkubationsmodalitäten	75

5.4.2	Probenpräparation nach Inkubationsabschluss	76
5.4.3	Bestimmung der Zellviabilität	77
5.4.4	Analyse der Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden	80
6	Diskussion und Ausblick	83
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
6.2	Verwendung des Systems mit SLOT	85
6.3	Verwendung des Systems als Inkubator	86
6.4	Ausblick	89
A	Anhang	91
A.1	Komponentenliste	91
A.1.1	Proben- und Rotationseinheit	91
A.1.2	Geschlossenes und offenes Immersionssystem	92
A.2	Konstruktionszeichnungen	93
A.2.1	Sockel	93
A.2.2	Klebehilfe	94
A.2.3	Rotationsteller	95
A.2.4	Basishalter	96
A.2.5	Barrierering	97
A.2.6	Isolationshaube	98
A.2.7	Halterung des Rotationsmotors	101
A.3	Protokoll	103
A.3.1	Herstellung eines 2%-Agarosegel	103
A.4	Schaltpläne	104
A.4.1	Gesamtes Steuerungssystem	104
A.4.2	Halbleiter-Temperatursensor DS18B20	105
A.5	Quellcode	105
A.5.1	Programm zur Steuerung des Pumpsystems	105
	Hauptprogramm	105
	Funktionen der seriellen Kommunikation	109
	Funktionen der Programmroutine	110
A.5.2	Programm zur Steuerung des Heizsystems	112
	Hauptprogramm	112
	Funktionen der seriellen Kommunikation	115
	Funktionen der Programmroutine	115
A.5.3	Programm zur Messung der Sprungantwort	117

Hauptprogramm	117
Funktionen der Programmroutine	118
A.5.4 Programm Testung des Heizsystem	120
Hauptprogramm	120
Funktionen der Programmroutine	121
A.6 Rekonstruktion erfasster Datensätze	122
A.6.1 Testmessung an Silikatpartikeln	122
A.6.2 Testmessung an hES-Zell-Sphäroiden	123
A.7 Bilder	124
A.7.1 DipSlides nach Inkubation	124
A.7.2 Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden	125
Literatur	127
Abkürzungen und Symbole	130
Dankesworte	131
Erklärung	132

„Droit devant soi on ne peut pas aller bien loin...”

„Geradeaus kann man nicht sehr weit gehen...”

– Der kleine Prinz, Antoine de Saint-Exupéry –

1 Einleitung

Zellen sind die Grundbausteine aller Lebewesen. Das Erforschen und Verstehen sowohl zellulärer Prozesse als auch der Entwicklung von Zellverbänden, Gewebe, Organen und Organismen ist im Bereich der Biologie und Medizin von besonderem Interesse. Zur Untersuchung werden Zellen unter den physiologischen Bedingungen kultiviert, die den entsprechenden natürlichen Zuständen *in vivo* nahekommen. Lange Zeit wurde dabei der räumlichen Struktur der Zellkultur nur wenig Bedeutung beigemessen, wohingegen mittlerweile die herkömmliche 2D-Zellkultur zunehmend durch die 3D-Zellkultur erweitert wird [1]. Dieser Wandel hat auch im Rahmen der Mikroskopietechnik einen Bedarf von neuartigen Untersuchungsmethoden geschaffen.

Um volumetrische Darstellungen komplexer, biologischer Objekte der Mesoskala zu erzeugen, stehen verschiedene optische Mikroskopieverfahren zur Verfügung. Eine Möglichkeit liegt zum Beispiel in der lichtblattbasierten Mikroskopie [27, 10, 5], bei der die Fluorophore der Probe Ebene für Ebene mit einem dünnen Lichtblatt angeregt und das entsprechende Fluoreszenzsignal senkrecht zur Ebene erfasst wird. Aus den Schichtaufnahmen werden im Anschluss dreidimensionale Abbildungen generiert. Zum Erreichen hoher Eindringtiefen und zur Minimierung der Streuung sollten die Proben eine hinreichende Transparenz aufweisen, die auch durch optisches Aufklaren erreicht werden kann.

Eine weitere Methode ist die optische Projektionstomographie (engl. *optical projection tomography*, OPT) [26], die auf den gleichen Grundprinzipien wie die Computertomographie (engl. *computed tomography*, CT) beruht. Hierbei werden Projektionsdatensätze einer Probe als Ganzes aus unterschiedlichen Richtungen aufgenommen und mithilfe von Rekonstruktionsalgorithmen zu Schnittbildern, sogenannten Tomogrammen, weiterverarbeitet. Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen können gleichermaßen genutzt werden. Das Probenspektrum begrenzt sich auch bei der OPT auf gering streuende und absorbierende Objekte.

Als weiterentwickeltes Verfahren der OPT wurde im Jahr 2010 am Laser Zentrum Hannover e.V. die rasternde laseroptische Tomographie (engl. *Scanning Laser Optical Tomography*, SLOT) eingeführt. Zur Erzeugung von Projektionsbildern wird die Probe mit einem fokussiertem Laserstrahl abgerastert und die Bildinformation Punkt für Punkt in der Ebene senkrecht zur optischen Achse zusammengesetzt. Nutzbare Kontrastmechanismen sind Absorption, Streuung und Fluoreszenz, wobei das simultane Erfassen unterschiedlicher Detektionskanäle möglich ist. Vorteil von SLOT gegenüber der Vorläufermethode ist eine höhere Lichtsammelleffizienz, was sich in einer gesteigerten Empfindlichkeit auswirkt und geringere Anregungsintensitäten erlaubt. Dadurch bleiben Photobleichung und Phototo-

xizität verhältnismäßig gering. Die eingesetzten Wellenlängen im Bereich zwischen ultraviolettem Licht und nahem Infrarotlicht zeichnen sich gegenüber der Röntgenstrahlung der CT durch hohe, biologische Verträglichkeit aus. Die Auflösung von SLOT beträgt in Abhängigkeit der Wellenlänge des verwendeten Lichts und der numerischen Apertur der verwendeten Optiken in der Regel wenige μm .

Als nicht-invasives, tomographisches Bildgebungsverfahren ist SLOT für die Untersuchung biologischer, hinreichend transparenter bzw. optisch aufgeklärter Proben mit einem Volumen im Kubikmillimeterbereich bis hin zu wenigen Kubikzentimetern geeignet. Die bislang mit dieser Methode untersuchten Probentypen reichen zum Beispiel von Larvengehirnen der *Locusta migratoria* und *Drosophila* [16] über den *Lobus accessorius* der Mauslunge [12] bis hin zu Biofilm auf Zahnimplantatoberflächen [8]. Ein nächster Schritt besteht darin, tomographische Langzeitmessungen lebender Proben, die von Natur aus geringe Absorption und Streuung aufweisen, zu realisieren. Dies könnte beispielsweise erheblich zum Erkenntnisgewinn in der Erforschung komplexer Prozesse der embryonalen Entwicklungsbiologie oder der Wachstumskinetik dreidimensionaler Zellaggregatstrukturen beitragen. Um mit SLOT lebende Proben über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, ist die Proben- und Rotationseinheit des SLOT-Aufbaus um ein Inkubationssystem zu erweitern. Das Inkubationssystem hat dabei die Aufgabe, eine künstliche Probenumgebung zu offerieren, die den physiologischen Bedingungen im Organismus entspricht.

Im Jahr 2012 wurde bereits ein für Durchlicht-Aufnahmen der OPT konzipiertes Inkubationssystem an den SLOT-Aufbau adaptiert [9]. Das System wird allerdings nicht weiter eingesetzt, da sich das Konzept der Konstruktion für SLOT in der Anwendung als nicht praktikabel erwiesen hat. Dies ist insbesondere auf die große Anfälligkeit für mechanische Störungen zurückzuführen. Darüber hinaus bietet das System aufgrund der Handhabung wenig Möglichkeit zur Automatisierung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein für SLOT optimiertes Inkubationssystem zu entwickeln und umzusetzen. Dabei soll mit der Realisierung der Inkubationsprobenkammer ein neues Grundkonzept verwirklicht werden, das im Gegensatz zur bisher verwendeten Technik ein tellerbasiertes System mit aufrechter Probenhalterung und Probenrotation von unten vorsieht [17]. Dies erfordert eine neue Konstruktion der Proben- und Rotationseinheit im SLOT-Aufbau. Grundsätzlich soll das entwickelte System sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen ausgelegt sein, allerdings soll der Fokus in dieser Arbeit zunächst auf der *in vitro* Inkubation von Stammzellaggregaten liegen. Anhand von verschiedenen Testmessungen soll das System auf seine Funktionalität überprüft werden. Diese Arbeit wurde im Rahmen des TOMOSphere-Projekt angefertigt, das auf die Stammzellforschung unter Verwendung von SLOT ausgelegt ist.

Der Aufbau dieser Arbeit gestaltet sich wie im Folgenden beschrieben. Das anschließende Kapitel 2 umfasst technische und biologische Grundlagen, die zum einen das tomographische Bildgebungsverfahren SLOT und zum anderen die Inkubationscharakteristika näher erläutern. Das darauf folgende Kapitel 3 beschäftigt sich mit Anforderungsspezifikationen technischer und biologischer Art, die bei der Realisierung der Inkubationsprobenkammer zu berücksichtigen sind. Die Entwicklung und Umsetzung des Systems ist in Kapitel 4 dargelegt. Um das aufgebaute Inkubationssystem auf grundlegende Funktionen zu überprüfen, erfolgt in Kapitel 5 eine Charakterisierung, die sich aus unterschiedlichen Testmessungen zusammensetzt. Abschließend werden die gewonnenen Ergebnisse in Kapitel 6 zusammengefasst und diskutiert.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Grundlagen erläutert, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit erforderlich sind. Dabei ist dieses Kapitel in die technischen und biologischen Grundlagen unterteilt. In Abschnitt 2.1 wird die Bildgebungsmethode SLOT vorgestellt und in Abschnitt 2.2 werden Aspekte der Probeninkubation näher erklärt.

2.1 Technische Grundlagen: Scanning Laser Optical Tomography

Die Scanning Laser Optical Tomography (SLOT) stellt eine dreidimensionale Mikroskopietechnik dar, die eine zerstörungsfreie, volumetrische Abbildung mesoskopischer Objekte ermöglicht. Sie kommt als Bildgebungsverfahren biologischer Proben vor allem in den Bereichen der Biologie und Medizin zur Anwendung.

2.1.1 Funktionsprinzip und grundlegender Messaufbau

SLOT basiert auf den Prinzipien der dreidimensionalen Computertomographie: Von einem Objekt werden Projektionsbilder aus verschiedenen Richtungen aufgenommen, um dann aus diesem Projektionsdatensatz eine dreidimensionale tomographische Darstellung zu rekonstruieren. Allerdings wird die Probe bei SLOT im Gegensatz zur OPT nicht homogen ausgeleuchtet, sondern mit einem fokussierten Laserstrahl im Wellenlängenbereich zwischen ultraviolettem Licht und nahem Infrarotlicht abgerastert. Als bildgebende Kontrastmechanismen können hierbei neben der Absorption auch Fluoreszenz- bzw. Streulicht dienen. Für die Verwendung dieses Abbildungsverfahrens sind entsprechend lichtdurchlässige Proben Grundvoraussetzung. Als Emissionslichtquelle eignen sich sowohl intrinsische Fluorophore als auch in die Probe eingebrachte Fluoreszenzmarker. [16, 15]

In Abbildung 2.1 ist ein Schema eines SLOT-Aufbaus dargestellt. Der Strahl der Laserlichtquelle wird zunächst über Spiegel durch die Einheit der Strahlformung gelenkt. Die Strahlformung besteht zum einen aus einer Lochblende, um das Strahlprofil räumlich zu filtern und eine homogene Wellenfront zu erzeugen. Zum anderen kann mithilfe einer Irisblende, die eine variable Öffnungsweite besitzt, der Strahldurchmesser und damit die numerische Apertur des Systems eingestellt werden. Um das Objekt vollständig scharf auszuleuchten, ist die Schärfentiefe (engl. *depth of field*, DOF) so zu wählen, dass sie der Probenausdehnung in Richtung der optischen Achse entspricht. Hat das Licht den Teil der Strahlformung durchlaufen, trifft es auf die Ablenk- und Fokussiereinheit. Diese beinhaltet einen x-y-Galvoscaner, der ein zweidimensionales Rastern des Laserstrahls durch zwei über einen Galvanometerantrieb verkippbare Spiegel ermöglicht. Während die Scanachse in x-Richtung eine schnelle, mäandernde Bewegung durchläuft, wird die langsame

y-Scanachse in nur eine Richtung bewegt. Positioniert ist die Scan-Einheit in der hinteren Fokusebene einer abbildenden Linse, über die das Licht schwach fokussiert auf die Probe gelenkt wird. Der Abstand der Abbildungslinse zur Probe wird so gewählt, dass die Fokusebene mittig innerhalb des abzubildenden Objekts liegt.

Die Probe ist in einer quaderförmigen Glasküvette, die mit Immersionsmedium gefüllt ist, mittig hängend platziert. Diese Immersion ist notwendig, um den Brechungsindex der Umgebung an den der Probe anzupassen und so Brechung an der Probenoberfläche und eine damit verbundene Richtungsänderung des Strahls zu unterbinden. Aus dem gleichen Grund sind die planen Ein- und Austrittsfenster der Küvette senkrecht zur optischen Achse ausgerichtet. Kleine Proben können zur einfacheren Halterung zusätzlich in einer Glaskapillare fixiert werden. Um die Aufnahme von Projektionsbildern aus unterschiedlichen Winkeln zu realisieren, ist die Probe über einen verkippbaren Halter an einem Rotationsmotor befestigt. Über die Verkippeinheit kann die Probe auf der Rotationsachse ausgerichtet werden. Die starre Rotationsachse liegt dabei senkrecht zum Strahlengang des Lasers.

Als Detektionskanäle stehen sowohl Transmissionslicht als auch Fluoreszenz- und Streulicht zur Verfügung. Das Transmissionslicht wird in Richtung der optischen Achse aufgenommen und ist durch die Extinktion der durchleuchteten Probe bestimmt. Das Licht wird nach Durchdringen des zu untersuchenden Objekts mithilfe einer Sammellinse kollimiert und auf eine Photodiode geleitet. Das einfallende Licht wird dort basierend auf dem inneren photoelektrischen Effekt in einen Strom umgewandelt, der proportional zur Lichtintensität ist.

Das von der Probe emittierte und gestreute Licht wird in alle Raumrichtungen isotrop abgestrahlt. Daher ist die Detektion dieses Lichts aus mehreren Richtungen möglich. In Abbildung 2.1 ist die Aufnahme nach unten, senkrecht zur optischen Achse gewählt. Das Licht wird von einem Paar asphärischer Kondensorlinsen hoher numerischer Apertur gesammelt und auf die Sensorfläche eines Photoelektronenvervielfachers (engl. *photomultiplier tube*, PMT) abgebildet. Der PMT ist aufgrund der Elektronenvervielfachung ein äußerst sensitiver Detektor, der besonders für die Fluoreszenzlichtdetektion geeignet ist. Mit einem Bandpassfilter, der zwischen den beiden Linsen positioniert ist, wird dabei die Detektion des Anregungslichts unterdrückt.

Da SLOT ein rasterndes Verfahren darstellt, kommen zur Abbildung der Probe Punktdetektoren zum Einsatz, die die Projektionsbilder durch sukzessives Auslesen erstellen. Jede Position des rasternden Laserstrahls entspricht einem Pixel des Projektionsbildes, dem ein bestimmter Grauwert mit einer Farbtiefe von 16 bit zugeordnet wird. Die Bildaufnahme der Detektoren erfolgt dabei simultan, wodurch die Grundlage für eine exakte Überlage-

rung der Abbildungen gegeben ist. Prinzipiell ist bei SLOT-Messungen die Verwendung verschiedener Wellenlängen ebenso möglich wie die Detektion unterschiedlicher Kanäle. Der in Abbildung 2.1 dargestellte Messaufbau kann entsprechend der gewünschten Detektionskanäle modifiziert werden. Die Auflösung beträgt in Abhängigkeit der Wellenlänge des verwendeten Lichts und der numerischen Apertur der verwendeten Optiken in der Regel wenige Mikrometer.

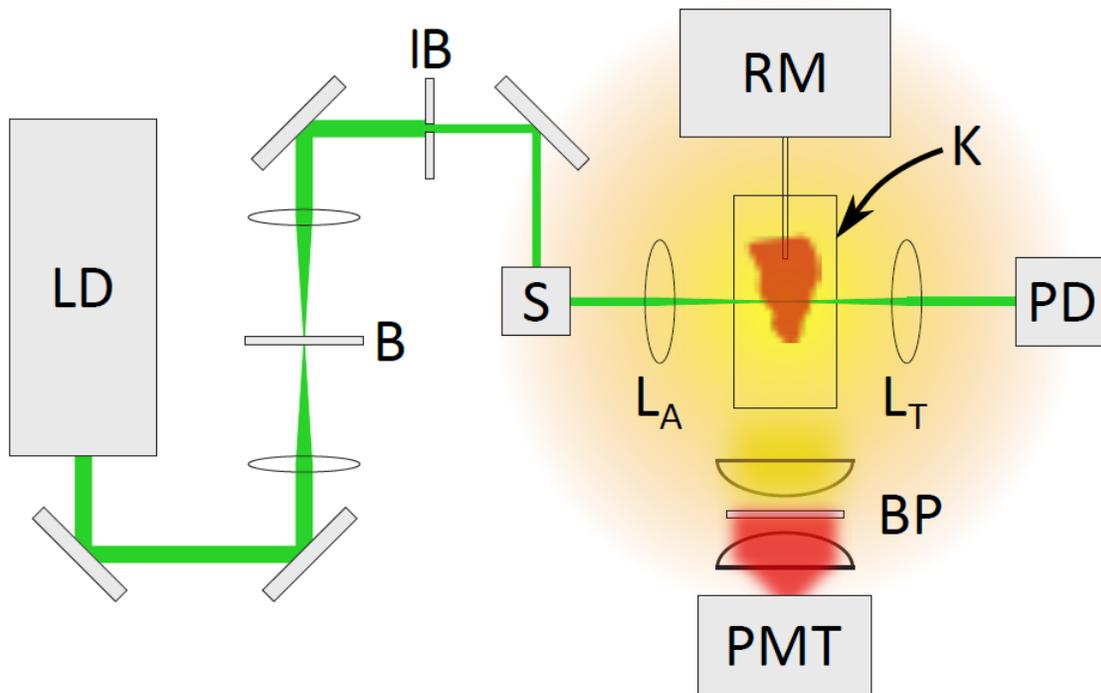


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines SLOT-Messaufbaus (nach [12]). Der Lichtstrahl einer Laserdiode (LD) gelangt über Spiegel durch ein Teleskop, das eine Lochblende (B) enthält. Eine variable Irisblende (IB) wird dazu verwendet, den Strahldurchmesser und die numerische Apertur anzupassen. Nach der Strahlformung wird das Laserlicht auf eine Scan-Einheit (S) geführt, die in Kombination mit einer Abbildungslinse (L_A) ein zweidimensionales Abrastern der Probe ermöglicht. Die Probe ist innerhalb einer mit Immersionsflüssigkeit gefüllten Küvette (K) platziert. Dabei ist die Probe hängend an einem Rotationsmotor (RM) befestigt, dessen Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse liegt. Detektiert wird einerseits das Transmissionslicht, was in Richtung der optischen Achse, durch eine Sammellinse (L_T) kollimiert, auf eine Photodiode (PD) trifft. Andererseits kann das isotrop von der Probe ausgehende Fluoreszenz- und Streulicht über ein Kondensorenlinsepaar gesammelt und auf ein PMT gelenkt werden. Ein Bandpassfilter (BP) zwischen den Linsen verhindert das Passieren von Anregungslicht.

2.1.2 Datenerfassung und -verarbeitung

Zur Steuerung der Komponenten des Messaufbaus in SLOT und zur Erfassung der Messsignale steht eine in der Gruppe entwickelte Softwareumgebung zur Verfügung. Die Steuerungssoftware ermöglicht ein Ein- und Ausschalten der Lichtquelle und die Einstellung des gewünschten Scanbereichs, der von der Ablenk- und Fokussiereinheit realisiert wird. Die Anzahl der Pixel, das heißt die Abtastung, wird über ein entsprechendes Eingabefeld definiert, wobei die Pixelgröße in x- und y-Richtung identisch ist. Darüber hinaus bietet die Software eine Kommunikationsmöglichkeit mit dem Rotationsmotor, um die Winkelposition anzusteuern und auszuwerten. Die sequenziell erfassten Signale der Detektoreinheiten werden als Grauwertbild zusammengesetzt und in jeweils einem Fenster ausgegeben. Mithilfe der Software können einzelne oder laufend aktualisierte Projektionsbilder angezeigt werden oder gesamte Projektionsrohdatensätze im Zuge einer Messung generiert werden. Vor der Durchführung einer Messung erfolgt eine Justierung des SLOT-Aufbaus und die Einstellung der Aufnahmeparameter. Letzteres beinhaltet auch, die Anzahl der Projektionsbilder und damit die Anzahl der äquidistanten Rotationsschritte des Motors zu definieren.

Der aufgenommene Satz an Projektionsdaten kann zu volumetrischen Abbildungen, den sogenannten Tomogrammstapeln, weiterverarbeitet werden. Hierfür ist, wie bei allen CT-basierenden Verfahren, eine computergestützte Bildrekonstruktion erforderlich, die auf der inversen Radontransformation [22] beruht.

Beim Durchgang des Lichts durch ein Objekt, wird die ursprüngliche Strahlungsintensität I_0 in Abhängigkeit des material- und wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten α des absorbierenden Materials und seiner Schichtdicke d abgeschwächt. Dieser Zusammenhang kann durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben werden. Da der Absorptionskoeffizient innerhalb einer Probe entlang des Lichtwegs variiert, folgt für die Intensität I des durchdringenden Strahls:

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\int \alpha(s) \cdot ds\right)$$

Wird eine Ebene der Probe mit einem parallel versetzbaren, monochromatischen Laserlinie für Linie durchleuchtet und die Lichtintensitäten hinter dem Objekt aufgezeichnet, entsprechen die detektierten Signale dem Integral der Einzelabsorption entlang der Linie. Diese Integrale werden durch die Radontransformierte R beschrieben und sind über den Abstand p vom Ursprung und über den Winkel φ zur x-Achse definiert. Eine schematische Darstellung der Radontransformation ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Durch Invertieren der Radontransformation kann aus vielen Projektionen, die aus verschiedenen Winkeln auf-

genommen wurden, die transformierte Funktion rekonstruiert werden. Die transformierte Funktion entspricht dabei der Intensitätsverteilung in der Ebene. Die Darstellung jeder Zeile in der Ebene eines vollständigen Projektionssatzes zeigt eine Intensitätsverteilung in Abhängigkeit des Winkels φ und wird als Sinogramm bezeichnet. Durch die rotierende Probenbewegung folgt jeder Punkt des Objekts einer Kreisbahn, die im Sinogramm als Sinusfunktion mit variabler Amplitude und Phase sichtbar ist. [15, 7]

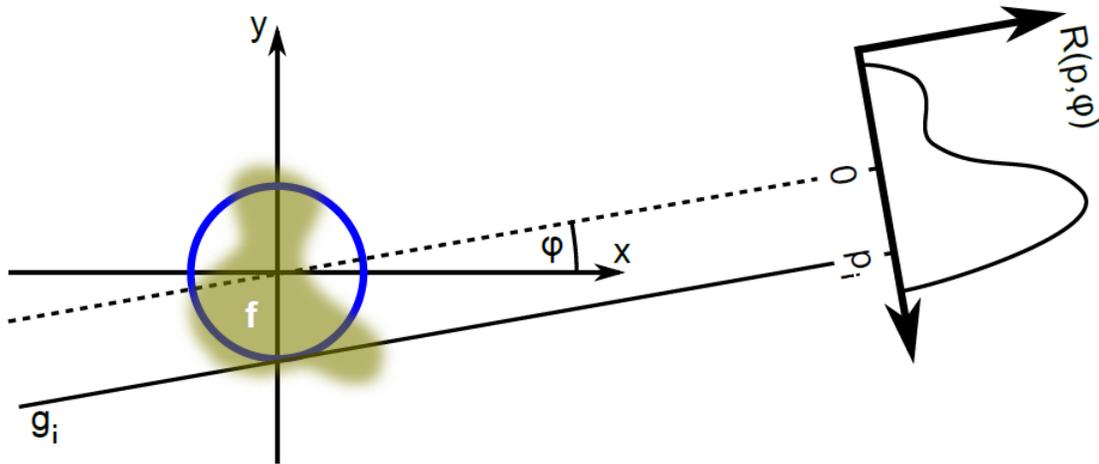


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Radontransformation (nach [7]). Die Radontransformierte $R(p, \varphi)$ der Funktion $f(x, y)$ ist durch die Gesamtheit der Integrale entlang der Geraden g_i im Abstand p_i vom Ursprung und im Winkel φ zur x-Achse gegeben.

Bevor eine vollständige Rekonstruktion der Datensätze vorgenommen wird, erfolgt eine Vorbereitung der erfassten Rohdaten. In diesem Schritt wird zum einen der Projektionsdatensatz des Transmissionskanals einer Logarithmierung unterzogen, um dem Lambert-Beerschen Gesetz gerecht zu werden. Zum anderen können auftretende Artefakte, das heißt durch den Messprozess bedingte Fehlinformationen in den Projektionsaufnahmen, teilweise beseitigt werden. Hierzu zählen beispielsweise der Zeilenversatz, der durch das Mäandern der scannenden x-Achse verursacht wird, oder eine verkippte Ausrichtung der Rotationsachse hinsichtlich der y-Scanachse. Die Korrektur weiterer Artefakte, wie beispielsweise die Fehlstellung der Rotationsachse in Bezug auf die optische Achse oder durch unkontrollierte Bewegungen der Probe verursachte Bewegungsartefakte, ist nachträglich nur bedingt möglich. [7]

2.1.3 Probenspektrum

Zur volumetrischen Abbildung nach dem SLOT-Prinzip eignen sich Proben mit einer Größe im Millimeter- bis Zentimeterbereich, je nach verwendetem Messaufbau [15]. Die Probe

muss während der Aufnahme der Projektionsbilder ein statisches Verhalten aufweisen und präzise um eine Achse rotiert werden. Insbesondere bei lebenden Proben ist hierfür die Einbettung in ein Medium notwendig, das zusätzlich an den Brechungsindex der Probe angeglichen ist.

Um Projektionsbilder mit SLOT aufnehmen zu können, sind transparente bis leicht opake Proben erforderlich, sodass die Streuung und Absorption entsprechend gering ist [15]. Diese Lichtdurchlässigkeit der Proben kann natürlich gegeben sein oder durch eine Methode des optischen Aufklarens, wie beispielsweise CRISTAL [7], erzielt werden. Für die Bildgebung lebender Proben ist eine derartige Modifikation allerdings ausgeschlossen, wodurch sich das Probenspektrum auf natürlich transparente und leicht opake Proben reduziert. Durch die Aufnahme von Emissionslicht können autofluoreszierende Strukturen oder speziell markierte Elemente einer Probe abgebildet werden [16].

2.2 Biologische Grundlagen: Inkubation

Zur Kultivierung biologischer Proben ist es notwendig, eine künstliche Umgebung zu schaffen, die den ursprünglichen physiologischen Bedingungen im Organismus entspricht. Die Kulturbedingungen hängen daher im Einzelnen von der Probe ab und variieren, um optimale Wachstumsbedingungen zu generieren. Wichtige Parameter für die Inkubation stellen das Nährstoffangebot, der pH-Wert und der osmotische Druck sowie die Gaszusammensetzung und die Temperatur dar. Während die drei erstgenannten Parameter durch das Nährmedium eingestellt werden, erfolgt in der Zellkultur die Regulierung der letztgenannten in der Regel mittels eines Brutschranks, das heißt eines Inkubators. Idealerweise sind die Parameter über den Zeitraum der Inkubation konstant. [24]

Für die 3D-Zellkultur ist es darüber hinaus charakteristisch, die räumliche Struktur von biologischem Gewebe und Zellverbänden nachzuahmen, was in einem veränderten Verhalten der kultivierten Zellen resultiert. Dafür wird im Allgemeinen ein synthetisiertes oder aus lebenden Systemen extrahiertes Strukturproteingerüst eingesetzt, das der extrazellulären Matrix der natürlichen Umgebung gleichkommt. [1]

2.2.1 Nährmedium und pH-Wert

Das flüssige Nährmedium hat die Aufgabe, alle auf die Probenbedürfnisse angepassten, essenziellen Nährstoffe bereitzustellen und den pH-Wert sowie den osmotischen Druck zu regulieren. Das Medium spielt somit eine entscheidende Rolle beim Wachstum und bei der Proliferation der Organismen und ist in seiner chemischen Zusammensetzung abhängig von der zu kultivierenden Probe auszuwählen. Zur Verfügung stehen sowohl Standardmedien

als auch spezielle Medien, die jeweils durch das Hinzufügen zusätzlicher Supplemente an die vorliegenden Anforderungen individuell angepasst werden können.

Der optimale pH-Wert des Kulturmediums richtet sich ebenfalls nach dem kultivierten Zelltyp und liegt für die meisten Säugerzellen bei 7,4. Stabilisiert wird der pH-Wert durch ein im Nährmedium enthaltendes Puffersystem, das durch den Metabolismus der Probe bedingte Schwankungen ausgleichen kann. In der Regel erfolgt die Pufferung durch organische Puffersubstanzen, wie beispielsweise HEPES, oder durch das Kohlensäure-Hydrogencarbonat-Puffersystem, das auch im Blut der Wirbeltiere vorkommt. Hierfür wird dem Kulturmedium Natriumhydrogencarbonat zugesetzt, das in seiner dissoziierten Form Hydrogencarbonat bereitstellt. Die notwendige Kohlensäure entsteht aus der Reaktion von Wasser und gelöstem Kohlenstoffdioxid aus der Umgebungsluft. Grundvoraussetzung zur Verwendung dieses Puffersystems ist eine kontrollierte Begasung mit einer definierten Kohlenstoffdioxid-Konzentration, die für die meisten Systeme bei 5 % liegt. Durch eine Änderung des Kohlenstoffdioxid-Gehalts wird der pH-Wert des Mediums beeinflusst. [6, 14]

Da das Nährstoffangebot des Kulturmediums durch den Metabolismus der Probe zunehmend sinkt und einige Inhaltsstoffe in der Regel eine gewisse thermische Instabilität aufweisen, ist ein geregelter Mediumwechsel erforderlich. Außerdem wird im Laufe der Zeit das Medium mit Stoffwechselendprodukten angereichert, die unter anderem zu einer Ansäuerung des Nährmediums führen. Die Art und Häufigkeit der Mediumerneuerung richtet sich nach dem kultivierten Probenotyp, insbesondere bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit, Stoffwechselaktivität und Zellaktivität sowie nach dem verwendeten Nährmedium. Für manche Zellkulturen ist ein vollständiger Mediumwechsel sinnvoll, wohingegen bei anderen Kulturen lediglich ein Teil des verbrauchten Nährmediums gegen Neues ausgetauscht wird. Letzteres bietet den Vorteil, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums nicht so gravierend verändert wird, wodurch die Zellumgebung weniger stark beeinträchtigt wird. Eine permanente Mediumerneuerung wird bei der Perfusionskultur durchgeführt. Diese Art der Versorgung ist dem Zustand, der *in vivo* vorliegt, am ähnlichsten. Um konstante Kultivierungsbedingungen zu realisieren, ist in jedem Fall eine Periodizität des Mediumwechsels nützlich. [6, 24]

2.2.2 Temperatur

Die Temperatur ist ein Parameter, der Einfluss auf alle biochemischen bzw. enzymatischen Reaktionen in einem Organismus nimmt. Damit ist die optimal temperierte Umgebung relevant für die Inkubation lebender Proben. Bei einer zu niedrigen Temperatur sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit, sodass sich die Stoffwechselaktivität verringert und

das Wachstum gehemmt wird. Überschreitet die Temperatur ihren Optimalwert, kann es zu Hitzeschockreaktionen und Denaturierung von Proteinen kommen, was eine Zellschädigung zur Folge hat. Demnach ist eine zu hohe Temperatur meist problematischer als eine zu niedrige. [6]

Die optimale Umgebungstemperatur zur Kultivierung richtet sich nach der Art der Probe. Für Säugerzellen liegt sie bei etwa 37 °C, wohingegen sie beispielsweise für Insektenzellen meistens 27 °C beträgt [14]. Für die Bereitstellung idealer Wachstumsbedingungen ist das Halten einer konstanten Temperatur wichtiger als das exakte Erreichen des Temperaturoptimums [6]. Bei Brutschränken wird eine Genauigkeit der Temperaturregelung von $\pm 0,2$ °C [14].

2.2.3 Sterilität und Kontaminationen

Sterilität bedeutet laut der Norm DIN EN 556 die Abwesenheit von vermehrungsfähigen Mikroorganismen einschließlich ihrer Dauerstadien. Zu den Mikroorganismen, die eine Kontamination in der Zellkultur hervorrufen können, zählen prokaryotische Bakterien und Mykoplasmen, eukaryotische Pilze und Hefen sowie Viren. Dabei sind Bakterien, Pilze und Hefen aufgrund ihrer schnellen Vermehrung im Allgemeinen besonders auffällig. Während viele Kontaminationen mit bloßem Auge nicht erkennbar sind, ist ein Befall der Zellkultur von Bakterien oftmals mit einer Trübung des Zellmediums und einem Abfall des pH-Werts verbunden, der durch den Stoffwechsel der Mikroorganismen hervorgerufen wird. Eine Kontamination von Pilzen kann beispielsweise anhand von fädigen bis faserigen Strukturen im Nährmedium erfasst werden. Die Auswirkungen von Kontaminationen auf die Zellkultur sind vielfältig und reichen von der Einflussnahme auf zelluläre Prozesse bis hin zur irreversiblen Schädigung der Zellen. Als Hauptquellen für Kontaminationen kommen die Raumluft, die Verwendung unsteriler Utensilien, Medien und Substanzen in Kontakt mit der Zellkultur, bereits kontaminierte Zellen sowie der Experimentator selbst in Frage. Insbesondere von den Mykoplasmen geht angesichts ihres kleinen Durchmessers von 0,1 - 2 μm und ihrer flexiblen Form eine Kontaminationsgefahr aus, da sie sehr häufig vorkommen und im Stande sind, die Poren von Standard-Sterilfiltern zu durchdringen. Mit dem Einsatz von Antibiotika, Antimykotika usw. kann zwar das Auftreten von Kontaminationen eingeschränkt werden, allerdings nehmen diese Agenzien auch Einfluss auf die Zellen und wirken unter Umständen sogar toxisch. Darüber hinaus können bereits vorhandene Kontaminationen durch die Zusätze unbemerkt weiterhin existieren. [6, 24]

Um einen sterilen Zustand herzustellen, gibt es verschiedene Sterilisationsverfahren. Der Anspruch an eine erfolgreiche Sterilisation ist dabei nicht der Zustand der absoluten Sterilität, sondern die Reduktion der Existenz vermehrungsfähiger Mikroorganismen auf eine

Wahrscheinlichkeit von unter 1:1 000 000 pro Sterilgut. Die Sterilisationstechniken basieren auf dem Einsatz von trockener oder feuchter Hitze, chemischen Substanzen wie beispielsweise Alkohol oder ionisierender Strahlung bzw. UV-Strahlung. Abhängig von der Art der mikrobiellen Kontamination und der Stärke der Belastung sowie abhängig von der Beschaffenheit des Sterilguts ist ein geeignetes Sterilisationsverfahren auszuwählen, um den gewünschten Zustand der Sterilität zu erreichen. Bei korrekter Anwendung gilt die Dampfsterilisation im Autoklaven als sicherste Sterilisationsmethode. Dabei wird das Sterilgut für die Dauer von mindestens 15 min gesättigtem Wasserdampf bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2 bar ausgesetzt (vgl. Norm DIN EN 285). Zur Vermeidung von Kontaminationen in der Zellkultur ist ein aseptisches Vorgehen und Arbeiten erforderlich. [24]

3 Anforderungen an die Inkubationsprobenkammer

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Anforderungsspezifikationen, die an eine Inkubationsprobenkammer zur Verwendung für SLOT gestellt werden. Diese Anforderungen bilden die Grundlage für die Entwicklung des Systems. In Abschnitt 3.1 wird auf die technischen Anforderungsspezifikationen eingegangen, die von der Kammer durch das SLOT-System selbst gefordert werden. Darüber hinaus ist das Erfüllen von Anforderungen, die sich aus dem biologischen Kontext heraus ergeben, essenziell für die Entwicklung der Inkubationsprobenkammer. Die biologischen Anforderungsspezifikationen sind im Abschnitt 3.2 dargelegt.

3.1 Technische Anforderungsspezifikationen

Die technischen Anforderungsspezifikationen richten sich im Wesentlichen an die Konzeption der Proben- und Rotationseinheit des Systems, die als eigenständige Einheit einen elementaren Bestandteil des SLOT-Aufbaus ausmacht. Um eine erfolgreiche SLOT-Bildaufnahme mit der Probenkammer zu ermöglichen, muss das System insbesondere den im Folgenden dargestellten Anforderungen gerecht werden.

3.1.1 Statischer Zustand der Probe

Die Dauer der Aufnahme eines Projektionsdatensatzes mit SLOT beträgt in der Regel mehrere Minuten bis hin zu einer Stunde. Über den gesamten Zeitraum der Bildaufnahme muss die zu untersuchende Probe ein statisches Verhalten aufweisen, um unkontrollierte Bewegungen der Probe und damit verbundene, unter Umständen unkorrigierbare Bewegungsartefakte zu vermeiden. Daher ist, insbesondere für lebende Objekte, eine Fixierung der Probe notwendig. Zur Vermeidung von Verformung der Probe während der Messung ist die Rotationsachse idealerweise parallel zur Gravitation zu wählen.

3.1.2 Rotation der Probe

Das Prinzip von SLOT basiert auf einer vollständigen Drehung der Probe auf einer Kreisbahn um eine definierte Achse. Diese Rotationsachse spielt dabei eine wichtige Rolle, da sie eine mögliche Quelle für verschiedene Arten von Artefakten darstellt und entscheidend für die Qualität der Bildaufnahmen ist.

Vorgegeben und definiert ist diese Achse durch den Rotationsmotor und sie pflanzt sich durch alle in direkter Verbindung zum Rotationsmotor stehenden Bauteile einschließlich der Probe fort. Besteht keine starre mechanische Verbindung der Komponenten unterein-

ander oder ist der Rotationsmotor selbst instabil positioniert, ist die präzise Probenrotation gestört. Hierbei kann es zu Exzentrizität und Taumeln der Achse kommen, was zu Bewegungsartefakten bei der Bildgebung führt. Außerdem erhöht sich durch eine mangelnde Stabilität der Rotationsachse der Einfluss von äußeren Schwingungen auf das System, wodurch die Bildauflösung ebenfalls herabgesetzt wird. Definierbare Bewegungsartefakte können teilweise korrigiert werden, jedoch gilt es stets die Entstehung der Artefakte zu unterbinden, indem für ausreichende mechanische Stabilität gesorgt ist.

Die Stabilität des Systems wird gegenüber der herkömmlichen Variante zusätzlich erhöht, indem eine Halterung und Rotation der Probe von unten realisiert wird. Die aufrechte Probenhalterung bietet den Vorteil, dass der Rotationsmotor als Schwerpunkt und Ausgangspunkt der Rotationsachse tiefer liegt und dadurch geringere Anfälligkeit für Schwingungen zeigt. Außerdem wird die Distanz zwischen Probe und Motor verringert, wodurch die mechanische Stabilität ebenfalls erhöht wird.

Ein weiterer Aspekt liegt in der präzisen Ausrichtung der Rotationsachse, um eine Fehlstellung und damit verbundene Artefakte zu verhindern. Zum einen sollte sich die Rotationsachse parallel zur scannenden y -Achse befinden. Eine Verkippung der Projektionsaufnahmen in der x - y -Ebene ist allerdings auch im Anschluss der Messung durch eine Rotation des Projektionsrohdatensatzes korrigierbar. Zum anderen ist die Ausrichtung orthogonal zur optischen Achse, von großer Bedeutung, sodass sich die rotierende Probe in den Projektionsbildern auf einer Geraden anstatt auf einer elliptischen Bahn bewegt. Eine nachträgliche Korrektur dieser Fehlstellung ist nur bedingt möglich und zudem mit viel Aufwand verbunden. Die Justierung der Achsenstellung in z -Richtung sollte daher durch das System ermöglicht werden.

3.1.3 Optische Zugänglichkeit der Probe

Zur Durchführung von Bildaufnahmen ist die optische Zugänglichkeit der Probe eine Grundvoraussetzung. Dafür ist eine derartige Platzierung der Probe innerhalb der Proben- und Rotationseinheit nötig, dass dem Lichtstrahl zwischen Ablenk- und Fokussiereinheit und Detektoreinheit freier Zugang zur fixierten Probe gewährt ist. Darüber hinaus sieht das SLOT-Messprinzip die Aufnahme von Projektionsbildern aus unterschiedlichen Richtungen senkrecht zu einer Rotationsachse vor. Um eine Zugänglichkeit der Probe aus allen Richtungen zu erzielen, ist sie bezüglich der Rotationsachse mechanisch zu fixieren. Es ist auch möglich, die Probe dazu in einem geeigneten, starren Medium einzubetten. Das Vorkommen möglichst weniger Grenzfläche im Strahlengang ist in Bezug auf die Vermeidung von Artefakten, die durch Brechung verursacht werden, von Vorteil.

3.1.4 Immersion der fixierten Probe

Die Probenimmersion ist wesentlich für die SLOT-Mikroskopietechnik, da dadurch die Brechung und Reflexion an der Probenoberfläche bzw. der Oberfläche einer eingebetteten Probe minimiert und die Bildauflösung gesteigert wird. Voraussetzung dafür ist, dass der Brechungsindex des Mediums der Probenumgebung an den Brechungsindex der Probe selbst oder des Einbettungsmediums der Probe angepasst ist. Die Proben- und Rotationseinheit hat unter anderem die Funktion, diese Probenimmersion zu ermöglichen und den Raum für eine angepasste Probenumgebung zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich sind zwei plane, optisch transparente Oberflächen senkrecht zur optischen Achse und parallel zur Rotationsachse wichtig für das Ein- und Austreten des rasternden Laserstrahls, um eine Richtungsänderung des Strahls an der Grenzfläche und damit verbundene Artefakte zu vermeiden.

3.2 Biologische Anforderungsspezifikationen

Die biologischen Anforderungsspezifikationen nehmen ebenso wie die technischen Spezifikationen Einfluss auf die Proben- und Rotationseinheit. Darüber hinaus kommen sie allerdings auch für das gesamte Inkubationssystem zum Tragen. Die im Folgenden beschriebenen Aspekte sind für eine Langzeitinkubation relevant.

3.2.1 Bereitstellung und Austausch von Nährmedium und Gas

Zur Kultivierung einer Probe ist ein entsprechendes Nährmedium erforderlich, das als Probenumgebung dient und vom System bereitgestellt wird. Um das Nährmedium zu erneuern, ist ein geregelter Mediaustausch notwendig, der sich in seiner Häufigkeit und Menge nach den Bedürfnissen der Probe richtet. Dabei kommt es auf eine zyklische Veränderung des Nährmediums an, damit kontinuierliche Inkubationsbedingungen geschaffen werden. Da die Einstellung des pH-Werts vieler Kulturmedien über den Kohlenstoffdioxid-Gehalt der umgebenden Atmosphäre erfolgt, ist eine kontrollierte Begasung der Probenumgebung nötig. Zur vereinfachten Handhabung sollte der Austausch von Nährmedium und Gas idealerweise automatisiert sein.

3.2.2 Einstellung der Umgebungstemperatur

Für die Kultivierung biologischer Proben ist das Einstellen einer definierten Temperatur der Probenumgebung wichtig. Bei Stammzellen beträgt die optimale Inkubationstemperatur 37 °C. Dabei ist eine konstante Temperatur über den gesamten Inkubationszeitraum

mithilfe eines Heizsystems sicherzustellen. Um den Stress auf biologische Proben zu minimieren und optimale Wachstumsbedingungen zu realisieren, sind Temperaturschwankungen möglichst gering zu halten. Das Heizsystem sollte so beschaffen sein, dass das Messsystem, die übrigen Bauteile und die Probe selbst nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

3.2.3 Sterilität und Sterilisierbarkeit

Das Innere des Inkubationssystems, das über das Nährmedium in direktem Kontakt mit der inkubierenden Probe steht, muss für den Inkubationsbetrieb steril sein. Dies setzt zum einen voraus, dass das System nach außen abgeschlossen ist, um ein Eindringen von Kontaminationsquellen zu unterbinden. Zum anderen müssen die Bauteile, die in Kontakt mit dem Medium und der Probe stehen, entweder steril verfügbar oder sterilisierbar sein. Bestenfalls ist als Sterilisationsverfahren auf die Standardmethode der Dampfsterilisation bei 121 °C und einem Druck von 2 bar für die Dauer von 20 min zurückzugreifen. Dies setzt entsprechende Materialeigenschaften der verwendeten Bauteile voraus. Alternativ zur Dampfsterilisation kann die Sterilisation mit 70 % Ethanol erfolgen. Für die Komponenten, die für den dauerhaften Gebrauch ausgelegt sind, ist die Möglichkeit einer wiederholten Sterilisation unumgänglich.

3.2.4 Biokompatibilität verwendeter Materialien

Abhängig vom jeweiligen Anwendungsgebiet und Sachverhalt haben sich für die Biokompatibilität verschiedene Definitionen und Normen etabliert. Im Allgemeinen beschreibt sie die Materialeigenschaft, keine toxische oder schädliche Wirkung auf ein biologisches System auszuüben. [23]

Die Biokompatibilität der eingesetzten Werkstoffe, die in Kontakt mit der Probe stehen, ist essenziell für das Herstellen optimaler Inkubationsbedingungen. Die Materialien sollten für biologische Systeme prinzipiell verträglich sein, um Zytotoxizität zu vermeiden.

4 Entwicklung und Umsetzung der Inkubationsprobenkammer

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Entwicklung und Umsetzung der Inkubationsprobenkammer unter Berücksichtigung der im vorherigen Kapitel 3 dargelegten Anforderungsspezifikationen technischer und biologischer Art. Dabei wird in Abschnitt 4.1 zunächst das allgemeine Konzept des Aufbaus vorgestellt. Abschnitt 4.2 thematisiert die Realisierung der Proben- und Rotationseinheit mit ihren einzelnen Komponenten. Daran anknüpfend werden in Abschnitt 4.3 Fixierungsmöglichkeiten der Probe beschrieben. In den folgenden Abschnitten 4.4 und 4.5 wird zum einen ein geschlossenes Immersionssystem und zum anderen ein offenes Immersionssystem erläutert. Die Beschreibung des Heizsystems und der Systemsteuerung erfolgt in Abschnitt 4.6 und 4.7. Das Kapitel der Entwicklung und Umsetzung abschließend wird in Abschnitt 4.8 die Integration des Systems in den SLOT-Aufbau dargelegt.

Alle für die Entwicklung der Inkubationsprobenkammer nötigen Konstruktionen wurden mit der 3D-CAD-Konstruktionssoftware SolidWorks 2014 (Dassault Systèmes SolidWorks Corporation, USA) erstellt.

4.1 Konzept des Systems

Mit der Realisierung der Inkubationsprobenkammer wird ein neues Konzept für die Proben- und Rotationseinheit umgesetzt, das im Jahr 2014 von Dr. Raoul-Amadeus Lorbeer, Dr. Marko Heidrich, Dr. Heiko Meyer, Dr. Heinrich Spiecker [17] erfunden und vom Laser Zentrum Hannover e.V. patentiert wurde. Dabei erfolgt die Probenhalterung nicht mehr von oben, sodass die Probe in der Küvette hängt, sondern die Probe sitzt nun aufrecht auf einem drehbar gelagerten Sockel. Der Sockel greift von unten in eine umgekehrte, das heißt eine nach unten offene Küvette, die Immersionsflüssigkeit aufnehmen kann und einen optischen Zugang zur Probe gewährt. Darüber hinaus steht der Sockel in fester Verbindung mit einer Schale, die auf einem Teller sitzt. Der Rotationsantrieb erfolgt im Gegensatz zum herkömmlichen SLOT-Aufbau von unten, sodass die Drehbewegung der dynamischen Komponenten durch die mechanische Verbindung auf die Probe übertragen wird. Die Küvette wird, entkoppelt von den rotierenden Bauteilen, an einer ortsfesten Adaptervorrichtung - dem Basishalter - in einem Abstand von wenigen Millimetern zur Schale befestigt. Die Abdichtung zwischen dynamischen und statischen Bauteilen wird durch die Immersionsflüssigkeit in der Schale generiert, sodass keine weitere Dichtung nötig ist. Das eingeschlossene Gas in der Küvette stellt zusammen mit der Immersionsflüssigkeit ein ge-

schlossenes System dar. Das Küvetteninnere und die Flüssigkeit in der Schale sind über Schläuche an ein luftdicht abgeschlossenes Flüssigkeitsreservoir gekoppelt. Die Füllstände der Flüssigkeit in der Küvette und im Reservoir sind im Gleichgewicht miteinander und gleichen daher jegliche Höhendifferenz und damit verbundene Druckdifferenz aus. Das Füllen und Leeren der Küvette wird folglich über die Höhenänderung des Flüssigkeitsreservoirs realisiert. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

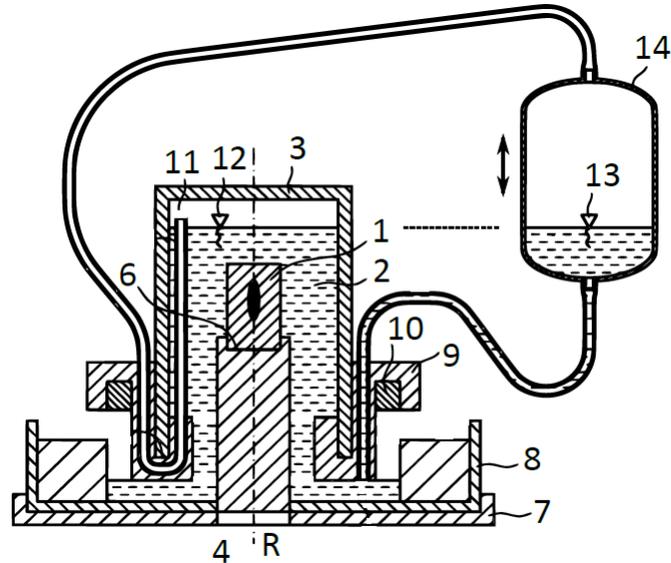


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des neuen Konzepts für die Proben- und Rotationseinheit in der Querschnittsansicht (nach [7]). Die eingebettete Probe (1) befindet sich innerhalb der Immersionsflüssigkeit (2), die von der nach unten offenen, rechteckigen Küvette (3) aufgenommen wird. Die Probenrotation liegt auf der vertikalen Rotationsachse R, wobei der Rotationsantrieb von unten (4) erfolgt. Die Probe ist auf einem Sockel (6) platziert, der auf einem Teller (7) in fester Verbindung mit einer Schale (8) steht. Die Küvette wird über eine ortsfeste Adaptervorrichtung (9) im geringen Abstand zur Schale gehalten, wobei der Adapter selbst über eine Gabel (10) befestigt ist. Die Immersionsflüssigkeit in der Schale dichtet die nach unten offene Küvette ab, sodass keine aufwendigen Dichtungen benötigt werden. Das eingeschlossene Gas (11) innerhalb der Küvette bildet zusammen mit der Flüssigkeit ein geschlossenes System, wodurch sich die Füllstände (12, 13) in der Küvette und im Flüssigkeitsreservoir (14) angleichen. Das Reservoir ist höhenverstellbar gelagert, um die Küvette zu befüllen und zu entleeren.

Zur Bildaufnahme nach dem SLOT-Prinzip, ist die Umsetzung des Konzepts für die Proben- und Rotationseinheit mit dem beschriebenen, geschlossenen Immersionssystem ausreichend. Um diese Probenkammer allerdings als Inkubationsprobenkammer nutzen zu können, werden einige Erweiterungen vorgenommen, die eine Probeninkubation ermöglichen. Die notwendige Austauschmöglichkeit von Flüssigkeit und Gas fordert im Ge-

gensatz zum geschlossenen System ein offenes Immersionssystem, bei dem ein Zu- und Abfluss umgesetzt ist. Da das offene System dieses gerichteten Flüssigkeitsflusses bedarf, folgt eine Füllstandsänderung des Flüssigkeitsreservoirs während der Inkubation, wodurch die Füllhöhe der Flüssigkeit in der Küvette nicht mehr konstant bleibt. Ein kontinuierliches Anpassen der Reservoirhöhe ist nur bedingt sinnvoll, da der geforderte Gasaustausch ebenfalls Einfluss auf das Druckgleichgewicht nimmt. Daher werden für das offene Immersionssystem Pumpen eingesetzt, die Immersionsflüssigkeit und Gas innerhalb der Küvette bereitstellen und austauschen.

Zum kontrollierten, bedarfsgerechten Nachfüllen der Immersionsflüssigkeit in die Schale, sodass die Küvettenunterseite abgedichtet bleibt, aber gleichzeitig ein Überlaufen der Flüssigkeit in die Schale unterbunden wird, kommt ein Nachfüllprinzip zur Anwendung, das beispielsweise von Vogeltränken bekannt ist.

Abbildung 4.2 zeigt vier schematisch dargestellte Varianten des Funktionsprinzips zum kontrollierten und bedarfsgerechten Nachfüllen der Immersionsflüssigkeit aus einem Reservoir in die Schale der Proben- und Rotationseinheit. Dabei verdeutlicht Schema A das allgemeine Funktionsprinzip am anschaulichsten. Die optimierte und kompakte Nachfüllvariante in Schema D ist für die Anwendung in der Inkubationsprobenkammer umgesetzt. Die Darstellungen B und C demonstrieren theoretische Zwischenschritte in der Entwicklung hin zur optimierten Variante D und sollen zum Verständnis des Prinzips beitragen. Die Proben- und Rotationseinheit ist derart konzipiert, dass sowohl die Verwendung als Probenkammer mit dem geschlossenen Immersionssystem als auch als Inkubationsprobenkammer mit dem offenen Immersionssystem möglich ist. Ferner sind im Hinblick auf die eingesetzten Materialien die beiden Aspekte der Sterilisierbarkeit und Biokompatibilität der Bauteile bei der Entwicklung berücksichtigt. Einige für das Immersionssystem verwendete Komponenten stammen aus dem medizinischen Bereich, da diese bereits auf Biokompatibilität und Sterilität ausgelegt sind und darüber hinaus vielfach über genormte Systeme, wie das Luer-Lock-Verbindungssystem, verfügen.

Zur Temperaturregelung der Probenumgebung bei der Inkubation steht außerdem ein angepasstes Heizsystem zur Verfügung. Die Steuerung und Automatisierung des Immersionssystems, die für die Funktionalität der Inkubationsprobenkammer unerlässlich sind, werden über Mikrocontroller-Boards gewährleistet.

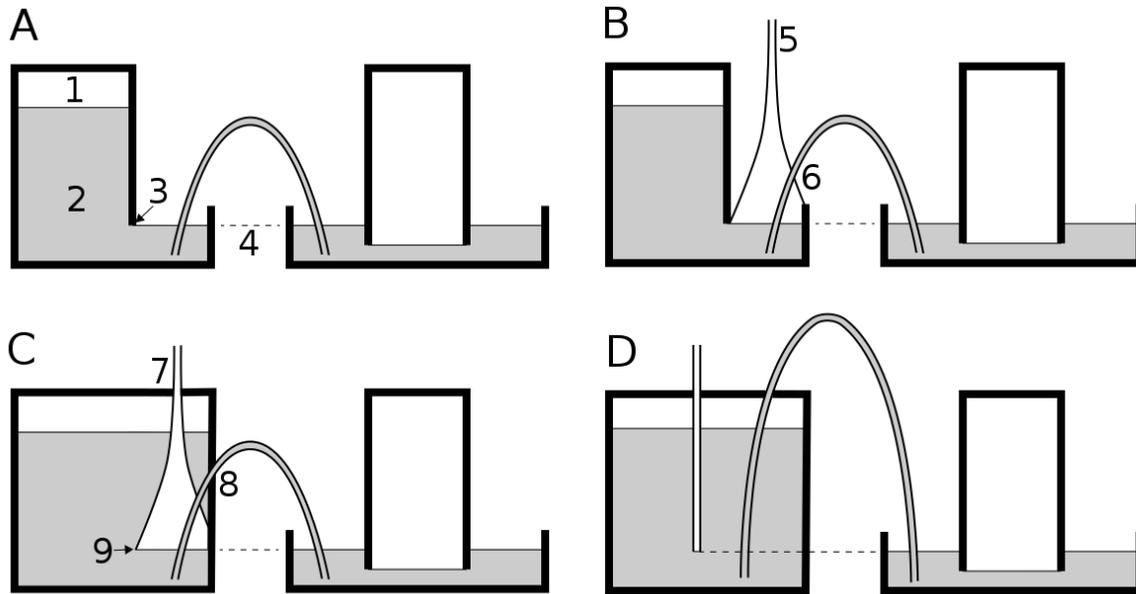


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips zum kontrollierten und bedarfsgerechten Nachfüllen der Immersionsflüssigkeit aus einem Reservoir (jeweils links) in die Schale der Proben- und Rotationseinheit (jeweils rechts). Beide sind über einen Flüssigkeit führenden Schlauch miteinander verbunden. A: Das Reservoir ist nicht verformbar und besteht aus einem Behälter mit einem anliegenden Becken, das nach außen offen ist. Innerhalb des Reservoirs befinden sich ein bestimmtes Volumen Luft (1) und Flüssigkeit (2), die zusätzlich das Becken bis zur Höhe der Behälterkante (3) füllt. Wird Flüssigkeit aus dem Becken entfernt, strömt so lange Luft an der offenen Kante vorbei in das Behälterinnere, bis der Zugang durch von innen nachströmende Flüssigkeit verschlossen wird. Dadurch wird der Füllstand im Becken konstant gehalten. Die Koppelung mit der Schale führt dazu, dass sich die Flüssigkeit im Becken und der Schale im Druckgleichgewicht befinden und sich die Füllstände (4) angleichen. B: Im Vergleich zu A besteht für das Becken nur noch ein schmaler Zugang über ein Rohr (5) nach außen, sodass weiterhin der Umgebungsdruck auf die Flüssigkeit im Becken wirkt. Der koppelnde Schlauch führt abgedichtet durch das Luftrohr (6). C: Das Becken entfällt und stattdessen führt das Luftrohr (7), ebenso wie der verbindende Schlauch (8), abgedichtet durch das Innere des vergrößerten Reservoirs nach außen. Die Behälterkante, die die Füllhöhe bestimmt hat, ist durch die Kante des Rohrs (9) ersetzt. D: Das Luftrohr weist eine kompaktere Form im Gegensatz zu C auf. Beide abgedichteten Ausgänge liegen an der Oberseite des Reservoirs. Das ursprüngliche Funktionsprinzip bleibt trotz aller Geometrieänderungen erhalten. Die optimierte Nachfüllvariante D ist im Folgenden für die Inkubationsprobenkammer umgesetzt.

4.2 Proben- und Rotationseinheit

Die Proben- und Rotationseinheit ist eine Schlüsselkomponente bei der Entwicklung und Umsetzung der Inkubationsprobenkammer. Einerseits muss sie den technischen Anforderungen (vgl. Abschnitt 3.1) gerecht werden, die durch das Prinzip von SLOT gestellt werden. Andererseits - bei Untersuchungen lebender Proben - unterliegt diese Einheit den biologischen Spezifikationen (vgl. Abschnitt 3.2). Funktion der Proben- und Rotationseinheit ist es, die eingebettete Probe zu halten, ihre Rotation im Strahlengang des Lasers zu ermöglichen und Zugänge für die Immersionssysteme zur Verfügung zu stellen. Im Anhang A.1.1 befindet sich eine Liste aller Komponenten, die im Aufbau der Proben- und Rotationseinheit zur Anwendung kommen.

4.2.1 Sockel und Schale

Um eine Halterung von unterhalb der eingebetteten Probe zu schaffen, wird eine feste Oberfläche benötigt, auf der die Probe aufrecht platziert werden kann. Diese Oberfläche wird durch den Querschnitt eines Rundstabs realisiert, der als Sockel dient und die Probe auf der optischen Achse des Messaufbaus hält. Der Sockel selbst ist über eine Klebeverbindung zentrisch innerhalb einer Schale fixiert. Eine schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Komponenten und ein Foto von Sockel und Schale ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Die notwendige Rotation der Probe erfolgt über die Drehung der Schale.

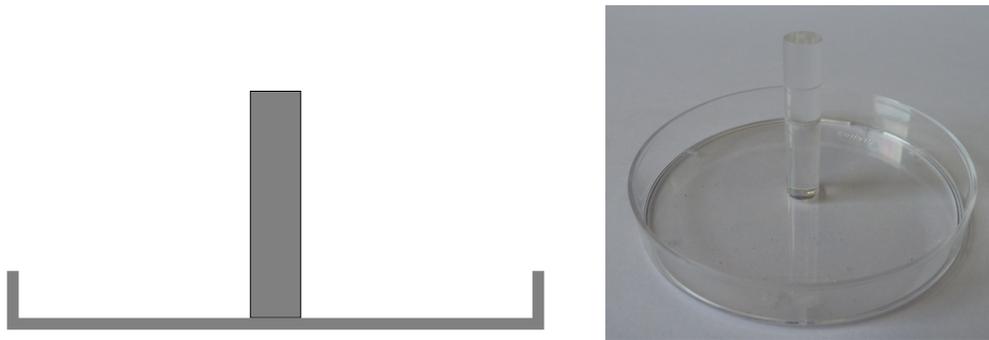


Abbildung 4.3: Sockel und Schale: Schematische Darstellung des Querschnitts (links) und Foto (rechts). Der Sockel ist zentrisch innerhalb der Schale platziert.

Neben der Probenhalterung kann der Sockel auch als Lichtleiter fungieren. Er sammelt das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht und leitet es nach unten, wobei es über Linsen und Spiegel auf einem Detektor abgebildet werden kann. Der Effekt des Lichtleitens basiert auf dem Prinzip der Totalreflexion. Dabei wird das Licht unter einem flachen Winkel an der Mantelfläche des Stabes vollständig reflektiert und verbleibt im Stab. Voraussetzung

hierfür ist, dass der Sockel aus einem nicht-absorbierenden Material besteht und einen höheren Brechungsindex als das ihn umgebende Medium aufweist. Außerdem ist für die Lichtleitung wichtig, dass der Stab optisch an die Schale gekoppelt wird. Dies kann über die Verwendung eines optisch transparenten Klebstoffes erreicht werden.

Die Komponenten Sockel und Schale sind als Einwegprobenhalter konzipiert. Dies bedeutet, dass für jede Probe ein neuer Sockel in einer neuen Schale zur Verfügung steht.

Die Sockel für den Aufbau wurden aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas) gefertigt. Sie wurden in der Mechanischen Werkstatt am Laser Zentrum Hannover e.V. aus einem Rundstab mit einem Durchmesser von 6 mm auf eine Länge von 29 mm zugeschnitten. Die Konstruktionszeichnung dazu, die von Moritz Hitzemann (B.Sc.) im Rahmen seiner Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Laser Zentrum Hannover e.V. angefertigt wurde, befindet sich im Anhang A.2.1. Das Material hat einen Brechungsindex von 1,492 und bietet einen hohen Transmissionsgrad im sichtbaren Spektralbereich und im nahen Infrarotbereich. Damit ist es prinzipiell als Lichtleiter geeignet. Die Fertigung der Sockel aus Kunststoff bietet außerdem die Möglichkeit zur einfacheren Modifikation des Stabkopfes für eine optimale Befestigung der jeweiligen Probe. Darüber hinaus ist PMMA kostengünstig und leicht verfügbar.

Als Schale wurden Petrischalendeckel (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) verwendet. Sie bestehen aus Polystyrol (PS) und haben einen Durchmesser von 57 mm sowie eine Höhe von 9 mm. Der äußere Boden der Schale weist einen nicht ganz geschlossenen Ring als Standfuß auf. Sowohl PMMA als auch PS sind aufgrund ihrer thermischen Eigenschaften nicht für die Dampfsterilisation im Autoklaven geeignet. Ein Sterilisieren mit 70 % Ethanol ist allerdings problemlos möglich. Beide Materialien finden auch im Bereich der Zellbiologie Anwendung und gelten als biokompatibel.

Um den Sockel exakt in der Schalenmitte zu befestigen, wird eine Klebehilfe verwendet. Sie besteht aus einem massiven Edelstahlzylinder mit einer Höhe von 20 mm und einem passenden Durchgangsloch für den Rundstab. Der Zylinder passt exakt in den Petrischalendeckel und gibt so die zentrische Position in der Schale vor. Auf der Unterseite der Klebehilfe befindet sich eine flache, mittige Aussparung, damit sie nicht versehentlich durch überschüssigen Klebstoff der Klebeverbindung am Sockel oder an der Schale fixiert wird. Die Verwendung von Edelstahl (Werkstoffnummer 1.4401) hat den Vorteil, dass er einen anderen thermischen Ausdehnungskoeffizienten sowie eine bessere chemische Beständigkeit als Klebstoff aufweist, wodurch Klebereste leicht vom Zylinder entfernt werden können. Die Klebehilfe wurde in der Mechanischen Werkstatt nach einer Konstruktionszeichnung (vgl. Anhang A.2.2), die von Moritz Hitzemann erstellt wurde, gefertigt.

4.2.2 Rotationsmotor und -teller

Der Rotationsmotor hat die Aufgabe, die Schale und damit die Probe präzise um eine feste Rotationsachse zu drehen. Für den Aufbau kommt der Motor DGM60-ARAK (Oriental Motor, Japan) zum Einsatz (vgl. Abb. 4.4, links). Er verfügt über einen hohlen Drehantrieb, sodass die tischartige Oberfläche, die eine mittige Öffnung besitzt, in eine Drehbewegung versetzt wird. Bei maximaler Motorgeschwindigkeit wird eine Umdrehung in 0,3 s durchgeführt. Die Steuerung und Stromversorgung erfolgt über eine Controller-Einheit, welche mit dem Computer verbunden ist. Die Steuerungssoftware wurde in die vorhandene SLOT-Software eingebunden.

Der Rotationsmotor zeichnet sich durch eine hohe Positionsaufösung aus, was essenziell für die Bildgebung nach dem SLOT-Prinzip ist. Die Übertragungsgenauigkeit des Winkels beträgt $0,067^\circ$ und die wiederholbare Positioniergenauigkeit liegt bei $0,004^\circ$. Das durch den hohlen Antrieb vorliegende Durchgangsloch ermöglicht die Weiterleitung und Detektion von Emissionslicht nach unten.

Die mechanische Stabilität der Rotationsachse selbst und der Probe bezüglich der Rotationsachse ist zur Vermeidung von Artefakten besonders wichtig (vgl. Abschnitt 3.1.2). Durch die Platzierung des Motors unterhalb der Probe liegt der Schwerpunkt der Rotationseinheit tiefer als beim herkömmlichen SLOT, was das System weniger anfällig für Schwingung macht. Außerdem ist die Distanz zwischen Probe und Motor geringer, wodurch die mechanische Stabilität der Probe auf der Rotationsachse zusätzlich erhöht wird. Damit die Probe um eine feste, definierte Achse gedreht werden kann, bedarf es einer zentrischen Fixierung der Schale auf dem Rotationstisch. Der hierfür verwendete Adapter - der Rotationsteller - ist als maßgefertigtes Bauteil an beide Komponenten optimal angepasst (vgl. Abb. 4.4, rechts). Ein nachträgliches Justieren der Probe auf der vom Motor festgelegten Rotationsachse ist nicht möglich.

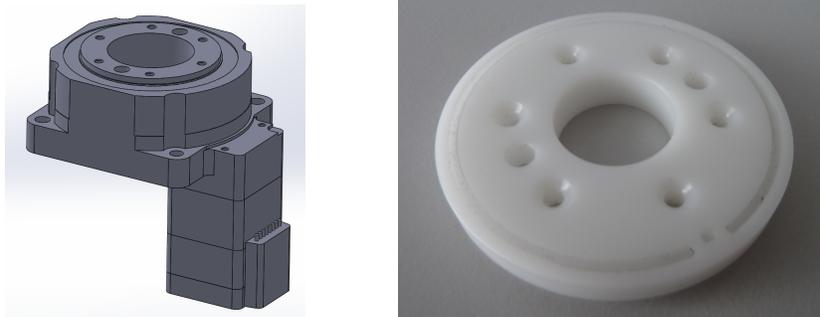


Abbildung 4.4: Darstellung des Rotationsmotors (links, SolidWorks) und Foto des Rotationstellers (rechts), der als passgenauer Adapter zwischen Motor und Schale dient.

Mit einem hohlen Schaft an der Unterseite passt der Teller ohne merkliches Spiel in das Durchgangsloch des Rotationsmotors. Darüber hinaus verfügt der flache Teller über sechs Senkkopfbohrungen, sodass er über Senkkopfschrauben (M 3) mit dem Rotationstisch, der die entsprechenden Gewindebohrungen aufweist, verbunden werden kann. Zwei weitere Durchgangsbohrungen mit einem Durchmesser von 5 mm, die exakt über zwei Öffnungen der gleichen Maße auf dem Rotationstisch liegen, bieten ergänzende Fixierungsmöglichkeiten. Damit ist eine feste Verbindung von Motor und Adapter sichergestellt.

Um das Auswechseln der Schale samt Probe zu simplifizieren, liegt die Schale lediglich auf dem Teller auf. Allerdings bietet der Adapter eine Negativform des Profils des Schalenbodens. Durch die asymmetrische, nicht ganz geschlossene, ringförmige Nut ist eine exakte und eindeutige Platzierung der Schale auf dem Teller gewährleistet. Neben der Stabilität bietet dies den Vorteil, dass die zu untersuchende Probe für wiederholte Messungen nahezu identisch positioniert werden kann.

Der Rotationsteller wurde in der Mechanischen Werkstatt am Laser Zentrum Hannover e.V. gefertigt. Die Konstruktionszeichnung ist im Anhang A.2.3 zu finden. Der Teller wurde aus Polyoxymethylen (POM) hergestellt, das eine hohe Festigkeit und gute mechanische Eigenschaften aufweist. Dieser Werkstoff ist ein kostengünstiger, leicht zu verarbeitender Kunststoff, der vielfach auch für technische Anwendungen eingesetzt wird.

4.2.3 Basishalter mit Küvette

Der Basishalter inklusive der Küvette stellt den ortsfesten, statischen Teil der Proben- und Rotationseinheit dar. Er ist eine Adaptervorrichtung, die die invertierte Küvette fixiert, im Strahlengang platziert und eine Probenimmersion ermöglicht. Abbildung 4.5 zeigt eine schematische Darstellung des Basishalters mit Küvette im Querschnitt und ein Foto der beiden Komponenten.

Für den Aufbau kommt eine Standard-Rechteck-Küvette (Starna GmbH, Deutschland) zum Einsatz. Sie ist 45 mm hoch, 22,5 mm breit, 12,5 mm tief und besteht aus 1,25 mm dickem, optischem Glas, was für Licht der Wellenlängen von 334 nm bis 2500 nm durchlässig ist. Außerdem ist die Glasküvette autoklavierbar und biokompatibel.

Der Basishalter gibt eine Vertiefung zur Platzierung der umgekehrten Küvette vor, wobei die größeren Küvettenseiten als Ein- und Austrittsfenster für das Laserlicht dienen. Mittig unterhalb der Küvette befindet sich eine zylindrische Öffnung im Basishalter mit einem Durchmesser von 8 mm, durch die der Sockel samt Probe geführt wird. Zwei weitere benachbarte Bohrungen mit einem Durchmesser von 3 mm münden ebenfalls in der Küvette und ermöglichen das Durchführen eines dünnen Schlauches.

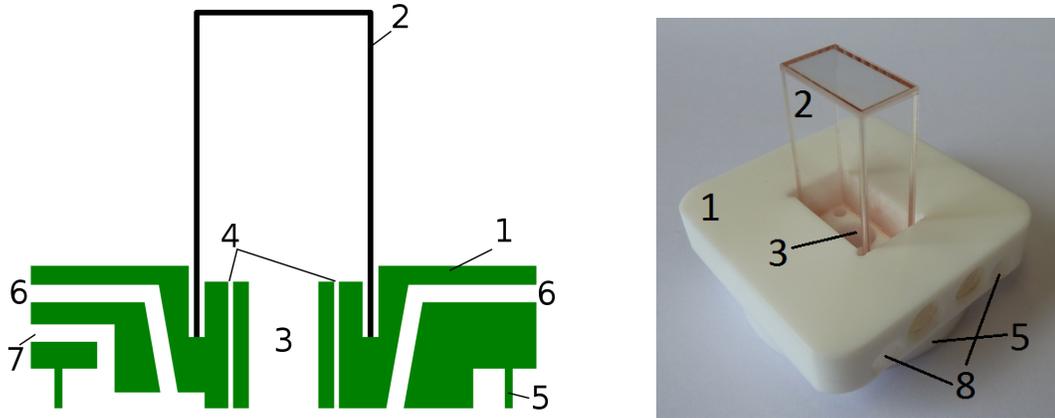


Abbildung 4.5: Basishalter mit Küvette: Schematische Darstellung des Querschnitts (links) und Foto (rechts). Der Basishalter (1) dient als Vorrichtung, die invertierte Küvette (2) im Strahlengang des Lasers zu halten. Die zentrale, zylindrische Öffnung (3) im Basishalter dient als Durchgangsloch für den Sockel. Parallel dazu liegen zwei schmale Durchgangsbohrungen (4), die den Zugang von der Halterunterseite in die Küvette ermöglichen. Der obere Teil des Halters ist quadratisch, während an der runden Unterseite eine ringförmige Nut (5) vorgesehen ist. Zwei symmetrische Zugänge (6) verbinden die Stirnseiten des Halters mit der runden Halterunterseite und ermöglichen so die Probenimmersion. Ein weiterer Zugang steht als Ausgleichsöffnung (7) zur Verfügung. Zwei weitere Durchgangslöcher (8) dienen zur Befestigung des Halters mithilfe einer Gabel.

Der quadratische Halter hat insgesamt eine Seitenlänge von 55 mm und eine Höhe von 20 mm. Der untere Teil des Halters ist mit einer ringförmigen Nut ausgestattet, um in das Innere der runden Schale zu greifen. Der Ring hat einen äußeren Durchmesser von 52 mm und entspricht im Querschnitt einem schmalen Rechteck von 8 mm Höhe und 2 mm Breite. An den zwei gegenüberliegenden Stirnseiten des oberen Halterteils, die parallel zum Strahlengang ausgerichtet sind, stehen verschiedene Öffnungen bereit. Auf jeder Seite befindet sich ein Zugang, der jeweils die Stirnseite mit der Halterunterseite verbindet. Zusätzlich befindet sich an einer Seite eine weitere Öffnung, die Ausgleichsöffnung, die anstelle der schrägen Bohrung einen rechtwinkligen Durchgang zur Halterunterseite besitzt. Alle drei Zugänge sind an der Stirnseite mit einem Feingewinde (M 8 x 0,75) ausgestattet, sodass entsprechende Anschlüsse direkt mit dem Halter verschraubt werden können. Neben diesen Zugängen ins Ringinnere, gibt es zwei horizontal ausgerichtete Durchgangslöcher mit einem Durchmesser von 6,1 mm, die die beiden erwähnten Stirnseiten miteinander verbinden. Diese Durchgangslöcher sind für eine Gabel zur entkoppelten Fixierung des Basishalters von den rotierenden Komponenten vorgesehen.

Die Konstruktion des Basishalters wurde von Moritz Hitzemann durchgeführt. Anhand der Konstruktionszeichnung (vgl. Anhang A.2.4) wurde der Halter in der Mechanischen Werkstatt am Laser Zentrum Hannover e.V. hergestellt.

Als Werkstoff wurde Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) verwendet, da es aufgrund der geringen Oberflächenspannung eine antiadhäsive Oberfläche besitzt. Außerdem verfügt der Fluorkunststoff über eine hohe chemische Beständigkeit, was sich auch in seiner Langlebigkeit widerspiegelt. Diese Eigenschaften sorgen ebenfalls für die geforderte Biokompatibilität des verwendeten Materials und lassen ihn unter anderem auch in der Medizin bei Implantaten Anwendung finden. Außerdem ist PTFE ein thermisch äußerst stabiles Polymer, wodurch es für die wiederholte Dampfsterilisation im Autoklaven geeignet ist. Um die Glasküvette zu fixieren, wurde ein Klebewachs aus der Dentalbranche (gebdi DENTAL-PRODUCTS GmbH, Deutschland) eingesetzt. Der rosa Klebewachs ist für das Kleben von Kunststoffen geeignet und biologisch unbedenklich. Bei Raumtemperatur ist der Wachs fest und beginnt ab etwa 80 °C zu schmelzen. Somit bietet es sich an, den festen Klebewachs portioniert in die Vertiefung des Basishalters unter den Küvettenrand zu bringen, um dann ein Verschmelzen der beiden Komponenten durch die Dampfsterilisation im Autoklaven zu bewirken.

4.2.4 Kontaminationsbarriere der Proben- und Rotationseinheit

Sofern der Basishalter berührungslos über der Schale befestigt ist, besteht ein Austausch der Immersionsflüssigkeit mit der umgebenden Raumluft. Um diese Kontaminationsquelle bei Messungen lebender Proben zu verhindern, wird ein Barrierering in die Schale eingesetzt, der mit einem Barrieremedium gefüllt wird und so das System von der Raumluft abschirmt.

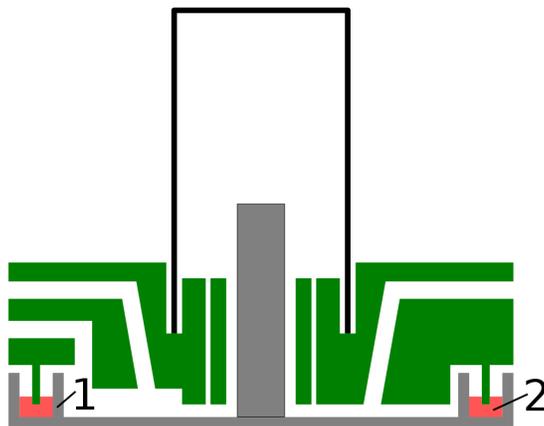


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Kontaminationsbarriere in der Proben- und Rotationseinheit. Der Barrierering (1) liegt im Inneren der Schale und ist mit Barrieremedium (2, rot) gefüllt. Die ringförmige Nutunterseite des Basishalters greift in den Barrierering und blockiert eindringende Kontaminationen an der Schnittstelle von Schale und Halter, ohne dabei Einfluss auf die Rotation zu nehmen.

Der Ring entspricht im Querschnitt einem nach oben geöffneten Rechteck, das 7,5 mm breit und 9 mm hoch ist. Mit seinem Durchmesser passt er exakt in das Schaleninnere und die ringförmige, Nut-ähnliche Unterseite des Basishalters greift von oben berührungslos in den Barrierering. Die Füllung des Rings mit Barrieremedium blockiert das Eindringen von Kontaminationen in das System ohne sich auf die Rotation auszuwirken. Eine schematische Darstellung der Kontaminationsbarriere im System ist in Abbildung 4.6 gezeigt.

Der Barrierering wurde nach der Konstruktionszeichnung (vgl. Anhang A.2.5) von Moritz Hitzemann in der Mechanischen Werkstatt am Laser Zentrum Hannover e.V. gefertigt. Hergestellt wurde der Ring aus PTFE. Die Vorteile dieses Polymers sind in Abschnitt 4.2.3 bereits erläutert.

An das Barrieremedium werden hohe Anforderungen gestellt. Es sollte chemisch inert sein und nicht ausgasen, damit die Substanz nicht in die Immersionsflüssigkeit gelangt. Außerdem sollte es hydrophob sein und kein Wasser aufnehmen, da dies wiederum eine Brücke für Kontaminationen schlagen könnte. Darüber hinaus ist ein nicht toxisches Medium von Vorteil, das mit PTFE kompatibel ist. All diese Eigenschaften erfüllt Silikonöl. Für den Aufbau wird das Silikonöl AP 150 Wacker (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) verwendet.

4.3 Fixierung der Probe

Die Fixierung, das heißt die Halterung der Probe ist aus unterschiedlichen Gründen relevant (vgl. Abschnitt 3.1) und kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Für die Halterung der Proben in diesem System wurde ein 2%-Agarosegel eingesetzt, das auf Wasser basiert. Damit liegt der Brechungsindex des Gels bei etwa 1,33 und es ist optisch transparent. Agarose ist ein Polysaccharid, das, gelöst in Flüssigkeit, bei Raumtemperatur aufgrund von nichtkovalenten Bindungen der Polymere eine feste Struktur bildet. Durch Erwärmen können die Bindungen reversibel aufgelöst werden und die Agaroselösung wird flüssig. Die verwendete Agarose (Low Melting, Biozym Plaque GP Agarose, Biozym Scientific GmbH, Deutschland) geliert ab einer Temperatur von 26 °C bis 30 °C. Das Protokoll zur Herstellung des Agarosegels befindet sich im Anhang A.3.1.

4.3.1 Einbettung im Agarosezylinder

Eine Möglichkeit der Probenfixierung stellt das Einbetten der Probe in einem Agarosezylinder dar. Dafür wird die Probe zu der noch flüssigen Agaroselösung gegeben und mittels einer Pipettierhilfe samt Agaroselösung in eine Glaskapillare (IntraMark, BRAND GMBH + CO KG, Deutschland) gezogen. Die Kapillare hat ein Volumen von 200 µl und einen Innendurchmesser von 1,6 mm. Die Enden der Kapillare werden mit Parafilm abgedichtet und zum Abkühlen der Agarose wird die Kapillare bei 4 °C gelagert, wodurch die Probe in ihrer Position fixiert wird. Nach Entfernen des Parafilms gleitet der feste Agarosezylinder aus der Kapillare heraus und wird mit einem Skalpell auf eine maximale Länge von etwa 2 mm zugeschnitten. Sowohl im Hinblick auf die mechanische Stabilität des Agarosezylinders als auch im Hinblick auf die Probengröße sollte diese Länge nicht überschritten werden. Um eine definierte Drehung der Probe um eine feste Achse zu ermöglichen, wird der Agarosezylinder zentrisch auf die Rotationsachse, die auf dem Sockel der Proben- und Rotationseinheit zum Liegen kommt, geklebt. Für die Klebeverbindung kommt ein schnell aushärtender Cyanacrylat-Klebstoff (Sekundenkleber) zum Einsatz. Es ist wichtig, nur die minimal notwendige Menge des Klebstoffs zu verwenden, da er andernfalls am Zylinder entlang kriecht und in den Bildaufnahmen mit SLOT sichtbar wird. Die feine Dosierung des Klebstoffs erfolgt über eine Pipettenspitze. Zur Vermeidung der Austrocknung des Agarosezylinders wird der Sockel mit Immersionsflüssigkeit benetzt.

Diese Methode der Probenfixierung ist besonders geeignet, um nicht mehr lebendige Proben in SLOT zu untersuchen, da eine Nährstoffversorgung der Probe auf diese Weise nicht gewährleistet ist.

4.3.2 Halterung im Agarosetopf

Um Proben für die Inkubation zu fixieren, wird die Halterung im Agarosetopf verwendet. Dadurch, dass der Topf nach oben geöffnet ist, wird der Austausch der Probe mit dem Nährmedium verbessert. Allerdings ist diese Art der Probenfixierung nur für sedimentierende Proben, das heißt für Proben mit einer höheren Dichte als das umgebende Medium, geeignet.

Bei der Halterung im Agarosetopf ist keine Klebeverbindung zur Verknüpfung der Agarose mit dem Sockel vorgesehen. Stattdessen kommt ein modifizierter Sockel zum Einsatz, der eine 10 mm tiefe und 4 mm breite Bohrung in Längsrichtung aufweist. Der Rundstab wird mit Alufolie umwickelt, sodass die Folie eine etwa 8 mm lange Verlängerung des Sockels über die modifizierte Seite hinaus bildet. Flüssige Agaroselösung wird bläschenfrei in die Bohrung und in die mit Alufolie verlängerte Stabform gegeben. Von oben wird in die Agarose ein Stopfen mit einer variablen Form als Negativ zentrisch platziert. Um einen kegelförmigen Topf zu erhalten, wird das Ende einer Kunststoff-Schraube verwendet. Nach dem Auskühlen des Agarosegels werden Stopfen und Alufolie entfernt. Der bleibende Agarosetopf ist fest mit dem Sockel verbunden und wird mit der Probe samt Medium gefüllt. Ein Schema des Agarosetopfes in Verbindung mit dem Sockelkopf ist in Abbildung 4.7 zu sehen. Bei der Herstellung des Topfes ist es wichtig, dass die Agaroselösung keine Luftbläschen enthält, da diese zur Brechung des Lichts führen. Es besteht die Möglichkeit, einen sterilen Agarosetopf zu generieren, indem alle verwendeten Komponenten im Vorfeld sterilisiert werden und der Topf in einem sterilen Umfeld unter der Sterilbank hergestellt wird.

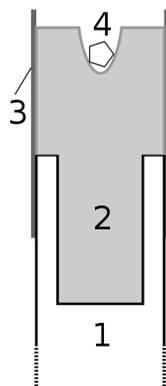


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des Agarosetopfes im Querschnitt. Der Sockelkopf (1) ist durch eine zentrische Bohrung modifiziert. Für den Herstellungsprozess des Agarosetopfes (2) wird ein Mantel aus Alufolie (3) verwendet. In der kegelförmigen Vertiefung (4), die durch ein Negativ geformt wurde, ist die Probe platziert.

4.4 Geschlossenes Immersionssystem

Das geschlossene Immersionssystem ist eine einfache Möglichkeit, die Proben- und Rotationseinheit mit Immersionsflüssigkeit zu versorgen. Dabei sieht diese Variante keinen Austausch von Medium und Gas vor, sodass es als Probenkammer für längere Inkubationszeiten ungeeignet ist (vgl. Abschnitt 3.2.1). Ein steriler Inkubationsbetrieb ist prinzipiell möglich, aber für diesen Aufbau nicht von Interesse. Daher kann die Kontaminationsbarriere für die Verwendung als Probenkammer weggelassen werden. Das entwickelte Heizsystem ist mit diesem Aufbau kompatibel. Vorteilhaft an dem geschlossenen System ist, dass es lediglich eines minimalisierten Aufbaus bedarf, um SLOT-Messungen durchzuführen. Abbildung 4.8 zeigt eine schematische Darstellung des Systems ohne Kontaminationsbarriere. Eine Liste aller Komponenten, die für den Aufbau des Immersionssystems notwendig sind, befindet sich im Anhang A.1.2.

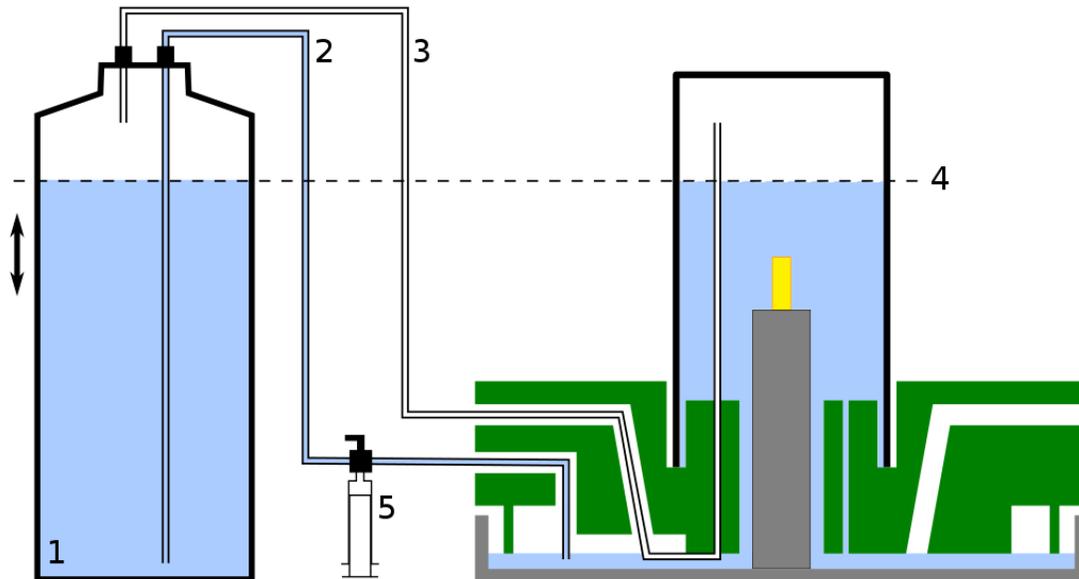


Abbildung 4.8: Schema des geschlossenen Immersionssystems (ohne Austausch von Medium oder Gas). Das Mediumreservoir (1) ist über einen Mediumschlauch (2) und einen Gasschlauch (3) mit dem Basishalter verbunden. Medium und Gas stellen dabei ein geschlossenes System dar. Im Druckgleichgewicht gleichen sich die Füllstände (4) von Küvette und Reservoir an. Die Füllhöhe in der Küvette wird durch eine Höhenänderung des Reservoirs eingestellt. Zum Starten der Immersion ist eine Befüllhilfe (5) notwendig.

Der Basishalter ist über zwei Schläuche mit einem luftdicht verschlossenen Vorratsbehälter verbunden, der mit Immersionsmedium gefüllt ist. Ein Schlauch, der Gasschlauch, reicht vom oberen Bereich des Reservoirs in den oberen Bereich der Küvette, der Gas enthält. Für die Schlauchführung ist eine der beiden Zugängen des Halters und eine klei-

ne, vertikale Durchgangsbohrung unterhalb der Küvette vorgesehen. Die andere Leitung, der Mediumschlauch, führt vom Boden des Vorratsbehälters über die Ausgleichsöffnung des Basishalters in das Schaleninnere. Um ein kompakteres System zu erhalten, ist es empfehlenswert, die zwei horizontalen Öffnungen an einer Halterseite zu belegen. Das System wird in seiner Funktion durch die Verwendung des anderen Zugangs allerdings nicht eingeschränkt.

Im befüllten Zustand erzeugen Medium und Gas ein geschlossenes System, was sich im Gleichgewicht mit dem Umgebungsdruck befindet. Eine Höhenveränderung der Komponenten ist mit einer Druckdifferenz verbunden, die vom System ausgeglichen wird. Dadurch wird ein Angleichen der Füllstände im Behälter und in der Küvette realisiert. Dies wird dazu verwendet, die gewünschte Füllhöhe in der Küvette einzustellen. Um die Proben- und Rotationseinheit zu belüften, genügt ein Absenken des Vorratsbehälters bis unterhalb der Schale.

Zum Starten der Immersion ist zunächst der trockene Flüssigkeitsschlauch zu befüllen. Mittels einer Befüllhilfe wird die Luft aus dem Schlauch gezogen und das Immersionsmedium strömt nach, da der erzeugte Unterdruck im Reservoir durch aus der Umgebung nachströmendes Gas über den Gasschlauch ausgeglichen wird. Befindet sich die Flüssigkeitsfront im Schlauch unterhalb der Füllhöhe des Vorratsbehälters, fließt das Medium im Schlauch weiter und füllt die Schale. Dieser Fluss entsteht nach dem gleichen Prinzip der Druckdifferenz. Ist die Schale bis zur Unterseite des Basishalters gefüllt, dichtet sich das System um den Sockel automatisch ab, sodass von außen kein Gas mehr nachströmt. Die Küvette füllt sich mit Immersionsflüssigkeit und ein Druckgleichgewicht stellt sich ein.

Für den Vorratsbehälter wird eine Schott-Gewindeflasche aus Duran mit einem DIN-Gewinde GL 45 verwendet. Dabei ist das Volumen des Behälters für die Funktion des Immersionssystems irrelevant. Der Schraubverschluss verfügt über zwei Zugänge, die ein Gewinde GL 14 aufweisen. Dieses Anschlussystem stellt zwei Möglichkeiten bereit, eine abgedichtete Einführung in das Reservoir zu realisieren. Der Flüssigkeitsschlauch führt durch eine Schraubkappe mit Bohrung, ähnlich einer Überwurfmutter, in der sich ein Schlaucheinsatz befindet. Der Einsatz besteht aus PTFE mit einem Silikonring in der Mitte, der beim Verschrauben der Kappe zusammengedrückt wird und so durch seine Verformung den Bereich um den durchführenden Schlauch herum vollständig abdichtet. Für den anderen Zugang kommt eine Überwurfmutter in Kombination mit einem dichtenden Septum aus Silikonkautschuk zum Einsatz. Im Septum wird als Gasrohr eine Sterican-Kanüle platziert, die über einen Durchmesser von 2,1 mm und eine Gesamtlänge von 80 mm verfügt und aus nicht rostendem Chrom-Nickelstahl besteht. Die Kanüle besitzt einen Luer-Anschluss, an dem der Gasschlauch über einen Konnektor angeschlossen wird.

Bei dem etablierten Luer-Lock-Anschlusssystem, das beispielsweise bei Infusionssystemen vorzufinden ist, werden zwei Verbindungspaare mit einer halben Umdrehung verschraubt, sodass ein Verdrillen der angeschlossenen Schläuche unterbunden wird. Eine optimale Sicherung wird durch die Verwendung von Kontermuttern gewährleistet.

Die verwendeten Silikonschläuche haben einen Außendurchmesser von 3 mm und einen Innendurchmesser von 1,5 mm. Für das Gas führende Schlauchende, das in die Küvette ragt, wird ein PTFE-Schlauch eingesetzt, der aufgrund seiner Steifigkeit besser geeignet ist. Um sein Abknicken am unteren Halterrand zu reduzieren, hat er einen kleineren Außendurchmesser von 1,6 mm. Außerhalb des Basishalters ist er mit dem Silikonschlauch verbunden. Das Flüssigkeitsreservoir ist mit seinen Anschlüssen und den Schläuchen als Gesamtes für die Dampfsterilisation im Autoklaven geeignet.

Die Befüllhilfe besteht aus einer Einmalspritze, die an einem Dreiwegehahn angeschlossen ist. Der Hahn verfügt über drei Luer-Lock-Konnektoren, die in beliebiger Kombination miteinander verbunden werden können. An den beiden weiteren Verbindungen sind die zwei Teile des Flüssigkeitsschlauchs angeschlossen. Im normalen Betrieb sind beide Schlauchteile miteinander verbunden. Lediglich zum Befüllen wird die Verbindung zum Reservoir mit der Spritze eingestellt, um den nötigen Unterdruck durch das Aufziehen der Spritze zu erzeugen.

Die eingesetzte Immersionsflüssigkeit zur SLOT-Messung richtet sich nach der zu untersuchenden Probe (vgl. Abschnitt 3.1.4).

4.5 Offenes Immersionssystem

Durch das offene Immersionssystem wird die Proben- und Rotationseinheit mit Immersionsflüssigkeit versorgt und ein Austausch von Flüssigkeit und Gas ermöglicht. Dies schafft eine grundlegende Voraussetzung für die Versorgung lebender Proben bei Langzeituntersuchungen (vgl. Abschnitt 3.2.1). Der Aufbau ähnelt dem geschlossenen Immersionssystem, das jedoch eine Erweiterung um einige zusätzliche Komponenten erfährt. Im Wesentlichen setzt sich der Aufbau für das offene Immersionssystem neben der Proben- und Rotationseinheit aus fünf Baugruppen zusammen: Druckausgleich, Gas- und Mediumzufluss sowie Gas- und Mediumabfluss (vgl. Abb. 4.9). Vom Basishalter ausgehend ist für beide Flussrichtungen ein Schlauch-in-Schlauch System vorgesehen. Dies bedeutet, dass der Gas führende Schlauch in den Mediumschlauch ein- bzw. ausgekoppelt wird und somit jeweils nur ein Zugang am Halter besetzt wird. Für die Anschlüsse am Basishalter kommen Schlauchtüllen zum Einsatz. Im Anhang A.1.2 ist eine Liste aller Komponenten des Immersionssystems zu finden.

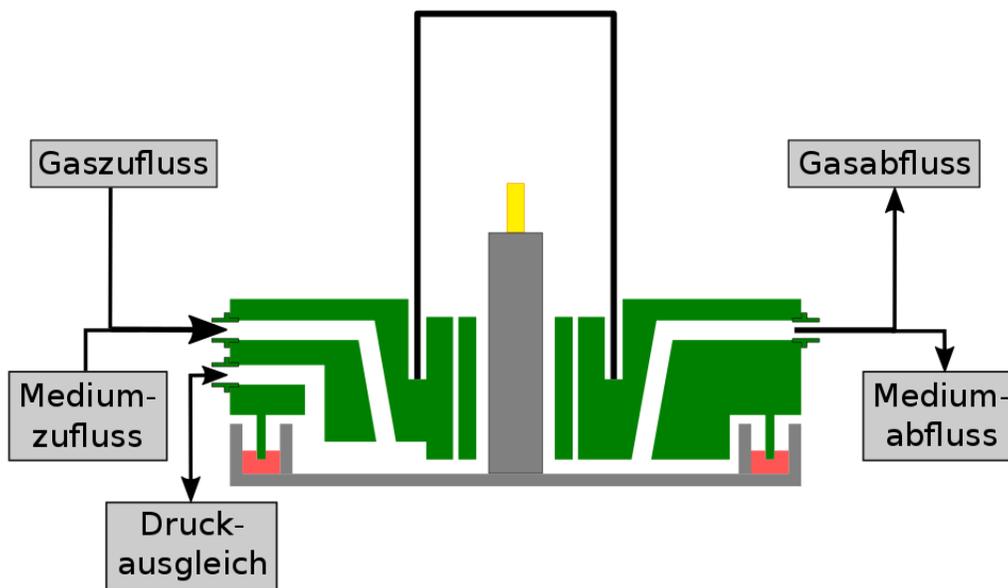


Abbildung 4.9: Übersichtsschema des offenen Immersionssystems mit Proben- und Rotationseinheit, Druckausgleich sowie Zu- und Abfluss von Medium und Gas

4.5.1 Mediumzufluss und -abfluss

Beim Mediumzufluss und -abfluss geht es darum, Immersionsflüssigkeit in der Proben- und Rotationseinheit bereitzustellen und verbrauchtes Medium auszutauschen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus mit Mediumzufluss und -abfluss ist in Abbildung 4.10

dargestellt. Das frische Medium befindet sich, ebenso wie beim geschlossenen Immersionssystem (vgl. Abschnitt 4.4) in einem nach außen verschlossenen, starren Vorratsbehälter, der lediglich über zwei abgedichtete Zugänge mit einem Flüssigkeitsschlauch und einem Luftrohr verbunden ist. Für die Anwendung ist wichtig, dass der Vorratsbehälter nicht verformbar ist. Der Flüssigkeitsschlauch befindet sich am Boden des Behälters und führt über eine Befüllhilfe zu einem Anschluss eines T-Stücks, an dem später ein Schlauch des Gaszuflusses (vgl. Abschnitt 4.5.2) eingekoppelt wird. Am Ausgang des Kopplungsstücks ist ein im Durchmesser größerer Mediumschlauch angeschlossen, der eine Verbindung mit einer Schlauchtülle des Basishalters herstellt. Das Luftrohr wird außerhalb des Reservoirs durch einen Schlauch verlängert, der ein offenes Ende aufweist. Um eine mögliche Kontamination des Systems durch die Raumluft an dieser Stelle zu verhindern, ist ein Filter vorgesehen. Das andere Ende des Luftrohrs taucht in die Immersionsflüssigkeit des Vorratsbehälters ein.

Bei der Mediumzufuhr ist entscheidend, die Füllhöhe in der Schale zu regulieren, um ein Überfließen zu verhindern und dennoch ein Abdichten der Halterunterseite mit Flüssigkeit zu realisieren. Das kontrollierte und bedarfsgerechte Nachfüllprinzip ist in Abschnitt 4.1 erläutert. Bei diesem Aufbau wird die Einstellung der Füllhöhe in der Schale durch das Luftrohrende im Medium des Reservoirs vorgenommen.

Zum erstmaligen Versorgen des Mediumschlauchs mit Flüssigkeit wird analog zum geschlossenen Immersionssystem (vgl. Abschnitt 4.4) die Befüllhilfe eingesetzt. Der durch das Befüllen erzeugte Unterdruck im Reservoir wird durch bläschenweise nachströmende Umgebungsluft durch das Luftrohr ausgeglichen. Ist das Druckgleichgewicht der Flüssigkeit in dem Reservoir und der Schale hergestellt, wirkt auf die Flüssigkeitsoberfläche sowohl am Luftrohrende als auch in der Schale nur der Umgebungsdruck. Zusätzliche Druckänderungen beispielsweise durch eine Höhenänderung des Luftrohrendes oder durch Abführen von Medium aus der Schale haben ein erneutes Angleichen der Füllstände zur Folge.

Die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, die nachströmende Umgebungsluft am schmalen Luftrohrende erfährt, ist nicht zu vernachlässigen ist, da hierdurch das System um den Gleichgewichtspunkt herum zum Stocken kommt. Dies hat zur Folge, dass ein Nachströmen von Umgebungsluft ins Reservoir und somit von Flüssigkeit in die Schale gegebenenfalls ausbleibt. Dem entgegenwirkend bietet es sich an, mit einem zusätzlichen Druckgefälle zu arbeiten. Dafür wird das Luftrohrende etwas oberhalb der gewünschten Füllhöhe der Schale platziert und das Nachströmen von Umgebungsluft in den Vorratsbehälter bei Erreichen des gewünschten Füllstands unterbunden. Die Füllhöhe in der Schale bleibt bestehen, da durch das Blockieren der Luftzufuhr kein Ausgleich der zusätzlichen Druckdifferenz mehr stattfinden kann. Das Blockieren der Zufuhr wird durch ein Quetschventil realisiert, was

den Luftschlauch vollständig abdichtet. Die Öffnung des Ventils ist im befüllten Systemzustand an den Mediumabfluss gekoppelt.

Für den Mediumabfluss ist die gegenüberliegende Öffnung des Basishalters über einen Schlauch mit einem weiteren T-Kopplungsstück verbunden, an dem der Gasabfluss ausgekoppelt wird. Von diesem Bauteil führt ein dünnerer Schlauch über eine Schlauchpumpe in einen verformbaren Abfallbeutel, in dem das verbrauchte Medium aufgefangen wird. Die Schlauchpumpe hat die Funktion, Medium dosiert abzupumpen, ohne dabei in direkten Kontakt mit der Flüssigkeit zu kommen. Um das gesammelte verbrauchte Medium von der Flüssigkeit im Schlauch zu trennen, ist im Abfallreservoir eine Phasengrenze in Form einer Tropfkammer vorgesehen.

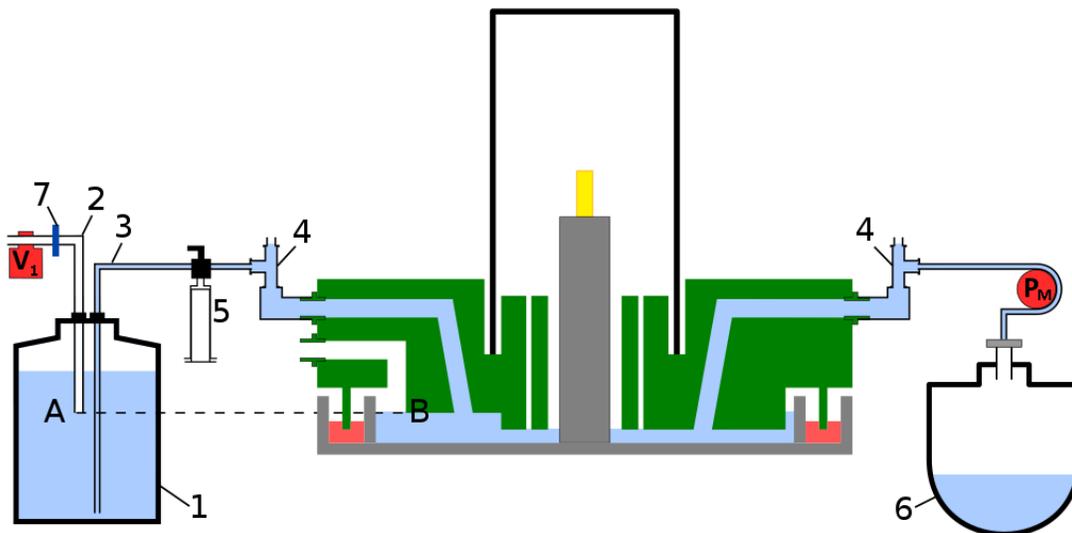


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung des offenen Immersionssystems mit Medium-zufluss und -abfluss. Aus dem starren Vorratsbehälter (1) führen ein Luftrohr (2) und ein Mediumschlauch (3), der über ein T-Kopplungsstück (4) mit dem Basishalter verbunden ist. Zum Starten der Mediumzufuhr ist eine Befüllhilfe (5) vorgesehen. Das Luftrohr ist mit einem Sterilfilter (6) versehen und kann mit einem Ventil (V_1) verschlossen werden. Das abfließende Medium wird mittels einer Schlauchpumpe (P_M) in einen verformbaren Abfallbeutel (7) geleitet. Im Druckgleichgewicht befindet sich die Flüssigkeitsoberfläche am Luftrohrende (A) auf gleicher Höhe mit dem Flüssigkeitsstand in der Schale (B).

Die Umsetzung des Flüssigkeitsreservoirs samt der Luft- und Mediumleitung sowie der Befüllhilfe erfolgt äquivalent zum Aufbau des geschlossenen Immersionssystems und ist in Abschnitt 4.4 ausführlich beschrieben. Der am oberen Ende des offenen Luftschlauchs eingesetzte Filter ist ein steriler Spritzenvorsatzfilter, der über Luer-Lock-Adapter mit den Schlauchteilen verbunden ist. Die filternde Membran besteht aus Polyethersulfon (PES) mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$. Direkt hinter dem Filter befindet sich ein elektrisches

Schlauchquetschventil (PS-1615NC, BMT Brandt Medizintechnik, Deutschland), das im stromdurchflossenen Zustand öffnet und normal geschlossen (engl. *normally closed*, NC) ist. Das Ventil ist dafür geeignet, den verwendeten Silikonschlauch (ID: 1,5 mm, AD: 3,5 mm) mit einem Arbeitsdruck von maximal 1500 mbar vollständig abzudichten.

Beide T-Kopplungsstücke bestehen aus klarem Polypropylen (PP) und weisen jeweils drei Luer-Lock-Anschlüsse auf. Abbildung 4.11 zeigt ein Schema der Anschlüsse an einem T-Kopplungsstück. Die dünnen Flüssigkeitsschläuche sind über Luer-Lock-Konnektoren mit dem T-Stück verbunden. Um den dickeren Silikonschlauch (ID: 9 mm, AD: 12 mm) anzuschließen, wird ein Adapter aus dem Zylinder einer Einmalspritze hergestellt. Dazu wird der Kolben der Spritze entfernt und der Zylinder so gestutzt, dass der Silikonschlauch über das offene Ende gezogen werden kann. Der Luer-Anschluss des Spritzenzylinders, der ebenfalls aus PP besteht, wird an das T-Stück gesteckt. Das jeweils andere Schlauchende ist an einer Messing-Schlauchtülle des Basishalters angeschlossen. Alle verwendeten Adapter, Anschlüsse und Schläuche sind autoklavierbar und werden der Anforderung der Biokompatibilität gerecht.

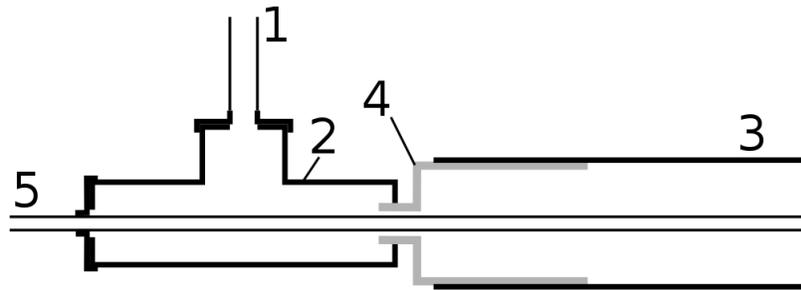


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Anschlüsse am T-Kopplungsstück. Der Flüssigkeitsschlauch (1) wird über ein Luer-Lock-Adapter am T-Kopplungsstück (2) angeschlossen. Der dicke Flüssigkeitsschlauch (3) ist über einen gestutzten Spritzenzylinder (4, grau) mit dem T-Stück verbunden. Der dünne Gasschlauch (5) führt über einen Luer-Lock-Adapter durch das T-Stück und den dicken Flüssigkeitsschlauch, um das Schlauch-in-Schlauch System zu bilden.

Die eingesetzte peristaltische Schlauchpumpe (400FD/A1 Brush DC motor 12V, BMT Brandt Medizintechnik, Deutschland) fördert mit 13 Umdrehungen pro Minute bei dem verwendeten Schlauchinnendurchmesser von 1,5 mm etwa 0,88 ml/min. Diese geringe Fördermenge zeichnet die Pumpe ebenso aus wie ihre Fördergenauigkeit von bis zu einem Mikroliter. Der Medium führende Schlauch wird um das rotierende Element der Pumpe gespannt und mit zwei Klemmen fixiert. Ist die Pumpe außer Betrieb, dichtet sie den Silikonschlauch vollständig ab, sodass keine zusätzlichen Ventile benötigt werden.

Der Abfallbehälter besteht aus einem Kinderurinbeutel (Urosid, ASID BONZ GmbH,

Deutschland) und weist eine integrierte Tropfkammer als Phasengrenze und Kontaminationsschutz auf. Der Beutel ist in sterilen Einzelverpackungen erhältlich. Der Flüssigkeit abführende Schlauch ist über Luer-Lock-Konnektoren mit dem Abfallreservoir verbunden.

4.5.2 Gasfluss und -abfluss

Die Elemente des Gaszuflusses und -abflusses sorgen neben dem Gasaustausch auch für die Immersion der Probe mit dem bereitgestellten Medium und stellen den Füllstand in der Küvette ein. Ein Schema vom Gaszufluss und -abfluss zusätzlich zu den Elementen des Mediaustauschs ist in Abbildung 4.12 zu finden.

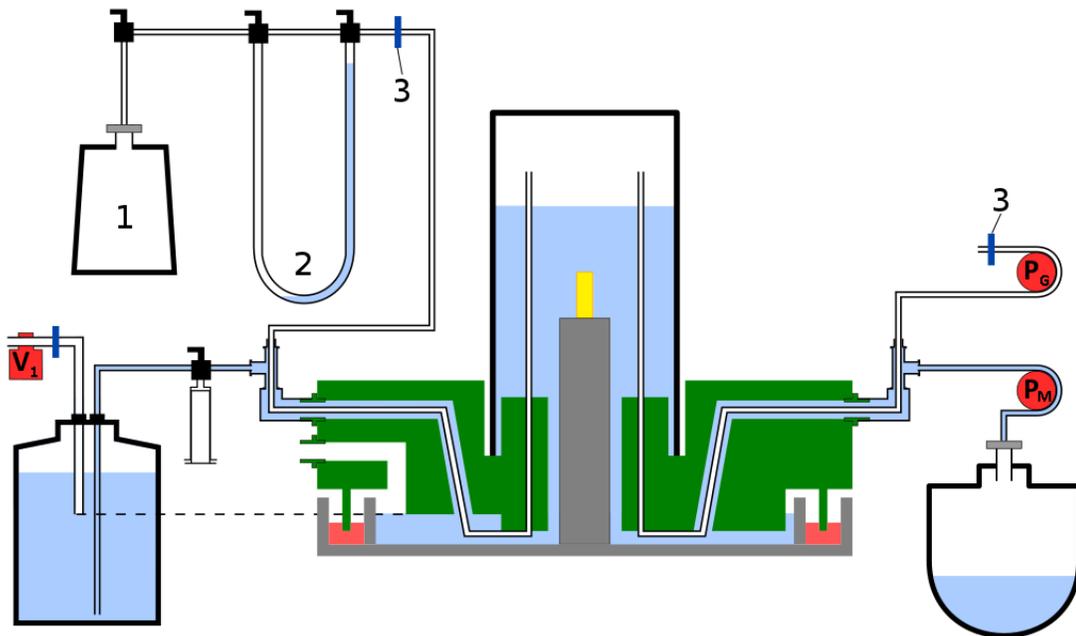


Abbildung 4.12: Schema des offenen Immersionssystems mit Zu- und Abfluss von Medium und Gas. Das Gasreservoir (1) ist über einen Schlauch mit einem U-Rohr-Manometer (2) verbunden. Ein weiterer Schlauch reicht vom U-Rohr durch das T-Kopplungsstück in den oberen Teil der Küvette, der Gas enthält. Für den Gasabfluss führt ein weiterer Schlauch aus dem oberen Teil der Küvette durch das zweite T-Stück über eine Schlauchpumpe (P_G). Das Ende dieses Schlauchs ist offen. Die Schläuche sind jeweils mit einem Sterilfilter (3) versehen, um ein Eindringen von Kontaminationen in das System zu verhindern. Das U-Rohr-Manometer dient zur Einstellung der Füllhöhe in der Küvette. Ein Gasaustausch ist ebenso möglich.

Im oberen Teil der Küvette, in der Gasphase, befindet sich je ein offenes Ende eines Gas Schlauchs. Die Schläuche kommen durch die kleinen, vertikalen Bohrungen im Basishalter unterhalb der Küvette, durch die sie führen, innerhalb der Küvette zum Stehen. Sie ver-

laufen im Weiteren an der Halterunterseite entlang zu je einer Seite der Basishalteröffnungen. Der dünne Gasschlauch führt durch den breiten Flüssigkeitsschlauch (vgl. Abschnitt 4.5.1) und wird am T-Stück ein- bzw. ausgekoppelt. Diese Schlauchführung erzeugt das Schlauch-in-Schlauch System.

Der Schlauch des Gasabflusses läuft über eine Schlauchpumpe, die einen Unterdruck im System erzeugen kann. Das Ende des Gasschlauches ist offen und zur Vermeidung von Kontaminationen mit einem Sterilfilter versehen.

Der Gaszufluss besteht aus einem verformbaren Gasreservoir, das über einen Gasschlauch mit einem verschließbaren Hahn, einem U-Rohr-Manometer und dem T-Kopplungsstück verbunden ist. Das Gasreservoir stellt das für die Inkubation gewünschte Gasgemisch bereit. Es ist so beschaffen, dass es eine Gasmenge beinhaltet, kompressibel und stets im Gleichgewicht mit dem Umgebungsdruck ist. Dadurch baut es in keinem Zustand einen zusätzlichen Druck auf das System auf. Um ein Auswechseln des Gasreservoirs während des Betriebs der Inkubationsprobenkammer zu ermöglichen, ist ein verschließbarer Hahn vorgesehen. Das U-Rohr-Manometer umfasst einen zu einem Halbkreis gebogenen Schlauch, der im unteren Teil mit Wasser gefüllt ist. Eine flüssigkeitsfreie Schlauchquerverbindung verknüpft die beiden Schlauchenden des U-Rohrs und kann wahlweise eingesetzt werden, um das U-Rohr zu umgehen. Darüber hinaus sorgt die Querverbindung für die Stabilität und den Halt der U-Form. Zwischen U-Rohr-Manometer und T-Stück ist ein weiterer Sterilfilter platziert.

Die Küvette wird mit Immersionsflüssigkeit gefüllt, indem ein lokaler Unterdruck generiert wird. Der Unterdruck in der Küvette wird über ein Abpumpen von Gas an der Abflusseite erzeugt. Sofern die Unterseite des Basishalters durch Immersionsmedium abgedichtet ist, wird die Flüssigkeit aus der Schale auf diese Weise in die Küvette gezogen. Durch die Konzeption des Mediumzuflusses, strömt gleichzeitig Flüssigkeit in die Schale nach, sodass der Halter abgedichtet bleibt. Der erzeugte Unterdruck wirkt nicht nur auf das Immersionsmedium, sondern gleichermaßen auf die Flüssigkeit des U-Rohr-Manometers und sorgt dort für ein Verschieben der Flüssigkeitssäule in Richtung des Basishalters. Da das Wasser etwa die gleiche Dichte wie die Immersionsflüssigkeit aufweist, steigen die Flüssigkeitsstände auf gleiche Höhe an, da sie die gleiche Druckdifferenz erfahren. Der Schlauch des U-Rohrs ist in seinem Durchmesser so angepasst, dass die Oberflächenspannung des Wassers nicht ausreicht, die Wassersäule vollständig in der vertikalen Schlauchposition zu halten. Stattdessen reißt die untere Flüssigkeitsoberfläche ab und Gas gelangt aus dem angeschlossenen Reservoir bläschenweise durch die Säule über den Gasschlauch in die Küvette. Durch diesen Mechanismus stagniert die Wassersäule im U-Rohr ab einer bestimmten Druckdifferenz und jeder zusätzlich aufgebaute Unterdruck wird über nachströmendes Gas aus dem

Reservoir ausgeglichen. Diese definierte, maximal erreichbare Druckdifferenz ist von der verwendeten Flüssigkeitsmenge im U-Rohr abhängig und bestimmt gleichzeitig die Füllhöhe der Küvette. Der Unterdruck im System wird auch ohne weiteres Abpumpen konstant gehalten, da das Gassystem luftdicht abgeschlossen ist und kein Druckausgleich mit der Umgebung stattfinden kann. Über ein weiteres Pumpen von Gas wird der Gasaustausch innerhalb der Küvette realisiert. Ist die Unterseite des Basishalters nicht vollständig durch Immersionsflüssigkeit abgedichtet, wird eine erzeugte Druckdifferenz in der Küvette über einströmendes Gas durch die Ausgleichsöffnung im Halter ausgeglichen (vgl. Abschnitt 4.5.3).

Dadurch, dass das System auch beim Nachströmen des Gases über das U-Rohr eine gewisse Trägheit aufweist, wandern nach Abschließen des Pumpvorgangs unter Umständen weitere Gasbläschen durch die Flüssigkeit des U-Rohrs in das System und wirken der aufgebauten Druckdifferenz entgegen. Um dieses unerwünschte, zusätzliche Nachströmen des Gases zu unterbinden, wird zwischen Gasreservoir und U-Rohr-Manometer ein Schlauchquetschventil installiert. Das Ventil öffnet lediglich, wenn die Gaspumpe eingeschaltet ist. Dadurch wird gewährleistet, dass die aufgebaute Druckdifferenz erhalten bleibt.

Für die Gasschläuche innerhalb des Basishalters und des Schlauch-in-Schlauch Systems werden, analog zum Aufbau des geschlossenen Immersionssystems (vgl. Abschnitt 4.4), dünne PTFE-Schläuche (ID: 1 mm, AD: 1,6 mm) verwendet. Im T-Kopplungsstück führen die Schläuche durch das Innere eines Luer-Lock-Adapters in das Innere eines Silikon-schlauchs (ID: 1,5 mm, AD: 3,5 mm), der von außen am Luer-Lock-Konnektor angeschlossen ist. Durch diese Schlauchführung ist eine vollständige Abdichtung der Gasleitung sichergestellt.

Das Gasreservoir besteht aus einem Infusionsbeutel (Infubag, S.E. Nüdel Kunststofftechnik GmbH, Deutschland), der ein Volumen von 250 ml besitzt und über seinen Zugang mit Luer-Lock-Adaptern und einem Dreiwegehahn am Gasschlauch angeschlossen wird. Der dritte Zugang des Dreiwegehahns ist mit einem Blindstopfen verschlossen.

Der Schlauch des U-Rohr-Manometers (ID: 7 mm, AD: 9 mm) formt im unteren Teil einen Halbkreis mit einem Radius von 38 mm. Die offenen Enden des U-Rohrs sind über Luer-Lock-Konnektoren mit jeweils einem Dreiwegehahn verbunden. Die Dreiwegehähne sind über einen weiteren Schlauch, der Querverbindung, aneinander gekoppelt. An den jeweils dritten Anschluss der Hähne ist der Gasschlauch an einem Luer-Lock-Adapter angeschlossen.

Das eingebaute, elektrische Schlauchquetschventil (PS-1615NC, BMT Brandt Medizintechnik, Deutschland) ist identisch mit dem des Mediumzufflusses und -abflusses. Als Pumpe wird eine Schlauchpumpe (400FD/A1 Brush DC motor 12V, BMT Brandt Medizintechnik,

Deutschland) eingesetzt, die von ihrer Bauart und ihren Eigenschaften der Mediumpumpe gleicht. Allerdings ist sie mit einem anderen Motor versehen, der mit 47 Umdrehungen pro Minute bei dem verwendeten Schlauchdurchmesser etwa 3,2 ml/min fördert. Beim Gaszufluss und -abfluss kommen die gleichen Spritzenvorsatzfilter zum Einsatz wie beim Luftrohr des Mediumzuflusses (vgl. Abschnitt 4.5.1).

Das Schlauchsystem ist dafür ausgelegt, im Autoklaven sterilisiert zu werden. Da Sterilfilter zur Vermeidung von Kontaminationen eingesetzt werden, ist eine Sterilisation der Komponenten vom Basishalter bis zum Filter ausreichend. Alle weiteren Elemente, wie beispielsweise das U-Rohr-Manometer und das Gasreservoir, bleiben während des Inkubationsbetriebs unsteril.

4.5.3 Druckausgleich

Die Druckausgleichsöffnung hat die Funktion, den Umgebungsdruck über die Ausgleichsöffnung im Basishalter innerhalb der Schale und der Kontaminationsbarriere bereitzustellen. Dies ist besonders wichtig, um ein kontrolliertes Nachfüllen der Schale mit Immersionsmedium zu ermöglichen (vgl. Abschnitt 4.5.1). Außerdem wirkt über die Druckausgleichsöffnung auf die innere und äußere Seite des Barrieremediums der gleiche äußere Druck, sodass Schwankungen des Umgebungsdrucks nicht zum Überfließen des Barrieremediums führen. Eine schematische Darstellung des Druckausgleichs innerhalb des gesamten offenen Immersionssystems ist in Abbildung 4.13 zu sehen.

Zur Realisierung des Druckausgleichs ist der Anschluss eines verformbaren Gasreservoirs an die Ausgleichsöffnung des Basishalters vorgesehen, damit bereits auf das Immersionsmedium in der Schale das für die Inkubation angepasste Gasgemisch wirkt. Auf diese Weise wird ein möglicher pH-Gradient innerhalb der Proben- und Rotationseinheit vermieden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Das Reservoir entspricht vom Konzept her dem Gasreservoir des Gaszuflusses (vgl. Abschnitt 4.5.2). Darüber hinaus bietet das Reservoir die Sicherheit, die Proben- und Rotationseinheit auch schon dann mit dem gewünschten Gas zu versorgen, wenn die Abdichtung der Halterunterseite mit Immersionsmedium noch nicht vollständig erfolgt ist. Um eintretende Kontaminationen zu verhindern, ist ein Filter zwischen dem Gasreservoir und der Ausgleichsöffnung geschaltet.

Die Umsetzung des Anschlusses am Basishalter erfolgt analog zum Mediumzufluss und -abfluss (vgl. Abschnitt 4.5.1) über eine Messing-Schlauchtülle, an die ein Silikonschlauch (ID: 9 mm, AD: 12 mm) angeschlossen wird. Die andere Seite des Schlauchs ist mit einem gekürzten Spritzenzylinder verbunden, der einen Luer-Anschluss bereitstellt. Ein weiterer Schlauch (ID: 1,5 mm, AD: 3,5 mm), mit Luer-Lock-Konnektoren angeschlossen, verbindet das Gasreservoir mit dem dicken Schlauch. Für das Gasreservoir wird ein weiterer

Infusionsbeutel eingesetzt. Der verwendete Filter ist identisch mit den übrigen im Aufbau eingesetzten Filtern. Eine Sterilisation des Schlauchsystems vom Anschluss des Basishalters bis zum Filter ist im Autoklaven problemlos möglich.

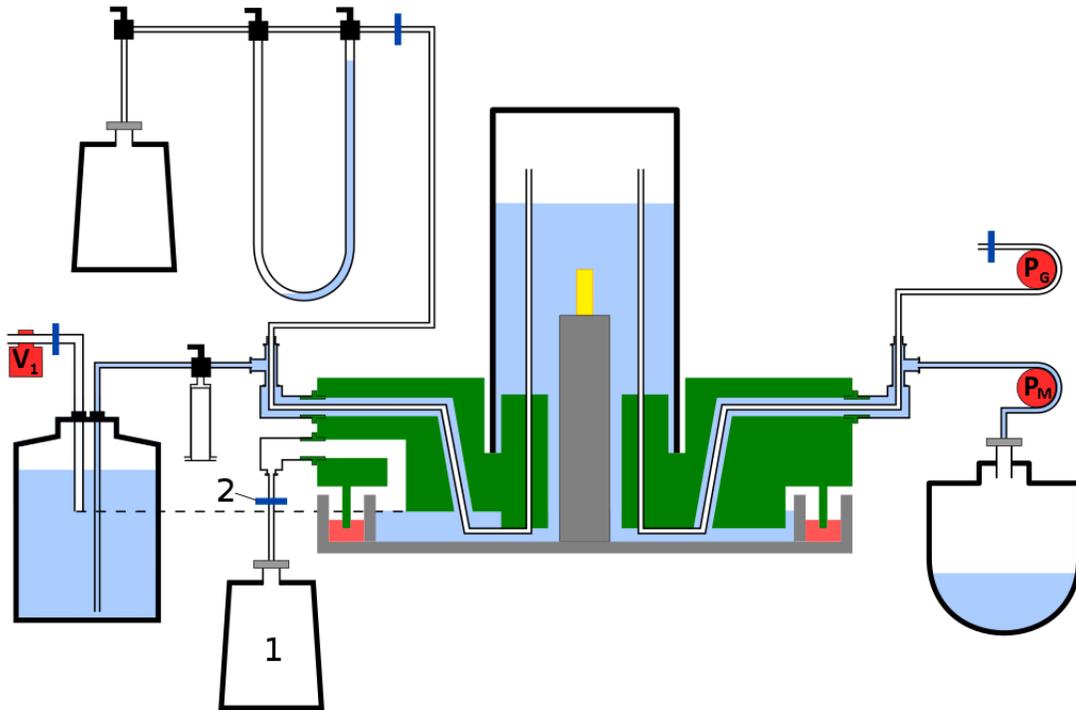


Abbildung 4.13: Schema des Druckausgleichs innerhalb des offenen Immersionssystems. Das zweite verformbare Gasreservoir (1) ist über einen Schlauch mit der Ausgleichsöffnung des Basishalters verbunden. Zwischen Reservoir und Halter ist ein Filter (2) geschaltet.

4.6 Heizsystem

Das Heizsystem wird dazu genutzt, die Temperatur der Probenumgebung auf 37 °C zu regulieren, was für das Überleben der Probe innerhalb der Inkubationsprobenkammer entscheidend ist (vgl. Abschnitt 3.2.2). Dabei nimmt das System keinerlei Einfluss auf die Funktionalität des Aufbaus, beispielsweise im Hinblick auf die optische Zugänglichkeit der Probe. Das Heizsystem besteht aus einer Isolationshaube, in der ein Heizelement und ein Thermometer eingelassen sind (vgl. Abb. 4.14, links). Die Regelung der Temperatur mit diesem System erfolgt über ein Mikrocontroller-Board und ist in Abschnitt 4.7.2 beschrieben.

4.6.1 Isolationshaube

Die Isolationshaube ist so konzipiert, dass sie direkt über der Rechteck-Küvette platziert wird und mit ihrer offenen Unterseite auf dem Basishalter aufliegt. Die Haube ist aus vier Seitenwänden und einem Deckel zusammengebaut, die eine Dicke von 5 mm aufweisen. Zwischen Haube und Küvette besteht, außer an den Außenkanten der Seitenwände, eine ca. 1 mm breite Luftschicht, die Platz für das Heizelement bietet. Die beiden langen Seitenwände, die senkrecht zur optischen Achse des optischen Systems ausgerichtet sind, besitzen jeweils eine Öffnung, die 20 mm hoch und 10 mm breit ist. Diese Öffnungen sind mittig platziert und ermöglichen das ungehinderte Passieren des rasternden Laserstrahls durch die Küvette.

Die fünf Einzelteile der Haube wurden in der hauseigenen Mechanischen Werkstatt aus dem Werkstoff PMMA hergestellt. Die Konstruktionszeichnungen dazu (vgl. Anhang A.2.6) wurden von Moritz Hitzemann angefertigt. Weitere Bohrungen in den öffnungsfreien Seitenwänden zur Kabelführung des Heizelements und zur Befestigung des Thermometers wurden mit einem Bohrer hinzugefügt (vgl. Abb. 4.14, rechts oben). Vor dem Verkleben der Teile zur Haube, wurden Heizelement und Thermometer eingesetzt. Die Klebeverbindung erfolgte mit einem Plastik-Spezialkleber (Supercement S30, Vollmer GmbH, Deutschland).

4.6.2 Heizelement

Als Heizelement kommt ein Widerstandsdraht zum Einsatz. Der stromdurchflossene Draht wandelt elektrische Energie in Wärme um, die er ungerichtet an seine Umgebung abgibt. Um die Probenumgebung möglichst effektiv zu heizen, wird der Draht in vielen schmalen Schleifen an den Innenseiten der vier Haubenwände fixiert. Dadurch wird zum einen die Oberflächenkapazität der Haube optimal ausgenutzt und zum anderen eine größere Drahtlänge auf kleinem Raum untergebracht. Zur einfacheren Befestigung des Drahtes

wird er in der angepassten Form zwischen zwei Lagen durchsichtigen Klebebands fixiert und so eine passgenaue Heizfolie erstellt (vgl. Abb. 4.14, rechts unten). Diese Heizfolie besteht aus vier miteinander verbundenen Elementen, die mit Plastik-Spezialkleber an die Innenwände der Haubenteile fixiert werden. Der jeweilige Teil des Drahtes, der die Heizfolienelemente verbindet, wird nach dem Zusammenfügen der Haube an der Unterseite der Haube verklebt. Die beiden Enden des Widerstandsdrahtes werden über eine kleine Bohrung an einer kurzen Seitenwand aus der Haube herausgeführt und weiterführend mit zwei Kabeln verbunden. Um mechanische Belastung auf die herausführenden Drahtenden zu reduzieren, ist der äußere Bereich der Bohrung mit einem Tropfen Heißkleber versehen. Der als Heizdraht verwendete Widerstandsdraht (Isotan, Isabellenhütte Heusler GmbH & Co. KG, Deutschland) besteht aus Konstantan, eine Legierung aus 55 % Kupfer, 44 % Nickel, 1 % Mangan und besitzt einen Widerstand von $97,5 \Omega/\text{m}$ bei einem Durchmesser von 0,08 mm. Der Gesamtwiderstand des Drahtes ist abhängig vom temperaturabhängigen spezifischen elektrischen Widerstand, der Drahtlänge und dessen Querschnitt. Der spezifische elektrische Widerstand des verwendeten Drahtes ist im Temperaturbereich des Heizelements konstant und beträgt $0,49 \Omega\text{mm}^2/\text{m}$. In dem Heizelement ist knapp 1 m Draht untergebracht und der Gesamtwiderstand beträgt etwa 92Ω , wodurch bei einer angelegten Spannung von 12 V ein Strom von ca. 130 mA fließt.

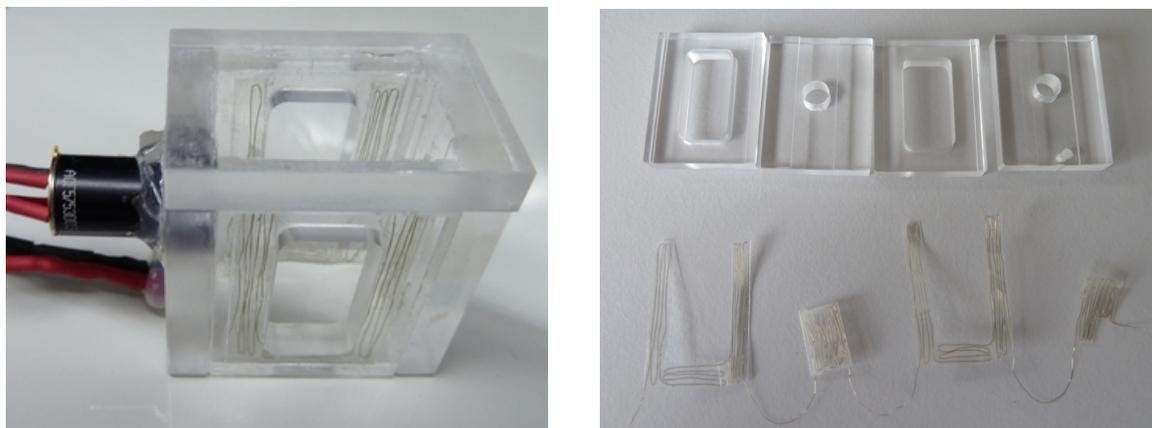


Abbildung 4.14: Heizsystem der Inkubationsprobenkammer. Foto des Heizsystems bestehend aus Isolationshaube mit eingelassenem Heizelement und Thermometer (links). Die vier Seitenwände der Haube (rechts oben) und die Heizfolie mit dem passend fixierten Widerstandsdraht (rechts unten).

4.6.3 Thermometer

Zur Temperaturmessung kommt ein Infrarot-Thermometer (MLX90614 ESF-ACF-000, Melexis Microelectronic Systems, Belgien) zum Einsatz, das berührungslos arbeitet und

somit im geringen Abstand zur Küvette in der Haube platziert werden kann. Das Thermometer setzt sich aus einem Infrarot-Sensor und einem Chip zusammen, der das Temperatursignal verstärkt und aufbereitet. Beide sind in einem Metallgehäuse TO-39 platziert. Der Sensor selbst besteht aus einem Thermosäulenchip, das heißt aus hintereinander geschalteten Thermoelementen auf einem Chip, die empfangene Wärmestrahlung in ein elektrisches Signal umwandeln. Das Messfeld des Sensors (engl. *field of view*, FOV) beträgt 10° und ermöglicht so eine gerichtete Temperaturmessung. Diese ist notwendig, um ausschließlich die Temperatur des Systems zu messen, nicht aber der Umgebung. Die digital ausgegebene Temperaturinformation ist kalibriert und entspricht dem Temperaturmittelwert aller Objekte im Messfeld. Ausgelesen wird das Temperatursignal über einen Zweileiterbus (System Management Bus, basierend auf dem I²C-Busprotokoll) mit dem Mikrocontroller-Board. Darüber hinaus verfügt das Thermometer über je einen Kontaktfuß für Masse und die Betriebsspannung von 5 V. Die Temperaturauflösung des Thermometers beträgt $0,01\text{ }^\circ\text{C}$.

4.7 Steuerung der Inkubationsprobenkammer

Zur Steuerung der entwickelten Inkubationsprobenkammer werden als Recheneinheiten Mikrocontroller-Boards aus dem Hause Arduino eingesetzt. Die Programmierung der Mikrocontroller erfolgt über die gleichnamige Programmierumgebung. Die Systemsteuerung gliedert sich dabei in zwei Hauptteile. Ein Teil beinhaltet ein Programm zur Ansteuerung und Automatisierung des Pumpsystems, um die Inkubationsprobenkammer als offenes Immersionssystem für die Durchführung von Langzeitexperimenten zu verwenden. Der andere Teil besteht aus einem Programm zur Steuerung des Heizsystems, das ebenfalls für den automatisierten Langzeitbetrieb ausgelegt ist. Zur Steuerung des Heizsystems wurde eine Temperaturregelung entwickelt, die in das Steuerungsprogramm implementiert ist. Ein Schaltplan des gesamten Steuerungssystems ist im Anhang A.4.1 zu finden.

4.7.1 Arduino: Hardware und Software

Die Arduino-Boards basieren auf einem Atmel AVR-Mikrocontroller, der einen 16 MHz Schwingquarz als Taktgeber besitzt und Arbeits- und Programmspeicher bietet. Auf der Platine dienen verschiedene Steckplätze als digitale und analoge Ein- und Ausgänge, über die externe elektronische Bauteile angeschlossen werden können. Einige der Ausgänge sind in der Lage, pulsweitenmodulierte Signale auszugeben. Die Spannungsversorgung der Boards erfolgt wahlweise über USB (5 V) oder eine externe Spannungsquelle (7 - 12 V), wobei die Betriebsspannung bei 5 V liegt. Für die Arduino-Boards sind verschiedene Möglichkeiten zur Funktionserweiterung gegeben, beispielsweise durch Aufsteckplatinen und andere Erweiterungsmodule. Die Kommunikation mit dem Computer, sei es nur zur Programmierung des Mikrocontrollers oder zum Datenaustausch während der Programmausführung, wird über die serielle Schnittstelle realisiert. Die Platinen sind so konzipiert, dass sie prinzipiell nach ihrer Programmierung sowohl mit als auch ohne Verbindung zum Computer laufen. Ein vorprogrammiertes Startprogramm (engl. *bootloader*) wird ausgeführt, sobald eine Stromversorgung des Mikrocontrollers besteht. Der Bootloader ermöglicht das Hochladen eines neuen Programms und die USB-Kommunikation. Durch Betätigen eines vorhandenen Reset-Schalters werden alle aktuellen Vorgänge beendet und der Bootloader und damit die Ausführung des Programms wird von Neuem gestartet. [21]

Die Arduino-Plattform stellt neben den Boards auch eine eigene integrierte Entwicklungsumgebung bereit, die ebenso wie die Hardware quelloffen ist. Die Programmierung der Mikrocontroller basiert auf den Programmiersprachen C bzw. C++, die allerdings für den Anwender durch zusätzliche Arduino-Bibliotheken vereinfacht wird. Um den Funktionsumfang der Software zu erweitern, ist das Einbinden weiterer anwendungsspezifischer

Programmbibliotheken problemlos möglich. Die Programmieroberfläche verfügt neben einem Text-Editor zum Schreiben eines Programms auch über einen seriellen Monitor, der dem seriellen Datenaustausch dient. Hier können vom Arduino gesendete Daten angezeigt werden und, über die Eingabe in einer Kommandozeile, Daten an den Arduino übertragen werden. [21]

Zur Steuerung der Inkubationsprobenkammer werden zwei Arduino-Boards eingesetzt: ein Arduino Leonardo für das Pumpsystem und ein Arduino Uno für das Heizsystem. Im Wesentlichen unterscheiden sich die beiden Platinen in den eingebauten Mikrocontrollern und der Anzahl der digitalen und analogen Ein- und Ausgänge. Der Arduino Leonardo basiert auf dem Mikrocontroller ATmega32u4 und weist 20 digitale und 12 analoge Anschlussmöglichkeiten auf, während die Platine des Arduino Uno mit dem Mikrocontroller ATmega328 bestückt ist und über 14 digitale und 6 analoge Steckplätze verfügt. Der nichtflüchtige Programmspeicher beider Mikrocontroller, der Flash-Speicher, beläuft sich auf 32 KB und beinhaltet bereits den Bootloader. Der maximal fließende Strom pro Ein- und Ausgang ist bei dem Arduino Leonardo auf 40 mA und bei dem Arduino Uno auf 20 mA begrenzt.

Da für die Steuerung der Inkubationsprobenkammer das Schalten höherer Ströme und Spannungen notwendig ist, werden die Arduino-Boards mit aufsteckbaren Platinen erweitert, die diese Aufgabe erfüllen. Hierfür werden Platinen, die mit vier Relais ausgestattet sind, verwendet - die sogenannten Relais Shields (SLD01101P, Seeed Technology Inc., China). Mit den Relais Shields ist das Schalten von Strömen bis 8 A und Spannungen bis 35 V möglich. Ein Relais ist ein elektromagnetischer Schalter, bei dem ein Stromkreis durch einen fließenden Strom im Relais unterbrochen oder geschlossen wird, je nach Bauart. Die Relais Shields bieten neben den herkömmlichen Steckplätzen der Arduino-Boards vier NO/NC-Kontaktschnittstellen, die an die Relais gekoppelt sind. Angesteuert werden diese Schnittstellen über die digitalen Arduino-Ausgänge 4 bis 7.

Zum Schutz der Technik sind die Arduino-Boards samt Aufsteckplatinen in einem Gehäuse (ET 241, BOPLA Gehäuse Systeme GmbH, Deutschland) platziert. Das Gehäuse ist mit drei verschiedenen Eingängen versehen: eine USB-Doppeleinbaubuchse zur Verbindung der beiden Arduino-Boards mit dem Computer, eine Hohlbuchse zur Spannungsversorgung des Gesamtsystems mit 12 V und eine 5-polige Rundsteckerbuchse zum Anschluss des Heizsystems. Die serielle Schnittstelle mit dem Computer wird beim Arduino Leonardo über einen Micro-USB-Anschluss und beim Arduino Uno über einen USB-Typ-B-Anschluss realisiert. Im Inneren des Gehäuses befindet sich eine Steckerleiste mit 11 Steckplätzen, die aus Platinen-Steckverbindern zusammengelötet wurde. Die Steckerleiste wird mit der Hohlbuchse verbunden und über ein externes Netzteil mit 12 V und max. 3000 mA ver-

sorgt. Hierüber werden die Boards, die Schlauchpumpen und Schlauchquetschventile sowie das Heizelement gespeist. Die freien Steckplätze bieten die Möglichkeit zur Installation weiterer Geräte.

Die beiden Schlauchpumpen und Quetschventile sind in den Deckel des Gehäuses eingelassen und mit ihm verschraubt, sodass sie im Inneren an die vier NO-Kontaktschnittstellen des Arduino Leonardo Relais Shields angeschlossen und einzeln angesteuert werden können.

Das Heizsystem führt mit dem Heizelement und dem Infrarot-Thermometer über einen 5-poligen DIN-Rundstecker in das Gehäuse. Die Masseleitungen vom Heizdraht und Thermoelement sind bereits außerhalb des Gehäuses zusammengeführt. Der Heizdraht ist an einer NO-Kontaktschnittstelle des Arduino Uno Relais Shields angeschlossen. Die Spannungsversorgung des Thermometers mit 5 V erfolgt über den entsprechenden Anschluss am Arduino Uno. Der Zweileiterbus bestehend aus Takt- (engl. *serial clock*, SCL) und Datenleitung (engl. *serial data*, SDA) ist mit den analogen Arduino-Eingängen A5 und A4 verbunden.

4.7.2 Temperaturregelung des Heizsystems

Die Temperaturregelung erfolgt im Zusammenspiel mit dem Mikrocontroller-Board und das daran angeschlossene Heizsystem. Ziel ist es, die Temperatur als Regelgröße im System auf einen bestimmten Wert zu bringen und konstant zu halten. Die gewünschte Temperatur liegt dabei oberhalb der Umgebungstemperatur.

Der Regelkreis besteht darin, die Regelgröße zu messen, diesen Istwert mit einem vorgegebenen Sollwert zu vergleichen und die Differenz über einen Regler auszugleichen. Der Regler bestimmt die Stellgröße, das heißt die am Heizdraht anliegende Spannung und damit die Wärmezufuhr, die einen Einfluss auf die Regelstrecke nimmt. Die Regelstrecke besteht aus den Elementen, die die Regelgröße enthalten, was im entwickelten System der Probenumgebung entspricht. Äußere Einwirkungen auf die Regelstrecke, wie beispielsweise Verluste durch Wärmeabgabe an die Umgebung, werden als Störung bezeichnet. Dadurch, dass der Regelkreis fortlaufend besteht, wirkt der Regler allen angreifenden, äußeren Störungen entgegen. [19]

Die Umsetzung des Regelkreises geschieht mithilfe des Arduino-Boards. Zur Messung der lokalen Temperatur der Probenumgebung wird das Signal des Infrarot-Thermometers ausgelesen. Ein Vergleich von Ist- und Sollwert wird vorgenommen, um die Reaktion des Reglers zu bestimmen. Im Normalfall wird die Stellgröße über den Regler in Form einer Leistungsverstärkung entsprechend der Regeldifferenz angepasst. Dies bedeutet, dass bei einer großen Abweichung der Regelgröße vom Sollwert die Leistung der Stellgröße erhöht wird.

Diese Verstärkung kann über ein analoges Spannungsausgangssignal oder ein pulsweitenmoduliertes Spannungssignal reguliert werden. Da für das Schalten des Heizelements ein Relais Shield verwendet wird, kommen beide Varianten der Leistungsverstärkung nicht in Frage. Ein Relais bietet lediglich ein digitales Ausgangssignal und ist für das hochfrequente Schalten im Bereich mehrerer zehntausend Hertz zur Erzeugung eines pulsweitenmodulierten Signals nicht ausgelegt. Alternativ wird daher die zugeführte Wärmeleistung nicht über die Größe der anliegenden Spannung, sondern über die Dauer der anliegenden Maximalspannung geregelt. Folglich hat der Regler in dem entwickelten System die Aufgabe, den Schalter für die Spannungsversorgung des Heizelements solange zu öffnen, bis der Sollwert erreicht ist. Ein erneuter Abfall des Istwerts durch äußere Störungen wird durch den Regler stets ausgeglichen.

4.7.3 Basis der Steuerungsprogramme

Ein Arduino-Programm besteht in der Regel aus zwei Methoden, *setup* und *loop*. Die *setup*-Methode wird einmalig beim Programmstart ausgeführt und dient dazu, Variablen zuzuordnen, Bibliotheken zu initialisieren, Startbedingungen zu setzen, Betriebsmodi festzulegen, usw. Der Inhalt der *loop*-Methode läuft hingegen in einer Schleife immer wiederkehrend ab, solange das Programm in Betrieb ist. In dieser Methode sind alle Prozesse und Steuerungsabläufe enthalten, die vom Arduino-Board durchgeführt werden sollen.

Die Basis der Programme zur Steuerung der Arduino-Boards ist für beide Anwendungen identisch. Die Steuerungsprogramme setzen sich jeweils aus drei Dateien zusammen, wobei eine das Hauptprogramm enthält und in den zwei weiteren Dateien Funktionen für die serielle Kommunikation und für weitere, individuelle Programmroutinen definiert sind. Beide Programme sind für den Datenaustausch und die Kommunikation mit dem Computer über den seriellen Monitor ausgelegt. Über die Eingabe definierter Befehle in die Kommandozeile des seriellen Monitors werden entsprechende Steuerungsfunktionen aufgerufen und vom Board ausgeführt.

Um die serielle Kommunikation mit dem Computer zu starten, wird in der *setup*-Methode eine Datenübertragungsrate von 9600 bit/s initialisierend festgelegt. Die einzelnen Zeichen eines Kommandos über den seriellen Monitor werden zu einem Gesamtbefehl zusammengefügt und zwischengespeichert, bis sie über die Eingabetaste bestätigt werden. Dadurch wird der Befehl als komplett bewertet, als Rückmeldung über den seriellen Monitor ausgegeben und in der *loop*-Methode weiterverarbeitet. Hier erfolgt ein Abgleich der Eingabe mit den vorhandenen, programmierten Befehlen. Kommt es zu einer Übereinstimmung mit einem Befehl, wird die dahinterliegende Funktion aufgerufen und ausgeführt. Gibt es keine Übereinstimmung, wird eine Fehlermeldung und ein Verweis auf die Hilfe-Funktion

ausgegeben. Nach der Befehlseingabe wird der Zwischenspeicher bereinigt, um erneute Kommandos entgegennehmen zu können. Es ist zu beachten, dass die Eingabe stets in Großbuchstaben erfolgt.

Die Programmierung der Mikrocontroller erfolgte über die integrierte Entwicklungsumgebung Version 1.6.4.

4.7.4 Programm zur Steuerung des Pumpsystems

Das Steuerungsprogramm des Pumpsystems verfügt über verschiedene Funktionen für den automatisierten Langzeitbetrieb oder, um Pumpprozesse von Medium und Gas einzeln durchzuführen. Die Programmbefehle und -funktionen werden im Folgenden vorgestellt.

MEDIUM_ON:

Die Mediumpumpe wird eingeschaltet und das Quetschventil zum Nachströmen von Luft in das Reservoir geöffnet. Falls gerade ein weiterer Pumpvorgang läuft, wird dieser zuvor abgebrochen. Mit dieser Funktion wird der Mediaustausch realisiert.

MEDIUM_OFF:

Die Mediumpumpe wird ausgeschaltet und das Quetschventil geschlossen. Der Austausch von Medium wird gestoppt.

GAS_ON:

Die Gaspumpe wird gestartet und das Quetschventil zwischen Gasreservoir und U-Rohr-Manometer geöffnet. Eine gegebenenfalls aktive Mediumpumpe wird zuvor deaktiviert. Dadurch wird die Küvette gefüllt und ein Gasaustausch im System findet statt.

GAS_OFF:

Die Gaspumpe wird gestoppt und das Ventil geschlossen. Der Gasaustausch wird gestoppt.

FILL:

Die Ausführung ist identisch mit *GAS_ON*, nur dass das Ventil dabei geschlossen bleibt.

M_FILL:

Die Ausführung stimmt mit *MEDIUM_ON* überein, allerdings wird das Ventil nicht geöffnet.

MG_CYCLE='Mediumpumpdauer [s]','Gaspumpdauer [s]','Intervall [s]','Anzahl der Zyklen':

Diese Funktion ist für das wiederholte Pumpen von Medium und/oder Gas vorgesehen. Hierbei wird die Pumpe immer gleichzeitig mit dem zugehörigen Ventil für die angegebene Dauer aktiviert. Zuerst startet der Mediaustausch. Ist er beendet, folgt der Austausch von Gas. Beide Pumpprozesse werden jeweils nach Ablauf einer Zeitspanne, die das Intervall beschreibt, so oft wiederholt, wie es mit der Anzahl der Zyklen vorgegeben wird. Die

Dauer des Intervalls startet mit dem Beginn eines jeden Zyklus. Soll nur Medium oder Gas ausgetauscht werden, ist für die Dauer des anderen Pumpprozesses *Null* einzugeben. Bei der Eingabe des Befehls ist auf die entsprechende Syntax zu achten. Der zyklische Ablauf kann durch die Eingabe von *STOP* unterbrochen werden. Ist vor Beginn dieser Funktion ein Pumpvorgang bereits aktiv, wird dieser unmittelbar gestoppt.

HELP:

Alle definierten Befehle samt ihren Funktionen werden im seriellen Monitor angezeigt.

Zur Übersicht wird jeder eingegebene Befehl über eine Ausgabe der ausgeführten Aktion im seriellen Monitor bestätigt. Alle zur Ansteuerung nötigen Zuordnungen der Steckplätze sind im Programm beschrieben. Der vollständige Quellcode des Programms befindet sich im Anhang A.5.1.

4.7.5 Programm zur Steuerung des Heizsystems

Mit dem Programm zur Heizsystemsteuerung wird die Temperaturregelung des Heizsystems gesteuert. Darüber hinaus ist die Ausgabe der aktuell gemessenen Temperatur des Thermometers möglich. Um das Auslesen der Temperatursignale über den Zweileiterbus zu vereinfachen, wird eine zusätzliche Bibliothek in das Programm eingebunden. Die Bibliothek (I2C Master Interface, Version 1.10, von Peter Fleury) stellt entsprechende Befehle zur Kommunikation mit Zweileiterbusgeräten, speziell für I²C-Geräte, bereit. Vor ihrer Verwendung werden Angaben zur Taktrate und die Steckplatzbelegung gemäß der vorliegenden Geräte angepasst. Die bereits beschriebene Temperaturregelung (vgl. Abschnitt 4.7.2) ist in das Steuerungsprogramm implementiert. Dabei sieht das Programm eine Regelung der Probenumgebungstemperatur auf 37 °C vor, da dies für viele biologische Proben gefordert ist. Die einzelnen Befehle und Funktionen des Programms sind im Folgenden erläutert.

GET_TEMP:

Die aktuelle Temperatur wird ausgelesen und über den seriellen Monitor ausgegeben.

INTERVAL='Zeit [s]':

Die aktuelle Temperatur wird wiederholt in einem gewünschten Zeitintervall über den seriellen Monitor ausgegeben. Um die Temperatureingabe zu beenden, ist *STOP* einzugeben.

HEATING:

Die Temperaturregelung wird gestartet. Gleichzeitig wird die aktuelle Temperatur jede Sekunde über den seriellen Monitor ausgegeben. Das Heizelement wird solange aktiviert, bis das Thermometer eine Temperatur von 37 °C registriert. Ab dieser Temperatur bleibt

das Heizelement ausgeschaltet. Ein Temperaturabgleich und gegebenenfalls ein Einschalten des Heizelements wird ein Mal pro Sekunde vollzogen, um eine Überlastung des Relais Shields zu verhindern. Der Heizprozess wird mit der Eingabe *STOP* beendet.

HELP:

Die verfügbaren Befehle mit ihren Funktionen werden über den seriellen Monitor ausgegeben.

Der gesamte Quellcode des Steuerungsprogramms ist im Anhang A.5.2 zu sehen. Der Quellcode beinhaltet ebenfalls das Kommunikationsprotokoll des Thermometers und sämtliche Belegungen der Steckplätze.

4.8 Integration in den SLOT-Aufbau

Zur Durchführung von Messungen nach dem SLOT-Prinzip, wird die entwickelte und umgesetzte Proben- und Rotationseinheit in einen bereits vorhandenen SLOT-Aufbau integriert. Aus Gründen des verfügbaren Raumes und der Sicherheit wird in dieser Arbeit die Probenkammer zunächst nur mit dem geschlossenen Immersionssystem (vgl. Abschnitt 4.4) in den SLOT-Aufbau eingebaut. Bereits vorhandene Komponenten der Lichtquelle, der Strahlformung sowie der Ablenk- und Fokussiereinheit werden für den Messaufbau übernommen. Die Positionierung und Befestigung der Proben- und Rotationseinheit im SLOT-Aufbau wird über eine höhenverstellbare Halterung des Rotationsmotors erreicht. In dem Aufbau wird lediglich eine Detektionseinheit des Transmissionskanals verwendet, was für die Bildgebung und für die prinzipielle Durchführung und Charakterisierung von SLOT-Messungen ausreichend ist. Die Detektionseinheit des Fluoreszenzkanals ist nicht Teil dieser vorliegenden Arbeit. Der Messaufbau ist zur Veranschaulichung in Abbildung 4.15 dargestellt.

4.8.1 SLOT-Aufbau

Der bestehende Messaufbau entspricht dem grundlegenden SLOT-Messaufbau (vgl. Abschnitt 2.1.1), wobei die Proben- und Rotationseinheit durch die entwickelte Einheit substituiert wird und die Detektionseinheit des Fluoreszenzkanals entfällt. Als Lichtquelle wird eine grüne Laserdiode (LD-520-50SG, Roithner Lasertechnik GmbH, Österreich) mit einer Wellenlänge von 520 nm eingesetzt, die im cw-Betrieb arbeitet. Das emittierte Licht führt über einen Spiegel und wird mittels einer Linse (AC064-013-A-ML, Thorlabs Inc., USA) in eine Singlemodelfaser (P3-460A-FC-1, Thorlabs Inc., USA) eingekoppelt. Das Faserende ist über einen Adapter mit der Einheit der Strahlformung verbunden, die aus einem motorisierten Zoomobjektiv (H6Z0812M, Computar, CBC AMERICAS Corp., USA) besteht. Durch die Einstellung von Fokus und Zoom werden die Parameter des Laserstrahls justiert. Der an die Probengröße angepasste Strahldurchmesser wird durch die integrierte, variable Irisblende bestimmt. Der geformte Laserstrahl trifft anschließend auf die Ablenk- und Fokussiereinheit, die aus einem x-y-Galvoscannerpaar (CT Set IV, MediaLas electronics GmbH, Deutschland) und insgesamt drei Linsen (67-422, Edmund Optics Inc., USA) besteht. Die Elemente der Strahlformung und der Ablenk- und Fokussiereinheit sind fest auf einem Translationstisch fixiert, sodass der Abstand zur Proben- und Rotationseinheit über eine Mikrometerschraube einstellbar ist. Dadurch kann die Fokusebene der abbildenden Linse innerhalb der zu untersuchenden Probe gelegt werden. Die Detektionseinheit des Transmissionslichts wird unabhängig von den anderen Komponenten über eine Halterung

auf der optischen Achse positioniert. Die Sammellinse (47343-INK, Edmund Optics Inc., USA) kollimiert das Laserlicht und führt es über einen Diffusor auf die sensitive Fläche der Photodiode (PDA36A-EC, Thorlabs Inc., USA), die Licht in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 1100 nm detektiert.

Die Komponenten des SLOT-Aufbaus sind an einem optischen Tisch befestigt, der mechanische Störungen durch eingesetzte Schwingungsdämpfer weitestgehend unterbindet. Darüber hinaus befindet sich um den Aufbau herum eine vollständig verschließbare Box, die Einflüsse von Umgebungslicht während der Messungen unterbindet.

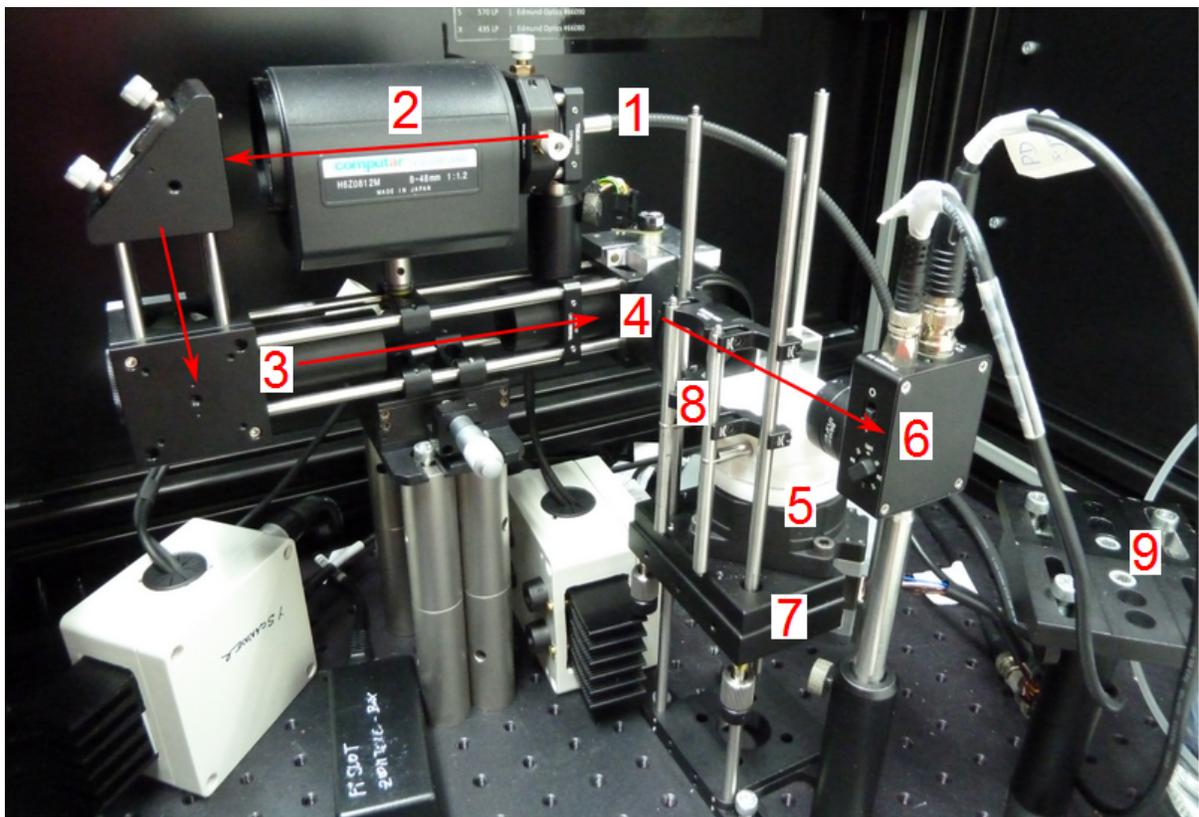


Abbildung 4.15: Die Integration des entwickelten Systems in den SLOT-Aufbau. Die roten Pfeile markieren den Weg des Laserlichts im System. Licht wird über eine Faser (1) in die Einheit der Strahlformung (2) geführt, die aus einem motorisierten Zoomobjektiv besteht. Das Spiegelpaar des x-y-Galvoscanners (3) bildet zusammen mit der abbildenden Linse (4) die Ablenk- und Fokussiereinheit. Der Strahl passiert die Proben- und Rotationseinheit (5) und trifft auf eine Photodiode (6), die transmittiertes Licht detektiert. Die Halterung des Rotationsmotors erfolgt über eine verkippbare Haltevorrichtung (7). Drei Stangen, die den Halter in seiner Position fixieren, formen ein Turmsystem, das für die Gabel (8) des Basishalters als vertikale Schiene dient und eine komfortable Höheneinstellung ermöglicht. Der Behälter des Immersionsmediums findet Platz auf einem Podest (9).

4.8.2 Halterung des Rotationsmotors

Die Positionierung und Befestigung der dynamischen Elemente der Proben- und Rotationseinheit erfolgen über die Halterung des Rotationsmotors. Als Haltevorrichtung kommt ein modifizierter, verkipperbarer Spiegelhalter (KC2-T/M, Thorlabs Inc., USA) zum Einsatz, auf dem der Rotationsmotor horizontal montiert wird. Der Halter besteht aus zwei quadratischen Platten, die über jeweils drei Federn und Konterstifte sowie Stellschrauben fest miteinander verbunden sind. In den Ecken der Platten, im Abstand von 60 mm, befinden sich Durchgangslöcher für Stangen mit einem Durchmesser von 6 mm. Während die untere Platte über Schrauben an den Stangen fixiert wird, kann die obere Platte über die Stellschrauben relativ zur unteren Platte in ihrer Neigung ausgerichtet werden. Beide Platten verfügen in ihrer Mitte über ein 50,8 mm großes Durchgangsloch, das später die Detektion von Fluoreszenzlicht nach unten ermöglichen kann.

Der Halter wurde für seinen Einsatz als Halterung des Rotationsmotors in der hauseigenen Mechanischen Werkstatt nach entsprechenden Konstruktionszeichnungen (vgl. Anhang A.2.7) modifiziert. Dabei wurde eine Ecke der Haltevorrichtung ausgespart, um ausreichend Platz für den im Winkel von 45° versetzten Motor zu bieten. Der Rotationsmotor ist über vier vorhandene Durchgangslöcher (M 5) mit der oberen Platte des Halters fest verschraubt und somit verkipperbar gelagert. Über die drei übrigen Durchgangslöcher in den Ecken der Platten führen drei Stangen (ER10, Thorlabs Inc., USA) vertikal zu einer am optischen Tisch verschraubten, passenden Bodenplatte (CPVM, Thorlabs Inc., USA). Die 254 mm langen Stangen bilden eine Art Turm und sind über Schrauben fest mit der Bodenplatte und der unteren Platte des Halters verbunden. Die Höhe der Haltevorrichtung ist darüber variabel einstellbar und an die anderen Komponenten anpassbar. Das Turmsystem bietet die geforderte mechanische Stabilität der Einheit.

4.8.3 Gabel für Basishalter

Der statische Basishalter inklusive Küvette wird mithilfe einer Gabel über den dynamischen Komponenten der Proben- und Rotationseinheit befestigt. Die Gabel ermöglicht ein komfortables Bewegen des Basishalters in vertikaler Richtung entlang zweier Stangen des Turmsystems als eine Art Schiene, um beispielsweise einen Probenwechsel durchzuführen. Zum Herstellen der Messsituation befindet sich der quaderförmige Rand des Basishalters im Abstand von ca. 1 mm zur Schale.

Die Gabel ist aus zwei T-Stücken aufgebaut, die einen Abstand von 30 mm aufweisen. Sie bestehen aus verschraubten Stangen (ER1, ER2 und ER90C, Thorlabs Inc., USA), die einen Durchmesser von 6 mm besitzen. Die Abzweigungen der T-Stücke führen passgenau

durch die beiden horizontalen Durchgangslöcher des Basishalters. Die beiden geraden Elemente der T-Stücke verlaufen vertikal, das heißt parallel zum Turmsystem, und sind exakt rechtwinklig ausgerichtet. Sie werden über zwei identische Adaptervorrichtungen (CDA1, Thorlabs Inc., USA) untereinander und mit zwei Stangen des Turms, die sich im Abstand von 60 mm befinden, gekoppelt. Die Adaptervorrichtungen sorgen für die mechanische Stabilität und die passende Ausrichtung des Basishalters in Bezug auf die Rotationseinheit. Die T-Stücke sind zu jeder Zeit fest mit dem Adapter verbunden. Die Verschraubung der Adapter mit dem Turmsystem kann zeitweise gelöst werden, um die Höhe des Basishalters zu verändern.

4.8.4 Halterung des Medium-Vorratsbehälters

Zur Halterung des Medium-Vorratsbehälters des Immersionssystems wird ein höhenverstellbares Podest verwendet, das unabhängig von den SLOT-Komponenten aufgestellt wird. Der Fuß des Halters wird zur Sicherung des Behälters mit dem optischen Tisch verschraubt. Die Einstellung der Höhe erfolgt über einen Standard-Halter (PH75/M und TR50/M, Thorlabs Inc., USA). Zwei verbundene Basisplatten (BA2, Thorlabs Inc., USA), die mit dem Standard-Halter verschraubt sind, bieten ein Podest zur Platzierung des Vorratsbehälters.

5 Charakterisierung des entwickelten Systems

In diesem Kapitel geht es darum, das entwickelte System hinsichtlich seiner grundsätzlichen Funktion zu überprüfen und zu charakterisieren. Im Vordergrund steht dabei die Durchführung verschiedener Testmessungen, anhand derer sowohl technische als auch die biologischen Aspekte des Systems im Sinne der Anforderungsspezifikationen (vgl. Kapitel 3) untersucht werden.

Um die technische Seite des entwickelten Systems näher zu beleuchten, werden in Abschnitt 5.1 Bildaufnahmen von Testobjekten mit dem SLOT-Messaufbau vorgestellt. Die darauffolgenden Abschnitte dienen im Wesentlichen der Charakterisierung der Inkubationsprobenkammer außerhalb des SLOT-Systems. Abschnitt 5.2 beschäftigt sich dabei mit der Testung des Heizsystems und der implementierten Temperaturregelung. Daran anknüpfend erfolgt in Abschnitt 5.3 die Überprüfung der Sterilität der Inkubationsprobenkammer. Abschließend wird in Abschnitt 5.4 die Inkubation von humanen embryonalen Stammzell-Sphäroiden beschrieben. Am Ende jeden Abschnitts wird der entsprechende Inhalt analysiert.

5.1 Bildaufnahme mit SLOT

In diesem Abschnitt wird die entwickelte Probenkammer zur Verwendung für Bildaufnahmen eines Objekts nach dem SLOT-Prinzip getestet. Eine Charakterisierung geschieht insbesondere in Bezug auf die technischen Anforderungsspezifikationen, die eng mit der Proben- und Rotationseinheit verknüpft sind.

Es werden drei Projektionsdatensätze des Transmissionskanals von verschiedenen Proben aufgenommen und ausgewertet. Die zu vermessenen Objekte sind zur Fixierung in einem Agarosezylinder eingebettet. Der für die Messungen verwendete, experimentelle Aufbau von SLOT (vgl. Abschnitt 4.8) enthält die Proben- und Rotationseinheit der Inkubationsprobenkammer und das geschlossene Immersionssystem. Die zur Steuerung und Datenerfassung eingesetzte, hausinterne SLOT-Softwareumgebung enthält die Steuerung des Rotationsmotors.

5.1.1 Vorbereitung der Messungen und Bildaufnahmemodalitäten

Vor Beginn der Bildaufnahme ist die Probe herzustellen, die Proben- und Rotationseinheit vorzubereiten und das Messsystem zu justieren.

Die Herstellung eingebetteter Objekte ist in Abschnitt 4.3 erläutert. Für die Testmessungen werden zum einen sphärische Silikatpartikel und zum anderen Zell-Sphäroide eingesetzt. Die Silikatpartikel (Sicastar-redF, micromod Partikeltechnologie GmbH, Deutsch-

land) weisen einen Durchmesser von 10 μm auf und liegen in Suspension vor. Die Kügelchen werden mit destilliertem Wasser verdünnt und zur flüssigen Agarose gegeben. Die Konzentration der Partikel im Agarosegel beträgt 1,85 Kügelchen/ μl . Zur Vermeidung von Aggregaten innerhalb des Gels ist bei der Herstellung der Agarosezylinder auf eine sorgfältige Vermengung zu achten.

Die Zell-Sphäroide bestehen aus undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen), die sich zu kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern und so einen dreidimensionalen Zellverband bilden. Die Proben wurden von Christina Kropp (AG Zweigerdt, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Zur Einbettung werden die Zell-Sphäroide zu der nicht mehr heißen, aber noch flüssigen Agarose gegeben und samt Gel in eine Kapillare überführt. Da die Aggregate äußerst empfindlich sind, ist dabei jede mechanische Belastung zu vermeiden. Für jede Probe wird ein eigener Sockel in Verbindung mit der Schale zur Verfügung gestellt.

Um eine eingebettete Probe zentrisch auf der Rotationsachse zu platzieren, wird zuvor die exakte Lage der Rotationsachse auf dem Sockel der Proben- und Rotationseinheit bestimmt. Durch die leicht variable Klebeverbindung von Sockel und Schale und durch das Postieren der Schale selbst kann die Position der Rotationsachse von dem Zentrum des runden Sockelquerschnitts geringfügig abweichen. Die Achsenlage wird unter Zuhilfenahme der Steuerungssoftware und des übrigen Messaufbaus identifiziert, wobei der Basishalter über die Gabelhalterung ausreichend weit vom Sockel entfernt befestigt ist. Die Rotationsachse wird zunächst als virtuelle Achse im aktuellen Grauwertbild der signalerfassenden Photodiode über die entsprechende Funktion im Steuerungsprogramm angezeigt. Im Abgleich mit dem laufend aktualisierten Bild wird die Position der Rotationsachse auf der Sockeloberfläche mit einem wasserfesten Stift markiert. Nach einer Drehung der Rotationseinheit um 90° wird dieser Vorgang wiederholt. Der entstandene Kreuzungspunkt auf dem Sockel kennzeichnet die Rotationsachse und gibt die Position vor, auf der die eingebettete Probe zentrisch über eine Klebeverbindung fixiert wird.

Zur Justierung der Rotationsachse in Bezug zur optischen Achse wird der Sockel an einer Seite, die in Richtung der optischen Achse weist, mit einem Punkt markiert. Das Bild des Transmissionskanals wird zwischengespeichert und die Rotationseinheit um 180° gedreht. Das aktuelle Bild wird mit dem gespeicherten Bild überlagert und die beiden Punkten werden mithilfe der verkippbaren Haltevorrichtung des Rotationsmotors zur exakten Deckung gebracht. Liegt eine vollständige Überlappung vor, ist die Rotationsachse des System orthogonal zur z-Achse ausgerichtet.

Vor Durchführung der Probenimmersion mit dem geschlossenen Immersionssystem werden die Durchtrittsfenster der Küvette vorsichtig von Staub- und Schmutzpartikeln befreit

und der Basishalter in der Messposition nah über den rotierenden Komponenten platziert. Die Proben- und Rotationseinheit wird langsam mit Immersionsflüssigkeit aus dem angeschlossenen Vorratsbehälter gefüllt. Die Füllhöhe der Küvette wird über den Füllstand des Reservoirs so eingestellt, dass der Agarosezylinder eine vollständige Immersion erfährt und der Gasschlauch weiterhin in Kontakt mit dem Gas innerhalb der Küvette steht. Beim verwendeten Immersionsmedium handelt es sich um destilliertes Wasser, da es den gleichen Brechungsindex aufweist wie das Einbettungsmedium Agarose.

Der für die Bildaufnahme zu scannende Bereich wird in der SLOT-Software so ausgewählt, dass der gesamte Agarosezylinder abgedeckt ist. Die Verstärkung der Photodiode zur Optimierung des Kontrastumfangs wird manuell eingestellt. Der Strahldurchmesser und die Fokusebene der Ablenk- und Fokussiereinheit werden ebenfalls an die vorliegende Probe angepasst. Abschließend werden die Aufnahmeparameter, das heißt die Pixelanzahl und die Anzahl der Projektionen, festgelegt. Sind alle Einstellungen getan, wird der Aufbau lichtdicht abgeschlossen und das Generieren der Projektionsrohdatensätze gestartet. Während des gesamten Messvorgangs ist darauf zu achten, dass keine äußeren Bewegungen das Messsystem beeinflussen.

Nach Aufnahme der Projektionsbilder erfolgt eine Weiterverarbeitung der Datensätze mit der quelloffenen Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* [25]. Die Rekonstruktion der vorbereiteten Projektionsdatensätze wird unter der Verwendung der quelloffenen Software *tilt* aus IMOD [13] durchgeführt.

5.1.2 Testmessungen an Silikatpartikeln und hES-Zell-Sphäroiden

Nach erfolgreicher Proben- und Messvorbereitung wird die Bildaufnahme von Silikatpartikeln in SLOT ausgeführt. Durch ihre sphärische Form und ihren geringen Durchmesser von 10 μm stellen die Kügelchen in Bezug auf die Bildgebung näherungsweise punktförmige Absorptionszentren dar. Darüber hinaus kann ihre Konzentration so gewählt werden, dass einzelne, frei liegende Kügelchen im Zylinder vorkommen, was vorteilhaft hinsichtlich der Charakterisierung des Systems ist.

Abbildung 5.1 zeigt ein Sinogramm der Projektionsaufnahmen des Transmissionskanals, in dem mittig der sinusähnliche Verlauf eines einzelnen, absorbierenden Partikels zu sehen ist. Die weiteren Strukturen werden durch die Absorption anderer Partikel und des Agarosezylinders verursacht.

Zur Charakterisierung des Bewegungsverlaufs, der bei einer mechanisch stabilen Rotation der Probe um eine feste Achse einer Kreisbahn folgen sollte, wird im Sinogramm die Abweichung von einer Sinusfunktion bestimmt. Dafür wird zunächst der Verlauf der Position eines einzelnen Partikels aus dem Sinogramm extrahiert und dann mit einer Sinusfunktion

überlagert. Um die Genauigkeit der Ausgleichsrechnung zu erhöhen, werden die Positionsmittelwerte eines Amplitudenbereichs um einen Schwellenwert von 65 % der maximalen Intensität berücksichtigt. Die verwendete Algorithmus wurde von Georgios Antonopoulos im Rahmen seiner Promotion [2] am Laser Zentrum Hannover e.V. entwickelt und mit der freien Software *GNU Octave* umgesetzt. In Abbildung 5.2 ist der extrahierte Kurvenverlauf mit überlagerter Sinusfunktion und die Abweichung beider Kurven dargestellt. Die maximale Abweichung liegt bei 60 μm , wobei die Auflösung 4,02 μm beträgt.

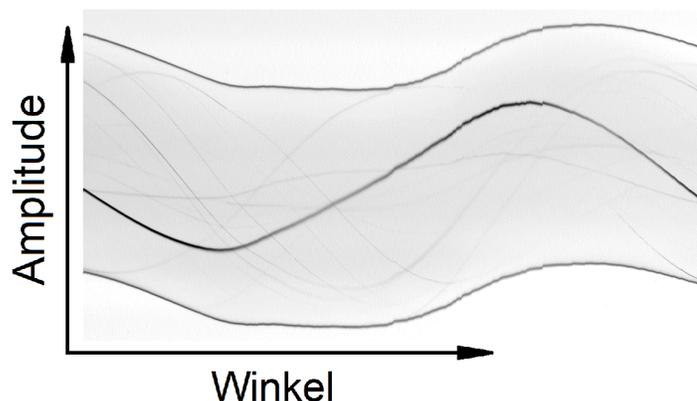


Abbildung 5.1: Sinogrammdarstellung einer Projektionsebene der vermessenen Probe. In der Mitte ist der sinusförmige Verlauf eines einzelnen Silikatpartikels im Agarosezylinder zu sehen.

Im Sinogramm des Partikels sind deutliche Stufen und Verschiebungen sichtbar, was sich in einer teils starken und sprungförmigen Abweichung der Partikelbewegung von einem sinusförmigen Verlauf widerspiegelt. Die Probenbewegung während der Messung weicht von der gewünschten Kreisbahn ab. Es ist davon auszugehen, dass der Rotationsmotor selbst für die Zeit der Messdauer keine von außen induzierten Bewegungen erfährt und statisch gelagert ist. Somit kann geschlossen werden, dass der Grund für die Abweichung in einer mangelnden Stabilität der dynamischen Komponenten der Rotationseinheit bzw. der Probe bezüglich der Rotationsachse liegt. Eine kleine, ruckartige Bewegung der Komponenten könnte sich durch die Trägheit des flexiblen Agarosezylinders in einem größeren Sprung bei der Probenbewegung äußern.

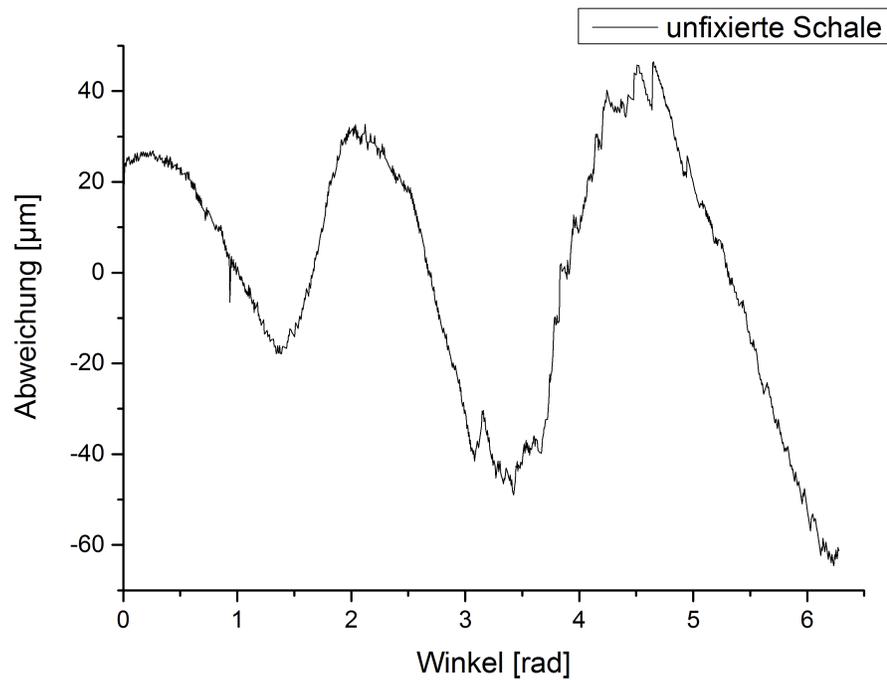
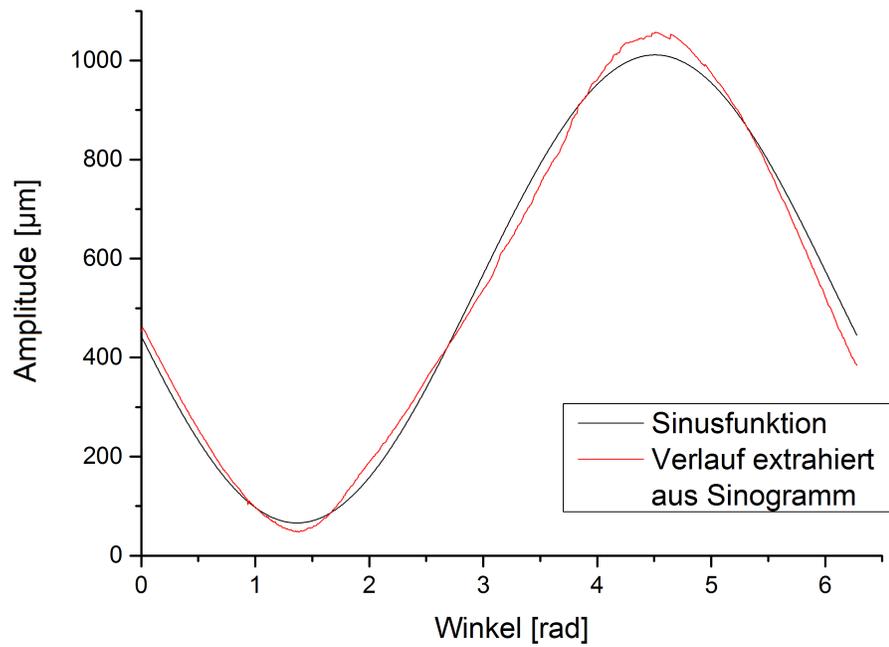


Abbildung 5.2: Ein aus dem Sinogramm der Projektionsdaten (vgl. Abb. 5.1) extrahierter Verlauf eines Silikatpartikels mit überlagerter Sinusfunktion (oben) und die Abweichung beider (unten).

Um die mechanische Stabilität in Bezug auf die Rotationsachse zu erhöhen, wird die Schale, die als einziges Bauteil des Rotationssystems nur durch die Schwerkraft auf der Achse gehalten wird, über eine Klebeverbindung direkt am Rotationsteller fixiert. Die Klebeverbindung wird mit Heißkleber realisiert, der an zwei gegenüberliegende Vertiefungen des Tellers angebracht wird.

In einer weiteren Testmessung erfolgt die Bildaufnahme von Silikatpartikeln mit fixierter Halterung der Schale. In Abbildung 5.3 ist ein Sinogramm der Aufnahme dargestellt.

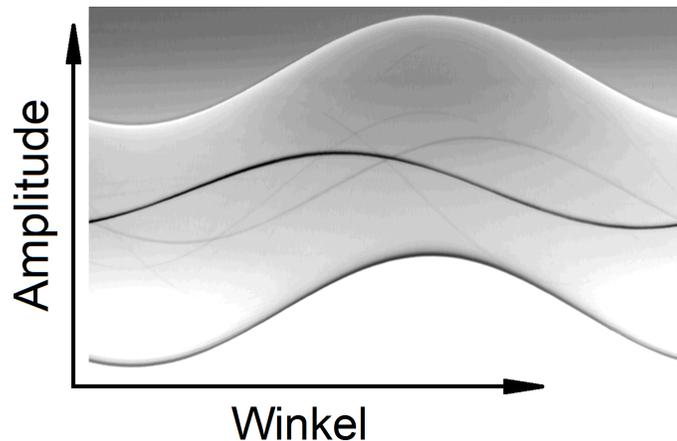


Abbildung 5.3: Sinogrammdarstellung einer Projektionsebene der vermessenen Probe bei fixierter Halterung der Schale. Mittig ist der sinusförmige Verlauf eines einzelnen Silikatpartikels im Agarosezylinder zu sehen.

Wiederum wurde der Verlauf eines einzelnen Silikatpartikels isoliert und eine Ausgleichsrechnung anhand des beschriebenen Algorithmus umgesetzt. Die Überlagerung der extrahierten Kurve mit einer Sinusfunktion und die Abweichung beider befindet sich in Abbildung 5.4. Die maximale Abweichung der Kurve vom Sinusverlauf ist bei dieser Messung mit fixierter Schale deutlich reduziert und beläuft sich auf etwa $6\ \mu\text{m}$. Diese Abweichung ist auf eine leicht verkippte Rotationsachse bezüglich der optischen Achse des Systems zurückzuführen. Das Ausbleiben von Versatz und Stufen im Sinogramm deutet auf eine ausreichende, mechanische Stabilität innerhalb der Verbindung der dynamischen Komponenten und der Probe in Bezug auf die Rotationsachse hin. Wie der Abbildung 5.4 (unten) zu entnehmen ist, ergibt das Rauschen der aufgenommenen Probenbewegung eine Abweichung von etwa $2\ \mu\text{m}$. Die Auflösung der Projektionsdaten selbst beträgt $3,3\ \mu\text{m}$.

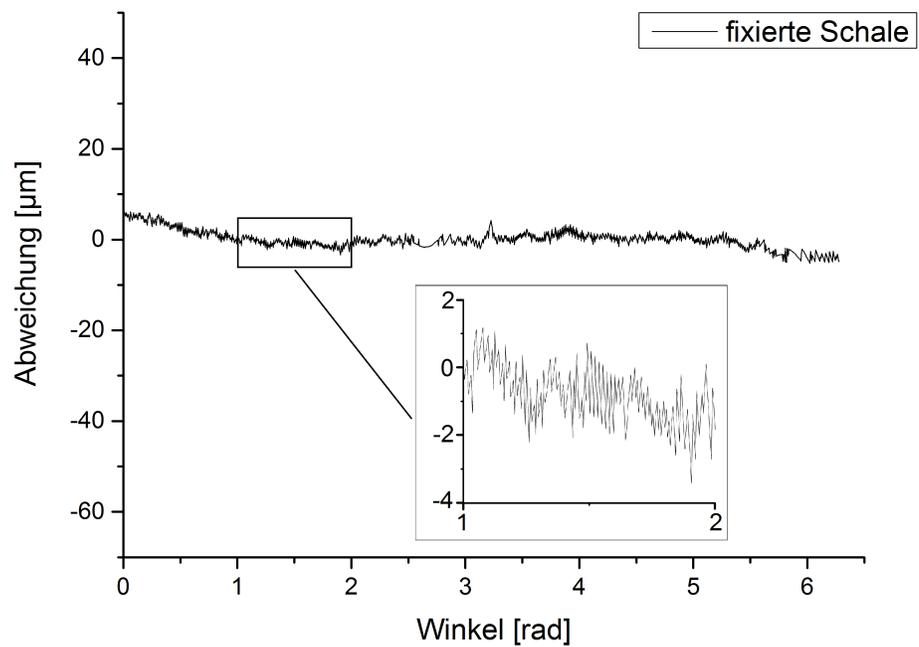
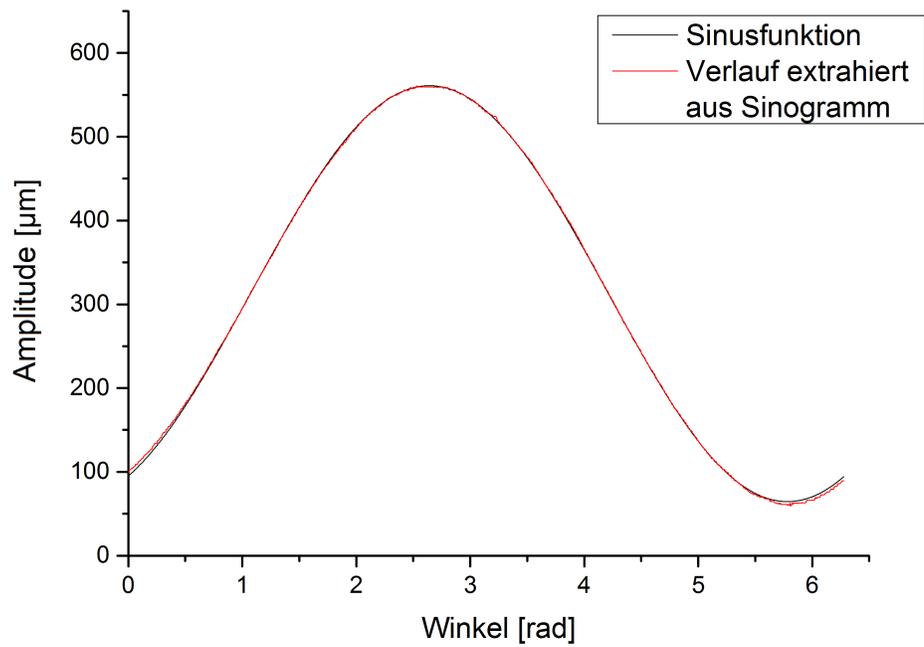


Abbildung 5.4: Ein aus dem Sinogramm der Projektionsdaten (vgl. Abb. 5.3) extrahierter Verlauf eines Silikatpartikels mit überlagelter Sinusfunktion (oben) und die Abweichung beider (unten).

Der bei dieser Messung generierte Projektionsdatensatz wird weiterverarbeitet und eine Rekonstruktion durchgeführt. Im Anhang A.6.1 ist eine Projektionsaufnahme und eine Maximumintensitätsprojektion des rekonstruierten Datensatzes gezeigt.

Ebenfalls mit zusätzlich befestigter Schale wird in einer weiteren Messung die Bildaufnahme einer biologischen Probe, der hES-Zell-Sphäroide durchgeführt. Anhand des erfassten Datensatzes erfolgt eine Weiterverarbeitung und Rekonstruktion. Eine Projektionsaufnahme und eine Maximumintensitätsprojektion des rekonstruierten Datensatzes ist im Anhang A.6.2 zu finden.

5.1.3 Analyse der Bildaufnahme mit SLOT

In den Testmessungen zur Bildaufnahme unter Verwendung der entwickelten Probenkammer ist das Herstellen der Messsituation in Form der Probenimmersion mit dem eingesetzten, geschlossenen Immersionssystem wiederholt störungsfrei realisierbar. Die Füllhöhe der Küvette ist einstellbar und bleibt nach fester Positionierung des Vorratsbehälters erhalten. Durch die Größe der Höhendifferenz kann der Druck auf das System und damit die Geschwindigkeit, in der sich die Proben- und Rotationseinheit füllt und leert, reguliert werden. Ein fast vollständiges Entleeren der Proben- und Rotationseinheit ist möglich, wodurch sich die Gefahr von Verschüttung des Mediums minimiert. Lediglich in der Schale bleibt eine geringe Menge der Immersionsflüssigkeit nach Entleeren der Einheit zurück. Durch die Einbettung der Probe im Agarosezylinder wird die Probe in einen statischen, bewegungsfreien Zustand gebracht. Auch der Zylinder als Ganzes ist fest mit dem drehenden Sockel verbunden. Aufgrund seiner geringen Größe und seiner zylindrischen Form ist davon auszugehen, dass durch die Rotation weder eine Verschiebung noch eine Verformung ausgelöst wird.

Die für die Bildaufnahme notwendige optische Zugänglichkeit der Probe ist sowohl durch das System selbst als auch durch die Fixierung der Probe realisiert. Die orthogonale Ausrichtung der Küvettenfenster zur optischen Achse ist durch den Basishalter und seine Gabelhalterung vorgegeben.

Ohne eine zusätzliche, direkte Fixierung der Schale auf dem Rotationsteller, kommt es bei der Testmessung an Silikatpartikeln zu einer mechanischen Instabilität der Probe während des Messvorgangs, die in der Sinogrammdarstellung einzelner Partikel als Stufen und Verschiebungen des sinusähnlichen Verlaufs sichtbar wird. Die Ursache hierfür liegt in der Instabilität der Probe samt der dynamischen Komponenten bezüglich der Rotationsachse. Durch die Klebeverbindung von Schale und Rotationsteller ist die Probe auf der Rotationsachse stabilisiert, sodass der Verlauf eines einzelnen Silikatpartikels im Sinogramm mit einer Sinusfunktion übereinstimmt. Die maximale Abweichung von der Sinusfunktion und

damit die Bewegung der Probe in Bezug auf die Rotationsachse während der durchgeführten Testmessung liegt bei $6\ \mu\text{m}$. Diese Differenz ist auf eine leicht verkippte Rotationsachse bezüglich der optischen Achse zurückzuführen. Das Rauschen der aufgenommenen Probenbewegung beläuft sich auf $2\ \mu\text{m}$ und befindet sich somit deutlich unterhalb der Bildauflösungsgrenze.

Die durchgeführten Testmessungen zeigen, dass die Proben- und Rotationseinheit ihre Funktionen erfüllt hat, die eingebettete Probe zu halten, die Rotation der Probe zu generieren und eine Möglichkeit der Immersion bereitzustellen. Außerdem wurden mit dem entwickelten System die technischen Anforderungsspezifikationen umgesetzt. Lediglich im Hinblick auf die mechanische Stabilität der Probe bezüglich der Rotationsachse musste eine Erweiterung im System vorgenommen werden. Die Rekonstruktion der mit der Proben- und Rotationseinheit aufgenommenen Datensätze konnte erfolgreich umgesetzt werden.

5.2 Heizsystem mit Temperaturregelung

Wie in Abschnitt 3.2.2 erläutert, ist die Regelung der Systemtemperatur eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Inkubation. Im Folgenden wird das entwickelte Heizsystem samt implementierter Temperaturregelung mit einem vereinfachten Messaufbau auf seine Funktion überprüft. Zum einen wird die Sprungantwort des Systems aufgenommen, das heißt die regelungsfreie Reaktion auf eine angelegte Spannung am Heizelement. Hierdurch wird die Eignung der Heizleistung qualitativ bestimmt. Zum anderen erfolgt eine Testung der entwickelten Temperaturregelung, insbesondere im Hinblick auf das Halten einer konstanten Temperatur in der Probenumgebung. Mit den Testmessungen wird außerdem überprüft, ob die indirekte Temperaturerfassung durch das integrierte Thermometer für die Temperaturregelung geeignet ist.

5.2.1 Messaufbau für Testung

Zur Testung des Heizsystems inklusive Temperaturregelung werden nur der Basishalter mit Küvette und das Heizsystem selbst eingesetzt. Auf die restlichen Komponenten der Inkubationsprobenkammer wird verzichtet, da ihr Einfluss auf die Temperaturregelung der lokalen Probenumgebung irrelevant ist. Für die Testmessungen werden Basishalter, Küvette und Heizsystem umgedreht und die Küvette mit destilliertem Wasser gefüllt. Um die gemessene Temperatur des Infrarot-Thermometers in der Isolationshaube mit der Temperatur der Flüssigkeit innerhalb der Küvette zu vergleichen, erfolgt parallel eine zweite, direkte Temperaturmessung in der Flüssigkeit. Hierfür wird ein digitaler Halbleiter-Temperatursensor verwendet, der mittig innerhalb der Küvette platziert ist, ohne eine Wand zu berühren. Die Temperaturerfassung des Sensors ist im Gegensatz zum Infrarot-Thermometer ungerichtet. Der Messaufbau ist in Abbildung 5.5 schematisch dargestellt. Der zusätzliche Halbleiter-Temperatursensor (DS18B20, Maxim Integrated, USA) stellt eine kalibrierte Temperaturinformation mit einer Auflösung von 12 bit zur Verfügung, welche einem minimalen Temperaturunterschied von 0,0625 °C entspricht. Der Sensorchip befindet sich in einem Kunststoffgehäuse TO-92 und verfügt über drei Anschlüsse. Neben der Datenübertragung erfolgt die Versorgung mit einer Betriebsspannung von 5 V über die gleiche Leitung. Diese Spannungsversorgung des sogenannten Eindrahtbusses wird als parasitär bezeichnet. Die zwei weiteren Kontaktfüße des Sensors sind bei dieser Betriebsart mit der Masseleitung verbunden. Das Temperatursignal wird an einem digitalen Eingang des Arduino-Board ausgelesen. Die Spannungsversorgung des Temperatursensors erfolgt ebenfalls über das Board. Ein Schaltplan zum Anschluss des Sensors ist im Anhang A.4.2 zu finden. Die Verbindung des Heizsystems mit dem Arduino-Board ist identisch mit der

im Normalbetrieb (vgl. Abschnitt 4.7).

Zur Durchführung der Testmessungen werden zwei reduzierte Programme der Heizsystemsteuerung verwendet (vgl. Anhang A.5.3 und A.5.4), mit denen das Auslesen beider Temperatursensoren und die Ausgabe der Temperaturinformation über den seriellen Monitor im Sekundentakt möglich ist. Zum Auslesen des Halbleitersensors werden zwei zusätzliche Bibliotheken (*Dallas Temperature Control Library*, Version 3.7.0, von Miles Burton und *OneWire Library*, Version 2.2, von Jim Studt) in die Programme eingebunden.

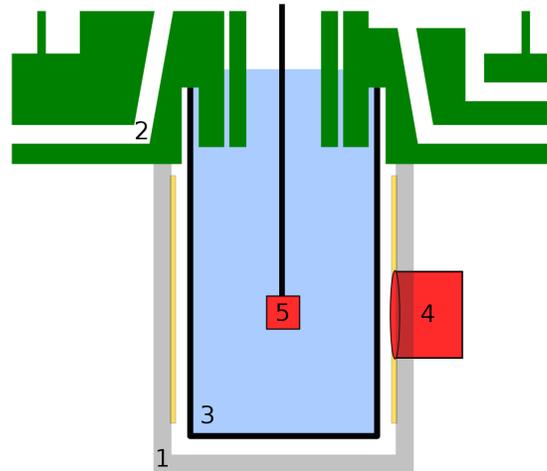


Abbildung 5.5: Schema des Messaufbaus zur Testung des Heizsystems mit Temperaturregelung. Das Heizsystem (1) und der Basishalter (2) sind invertiert und die Küvette ist mit destilliertem Wasser gefüllt (3). Das Infrarot-Thermometer (4) befindet sich in der Isolationshaube. Ein digitaler Halbleiter-Temperatursensor (5) ist zur direkten Erfassung der Flüssigkeitstemperatur innerhalb der Küvette platziert.

5.2.2 Messung der Sprungantwort des Systems

Die vom Heizelement ausgehende Wärmeleistung ist durch den fließenden Strom und den Widerstand des Elements begrenzt. Laut Herstellerangaben korreliert der vorhandene Strom von etwa 130 mA bei einem freien Draht an Luft mit einer Temperaturerhöhung des Drahtes um 40 °C [11]. Der in der Praxis erreichte Wert weicht durch die Isolation und Fixierung des Drahtes vom theoretischen Wert ab. Ferner ist die Regelstrecke mit einzu- beziehen, da für die Funktionalität des Heizsystems schließlich die Temperaturerhöhung in der Flüssigkeit von Interesse ist. Um die durch den Heizprozess maximal erreichbare Temperatur der Flüssigkeit zu bestimmen, wird das System durchgehend geheizt, bis sich ein Gleichgewicht mit der Umgebung einstellt. Beide Temperatursensoren werden ausgelesen und die Sprungantwort des Systems bei einer angelegten Spannung von 12 V wird aufgenommen. Beim Steuerungsprogramm zum Messen der Sprungantwort entfällt die

Temperaturregelung. Abbildung 5.6 zeigt die Temperaturdifferenzen der beiden gemessenen Temperaturen und der Umgebungstemperatur in Abhängigkeit von der Zeit.

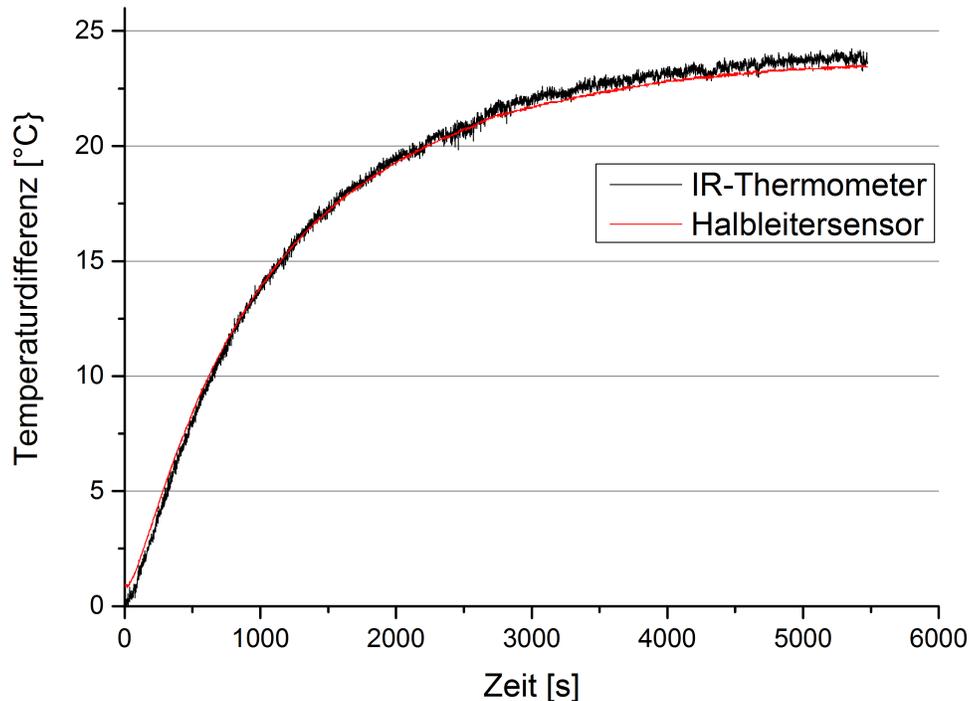


Abbildung 5.6: Sprungantwort des Systems bei Anlegen einer Spannung von 12 V an das Heizelement. Aufgetragen sind die Temperaturdifferenzen der gemessenen Temperaturen und der Umgebungstemperatur in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Temperaturdifferenz, die vom Infrarot-Thermometer gemessen wurde, ist in schwarz dargestellt und die des Halbleitersensors in rot. Beide Kurven liegen sehr nah beieinander und zeigen den Verlauf einer Sättigungskurve. Die maximale Abweichung beider Kurven beträgt circa 1 °C und tritt bei einer großen Temperaturdifferenz von über 20 °C auf. Der Anstieg der Temperaturdifferenz verkleinert sich kontinuierlich mit der Annäherung an die maximal erreichbare Temperaturdifferenz, bis nach ca. 90 min eine maximale Temperaturdifferenz von etwa 24 °C erreicht wird.

5.2.3 Testung der Temperaturregelung des Heizsystems

Das Regelverhalten und die Genauigkeit der Temperaturregelung des Heizsystems wird mit dem Messaufbau unter weitestgehend realen Bedingungen überprüft. Das Steuerungsprogramm sieht ein Deaktivieren des Heizelements ab einer Temperatur von 37 °C vor, die

durch das Infrarot-Thermometer gemessen wird. Parallel wird die Temperatur innerhalb der Flüssigkeit bestimmt. Ziel ist es, die Temperatur der unmittelbaren Probenumgebung konstant zu halten. In Abbildung 5.7 sind die beiden gemessenen Temperaturen in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

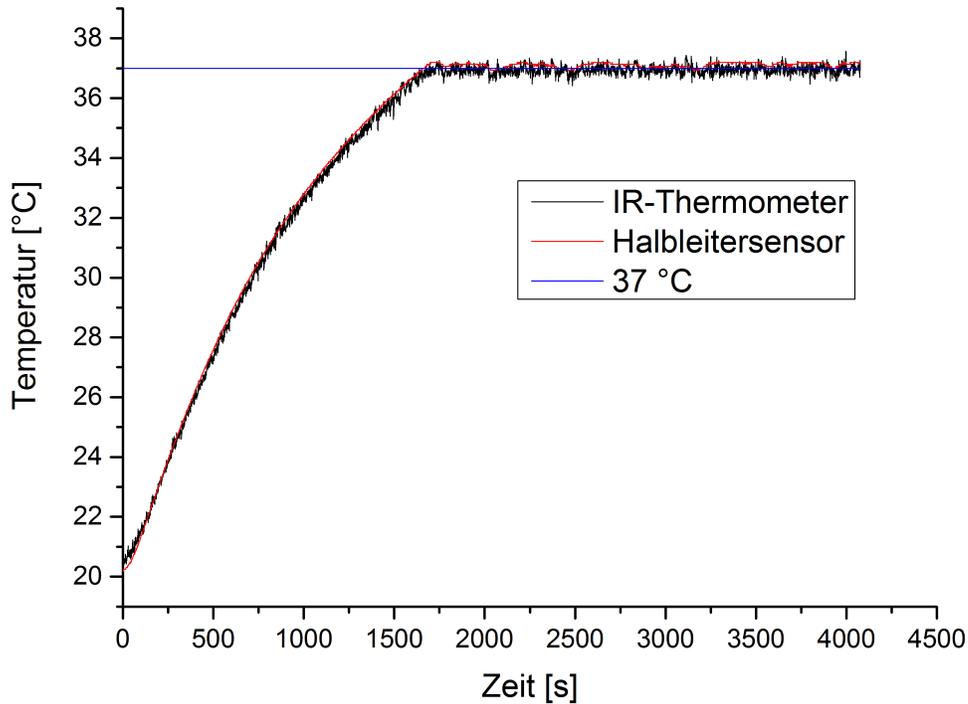


Abbildung 5.7: Testung der Temperaturregelung des Heizsystems. Die beiden gemessenen Temperaturen sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

Die schwarze Kurve zeigt die gemessene Temperatur des Infrarot-Thermometers und die rote die des Halbleitersensors. Beide sind nahezu deckungsgleich und weisen einen stetigen Anstieg auf. Nach etwa 30 min ist die gewünschte Temperatur von 37 °C erreicht, welche über die weitere Messdauer annähernd konstant gehalten wird. Auch bei dieser Testmessung erfolgt ein starker Temperaturanstieg, der mit dem Erreichen höherer Temperaturen kontinuierlich abnimmt, bis schließlich die Solltemperatur erreicht ist. Die blaue Gerade kennzeichnet den Temperaturwert von 37 °C. Die gemessene Temperaturabweichung der Solltemperatur innerhalb der Küvette schwankt nach erstmaligem Erreichen dieser Temperatur zwischen - 0,06 °C und + 0,19 °C. Der arithmetische Mittelwert beträgt dabei 37,11 °C. Die Umgebungstemperatur lag bei der durchgeführten Messung zwischen 20 °C und 21 °C.

5.2.4 Analyse des Heizsystems mit Temperaturregelung

Aus den beiden Testmessungen des Heizsystems geht hervor, dass die gemessene Temperatur des Infrarot-Thermometers in der Isolationshaube mit der gemessenen Temperatur der Flüssigkeit übereinstimmt, insbesondere für den relevanten Bereich der Temperaturregelung um den Temperaturwert von 37 °C. Das Thermometer ist folglich dafür geeignet, vom gewählten Messort aus eine ausreichend präzise Aussage über die Temperatur der direkten Probenumgebung zu liefern und in den Regelkreis eingebunden zu werden. Darüber hinaus ist das Heizsystem bereits so konzipiert, dass es keinen störenden Einfluss auf die restlichen Komponenten des gesamten Systems ausübt.

Der aufgenommenen Sprungantwort zufolge wird mit dem entwickelten Heizsystem eine maximale Temperatur von ca. 24 °C oberhalb der Umgebungstemperatur erreicht. Dies bedeutet, dass die maximale Systemtemperatur bei einer Raumtemperatur von 20 °C etwa 44 °C beträgt. Die Heizleistung ist somit ausreichend im Hinblick auf das Realisieren der Solltemperatur von 37 °C in der Probenumgebung. Außerdem ist der Temperaturanstieg bei der Testung der Temperaturregelung bereits vor Erreichen der Solltemperatur reduziert und ein ausgeprägtes Überschwingen im Graph ist nicht sichtbar. Die bei der Testmessung auftretenden, maximalen Temperaturschwankungen innerhalb der Flüssigkeit, die durch die Temperaturregelung hervorgerufen werden, liegen bei 0,19 °C. Die im Steuerungsprogramm implementierte Temperaturregelung erweist sich in der Testmessung als zweckmäßig. Das angepasste Aktivieren und Deaktivieren des Heizelements im Sekundentakt ist ausreichend, um eine annähernd konstante Temperatur der Probenumgebung zu realisieren.

Der Prozess des Aufheizens bis zum Erreichen der gewünschten Temperatur nimmt in der Testmessung eine Dauer von etwa 30 min in Anspruch. Um die benötigte Zeit zum Aufheizen der Flüssigkeit innerhalb der Küvette zu verkürzen, sollte das System vorgeheizt werden, indem das Heizsystem bereits vor Inkubationsbeginn gestartet wird.

5.3 Sterilisierbarkeit und Sterilität der Inkubationsprobenkammer

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Testung der Inkubationsprobenkammer im Hinblick auf die Herstellung einer sterilen Probenumgebung, die Bestandteil der biologischen Anforderungen ist (vgl. Abschnitt 3.2.3). Zum einen beinhaltet dies, die Funktion der Kontaminationsbarriere als Abdichtung zwischen statischer und dynamischer Komponenten der Proben- und Rotationseinheit zu überprüfen. Zum anderen wird nach Herstellung des sterilen Zustands der Inkubationsprobenkammer eine Inkubation mit Zellkulturmedium durchgeführt und das System im Anschluss bezüglich seiner Sterilität charakterisiert. Die Testungen erfolgen mit dem offenen Immersionssystem außerhalb des SLOT-Messaufbaus und ohne die Verwendung einer Probe. Der Basishalter wird mittels eines Stativs berührungslos über der Schale fixiert. Auf den Anforderungsaspekt der Bereitstellung und des Austauschs von Medium und Gas wird nicht in diesem, sondern im folgenden Abschnitt 5.4 näher eingegangen.

5.3.1 Funktionstest der Kontaminationsbarriere

Die mit Barrieremedium gefüllte Kontaminationsbarriere (vgl. Abschnitt 4.2.4) dient als Abschirmung des Kammerinneren von der äußeren Raumluft. Anhand einer Testmessung soll kontrolliert werden, ob die Immersionsflüssigkeit während der Pumpprozesse des Inkubationsbetriebs mit dem Barrieremedium verunreinigt wird oder die Immersionsflüssigkeit über die Barriere eine Brücke zur äußeren Umgebung herstellt. Die kritischen Punkte eines möglichen Vermischens sind unmittelbar an das Befüllen des Systems und an die Pumpvorgänge gekoppelt, da hierdurch neben einer internen Druckänderung auch eine Flüssigkeitsbewegung stattfindet. Um ein Vermischen der beiden Flüssigkeiten sowohl innerhalb des Barriererings als auch innerhalb der Probenkammer ausreichend sensitiv detektieren zu können, wird eine Säure als Barrieremedium und eine Base als Immersionsflüssigkeit verwendet. Qualitativer Indikator für einen Mischvorgang ist dabei die Änderung des pH-Wertes einer oder beider Flüssigkeiten.

Für den Test wird etwa 3,5 ml mit destilliertem Wasser verdünnte Salzsäure (HCl) in den Barrierering gefüllt. Der pH-Wert der Säure beträgt 2,91. Als Immersionsmedium kommt eine stark mit destilliertem Wasser verdünnte Natronlauge (NaOH) zum Einsatz, die einen pH-Wert von 7,16 aufweist. Da nicht bei allen Komponenten des Immersionssystems eine chemische Resistenz gegenüber aggressiven Lösungen gewährleistet ist, wird eine schwach alkalische Lösung gewählt. Das Immersionsmedium wird in den Vorratsbehälter mit einem Volumen von 250 ml gegeben.

Zur Simulation des Inkubationsbetriebs werden Proben- und Rotationseinheit sowie das Schlauchsystem mit Flüssigkeit gefüllt und Medium in die Küvette gezogen. Ein Mediumaustausch wird ebenfalls realisiert, bis der erste Teil der abgepumpten Flüssigkeit, etwa 6,5 ml, im Abfallbehälter aufgefangen wird. Nach Durchlaufen der Pumpprozesse wird der Basishalter vorsichtig und ohne Vermischen der Flüssigkeiten aus der Schale und dem Barrierering gehoben. Aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit wird die Flüssigkeitssäule innerhalb der Küvette gehalten. Die pH-Werte der im Barrierering verbleibenden Flüssigkeit und der Flüssigkeit im Abfallbehälter werden erneut bestimmt. Der Wert der Barriereflüssigkeit beträgt 2,90 und der des aufgefangenen Immersionsmediums 7,17. Bei beiden Werten liegt jeweils eine Abweichung von 0,01 vom Ausgangswert vor.

Um die Detektionsgenauigkeit dieser Testmessung zu bestimmen, werden jeweils 6,5 ml der verdünnten Natronlauge mit 35 µl, 70 µl und 100 µl der verdünnten Salzsäurelösung vermischt und die pH-Wert-Änderung bestimmt. Die Abweichungen vom Ausgangswert belaufen sich dabei auf 0,07, 0,23 und 0,27. Die Bestimmung aller pH-Werte der Testmessung erfolgte mit einem Zweipunkt-kalibrierten pH-Meter (pH 1000 L, pHenomenal, VWR International GmbH, Deutschland).

5.3.2 Inkubationstest mit Zellkulturmedium

Anhand einer Testung des Inkubationsbetriebs mit Zellnährmedium ohne Probe wird die Sterilisierbarkeit des entwickelten Systems überprüft und die vorhandene Sterilität bzw. Kontamination durch Mikroorganismen nach abgeschlossener Inkubation charakterisiert. Für die Inkubation wird das sterile Flüssigzellkulturmedium RPMI-1640 (PAN-Biotech GmbH, Deutschland) ohne weitere Zusätze von Antibiotika, Fungizide, Bakterizide, etc. eingesetzt. RPMI-Medium ist ein gebräuchliches Zellkulturmedium für verschiedene Zelllinien tierischer und humaner Natur, das ebenfalls ein Nährboden für Mikroorganismen darstellt und deren Wachstum ermöglicht. Das Medium enthält den pH-Indikator Phenolrot. Die Verwendung eines speziellen Gasgemisches und somit die Verwendung von Gasreservoirs ist für diese Testmessung nicht vorgesehen, stattdessen wird Raumluft genutzt.

Vor Beginn der Inkubation ist zunächst ein steriles Inkubationssystem vorzubereiten. Alle Mehrweg-Komponenten, das heißt Schläuche, Adapter, der Vorratsbehälter und der Basishalter samt Küvette, werden unsteril zusammengesetzt und dann nach dem Standard-Sterilisationsverfahren im Autoklaven bei einer Dampftemperatur von 121 °C und einem Druck von 2 bar für eine Dauer von 20 min sterilisiert. Der Vorgang der Dampfsterilisation erfolgt in einem wasserdampfdurchlässigen Beutel, der unter normalen Bedingungen das Eindringen von Raumluft in das Beutelinere verhindert. Hierdurch wird das Kontami-

nationsrisiko der autoklavierten Bauteile während des Transports zur Sterilbank, wo der gesamte Inkubationsaufbau zusammengesetzt wird, minimiert. Die Einweg-Komponenten des Inkubationssystems wie die Befüllhilfe, Dreiwegehähne, Spritzenfilter, Abfallbehälter und die Schale der Proben- und Rotationseinheit sind bereits steril verfügbar. Neben dem Aufbau des Inkubationssystems erfolgt auch das Abfüllen von 150 ml RPMI-Medium in den Vorratsbehälter mit einem Gesamtvolumen von 250 ml und das Befüllen der Kontaminationsbarriere mit 2,5 ml Silikonöl in steriler Umgebung. Der Basishalter wird mithilfe des Stativs oberhalb der Schale fixiert, sodass das Kammerinnere nach außen zu allen Seiten vollständig abgedichtet oder mit einem Sterilfilter versehen ist. Beim Transport des Gesamtaufbaus von der Sterilbank zum Inkubationsort ist darauf zu achten, ein Übertreten von Barriereflüssigkeit zu unterbinden. Zur einfacheren Handhabung wird das System dazu auf einer Plexiglasplatte platziert. Das U-Rohr-Manometer bedarf aufgrund der vorgesehenen Sterilfilter keiner Sterilisation und wird daher erst am Inkubationsort an das Inkubationssystem angeschlossen. Ebenso verhält es sich mit den Pumpen, Ventilen und dem Heizsystem.

Um die sterile Inkubation zu starten, wird die Proben- und Rotationseinheit über das offene Immersionssystem mit Medium gefüllt, bis der über das U-Rohr-Manometer definierte Füllstand der Küvette erreicht ist. Das Heizsystem wird eingeschaltet. Die Inkubation wird über einen Zeitraum von 48 h durchgeführt, wobei während der gesamten Dauer kein Austausch von Medium oder Luft stattfindet. Mithilfe des entwickelten Heizsystems und der Temperaturregelung wird die Temperatur des Mediums innerhalb der Küvette auf 37 °C erwärmt.

Parallel zur Inkubation in der entwickelten Inkubationsprobenkammer wird RPMI-Medium als Negativkontrolle steril in ein Falcon-Röhrchen abgefüllt und fest verschlossen bei 37 °C für 48 h in einem Standard-Tischinkubator inkubiert. Eine Positivkontrolle, das heißt die Inkubation von kontaminiertem Medium, entfällt, da das Zellkulturmedium ohne Supplemente prinzipiell als Nährmedium für Organismen dient.

Sowohl das in der Inkubationsprobenkammer als auch das im Tischinkubator inkubierte RPMI-Medium zeigten nach Inkubationsabschluss keinerlei sichtbare Trübungen oder Änderung des pH-Wertes, der durch den pH-Indikator angezeigt wird. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl und zur Detektion von Hefen und Schimmelpilzen wird das Zellkulturmedium nach Ende der Inkubationszeit auf sterile Nährbodenträger, sogenannte DipSlides (Roti-DipSlides PCA/RBCplus, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) aufgetragen. Die DipSlides weisen zwei unterschiedliche Zusammensetzungen von Agarnährböden auf, die für das Wachstum verschiedener Mikroorganismen ausgelegt sind. Zur Probeentnahme wird das in der Kammer inkubierte RPMI-Medium aus der Proben- und Rotationseinheit

in den Abfallbehälter gepumpt. In steriler Umgebung werden das abgepumpte Medium und das im Vorratsbehälter verbliebene Medium in je ein Falcon-Röhrchen abgefüllt. Nun werden jeweils zwei DipSlides in das abgepumpte Medium, in das Medium des Vorratsbehälters und in das Medium der Negativkontrolle für eine Dauer von 15 s vollständig eingetaucht, abgetropft und leicht verschraubt im Tischinkubator bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit der DipSlides von 48 h wird die Gesamtkeimzahl bestimmt und nach weiteren 72 h erfolgt die Detektion von Hefen und Schimmelpilzen.

In allen sechs entnommenen Proben, die ursprünglich von drei unterschiedlichen Inkubationsorten stammen, waren nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit keine Kolonien auf dem Agarnährböden sichtbar. Fotos der Nährböden der DipSlides nach einer Inkubation von insgesamt 5 d sind im Anhang A.7.1 zu finden.

5.3.3 Analyse der Sterilisierbarkeit und Sterilität

Der Funktionstest der Kontaminationsbarriere hat gezeigt, dass bei der Testmessung mit saurer und basischer Lösung kein Vermischen des Barrieremediums mit der Immersionsflüssigkeit stattfindet. Die minimale Abweichung der gemessenen pH-Werte nach dem simulierten Inkubationsbetrieb ist auf die Ungenauigkeit des pH-Meters zurückzuführen. Andernfalls müssten die Werte in die jeweils andere Richtung umschlagen. Darüber hinaus ist die gewählte Detektionsmethode sensitiv genug, um bereits kleine, übergetretene Volumina nachzuweisen. Die Dichte des Silikonöls, das als Barrieremedium während einer Inkubation vorgesehen ist, beträgt 1,066 g/cm³ und ist mit der Dichte der im Test verwendeten Flüssigkeit vergleichbar. Diese Vergleichbarkeit ist insbesondere für die Aussagekraft der Testmessung hinsichtlich der Auswirkungen von Druckdifferenzen auf die Barriereflüssigkeit von Bedeutung.

Neben der Kontaminationsbarriere ist eine Abdichtung des Systems nach außen durch die verwendeten Sterilfilter und die Konzeption des Inkubationssystems selbst gegeben. Auch die eingesetzten Konnektoren und Luer-Lock-Adapter sind prinzipiell für ein vollständiges Abdichten ausgelegt. Das Eindringen von Mykoplasmen in das System kann durch die Sterilfilter und ihrer Porengröße allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die Sterilisation der Mehrweg-Komponenten des Aufbaus ist nach der Standardmethode der Dampfsterilisation im Autoklaven durchführbar, ohne dass die Bauteile einen sichtbaren Schaden nehmen oder Veränderungen zeigen. Auch eine wiederholte Dampfsterilisation ist möglich, wie in weiteren Sterilisationsdurchführungen festgestellt werden konnte, die an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden. Die steril verfügbaren Einweg-Teile werden bereits steril geliefert.

Nach dem Inkubationstest unter vermeintlich sterilen Bedingungen war keine Veränderung des Mediums sichtbar, die auf die Kontamination und Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen hindeuten könnte. Da der Kontaminationsnachweis mit den DipSlides negativ ausfiel, liegt die Kontamination des Mediums folglich unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Testmethode, die sich auf unter 10^2 KBE/ml beläuft. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Mikroorganismen im RPMI-Medium vorhanden waren, die durch den Standard-Abklatschagar nicht nachweisbar sind. Die Funktionalität der Charge der DipSlides wurde durch einen weiteren Test einer Positivkontrolle sichergestellt, der an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt wird.

5.4 Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden

Mit der Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden wird eine Testung des vollständigen Inkubationssystems unter Verwendung einer biologischen Probe durchgeführt. Dabei wird das offene Immersionssystem verwendet und die Testmessung findet ebenfalls außerhalb des SLOT-Aufbaus statt. Anhand dieser Testung wird die Inkubationsprobenkammer als Ganze hinsichtlich ihrer Funktion überprüft und die in der Kammer inkubierten Probe mit einer Probe, die im Standard-Inkubationsschrank inkubiert wird, verglichen. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgt eine Lebend-Tot-Färbung mit Fluorophoren zur Untersuchung der Zellviabilität. Zur Abbildung der Fluoreszenzintensitätsverteilung der Proben wird die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Eine Aussage über die Proliferation und Wachstumskinetik ist bei dieser Testung nicht vorgesehen.

5.4.1 Inkubationsmodalitäten

Eine Multiwell Platte im 12 Well-Format mit mehreren Zell-Sphäroiden undifferenzierter humaner embryonaler Stammzellen wurde von Christina Kropp (AG Zweigerdt, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Die Aggregate liegen sedimentiert in Suspension vor und enthalten je 2 ml des Nährmediums E8 [3], das für eine optimale Zellversorgung ausgelegt ist. Zugewetzt ist dem Medium eine gebräuchliche Antibiotika-Kombination aus Penicillin und Streptomycin. Die Mediuernerneuerung erfolgt standardmäßig ein Mal täglich, da das Kulturmedium mit der Zeit durch Abfallprodukte angesäuert wird. Dieses Ansäuern ist durch eine orange Färbung des pH-Indikators Phenolrot sichtbar. Beim Mediumwechsel wird die Hälfte des inkubierenden Mediums, das heißt 1 ml, gegen frisches Nährmedium ausgetauscht. Das frische Medium wird dabei für den Austausch nicht auf 37 °C vorgewärmt, sondern lediglich von der Lagerungstemperatur von 4 °C auf Raumtemperatur gebracht.

Die Zell-Sphäroide in einem Nöpfchen der Multiwell Platte dienen als Kontrollprobe und werden im Standard-Inkubator bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt der Luft von 5 % inkubiert. Die Zell-Sphäroide aus einem weiteren Nöpfchen werden parallel dazu in der entwickelten Inkubationsprobenkammer inkubiert. Um die Probe in der Inkubationskammer zu fixieren, wird die Halterungsmethode im Agarosetopf gewählt (vgl. Abschnitt 4.3). Wie beschrieben, wird der Agarosetopf unter sterilen Bedingungen hergestellt. Bei dem Befüllen des sterilen Agarosetopfes mit der empfindlichen Probe ist darauf zu achten, dass diese nicht durch die Einwirkung äußerer Kräfte zerstört oder beschädigt wird. Die Sterilisation von Schale und Socken erfolgt im Vorfeld mit 70 % Ethanol. Darüber hinaus wird zum Herstellen einer sterilen Probenumgebung im Inneren des Inkubationssystems

genauso vorgegangen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben (vgl. Abschnitt 5.3.2). Das heißt, die Mehrweg-Bauteile werden zur Sterilisation autoklaviert und zusammen mit den steril verfügbaren Einweg-Komponenten zum Gesamtsystem in steriler Umgebung zusammengebaut. Der Vorratsbehälter weist ein Gesamtvolumen von 100 ml auf und wird für die Inkubation mit 30 ml Nährmedium E8 gefüllt. In den Barrierering werden 3 ml Silikonöl gegeben und der Basishalter wird über ein Stativ berührungslos zentrisch über der Schale gehalten. Die Gasreservoirs, das U-Rohr-Manometer und das Heizsystem sowie die Pumpen und Ventile sind unsteril und werden am Inkubationsort angeschlossen. Die beiden Gasreservoirs für den Druckausgleich und für den Gaszufluss werden mit einem Gasgemisch aus 95 % Raumluft und 5 % Kohlenstoffdioxid so gefüllt, dass sie zwar Gas enthalten, aber keinen zusätzlichen Druck auf das System ausüben. Die Gasmischung wird über Druckluft und Kohlenstoffdioxid aus einer Gasflasche mit einem Gasmischgerät (Gasmixer Okolab S.R.L., Italien) hergestellt.

Zum Starten der Inkubation wird Medium durch Pumpen in der Proben- und Rotations-einheit bereit gestellt und gleichzeitig die in der Inkubationskammer enthaltene Umgebungsluft gegen das Gasgemisch ausgetauscht. Mithilfe des Heizsystems wird die Probenumgebungstemperatur auf 37 °C eingestellt und für die Dauer des Inkubationsbetriebs konstant gehalten. Die gesamte Inkubationszeit betrug 46 h. Nach einer Zeit von 40 h war eine Farbänderung des Kulturmediums ins Orange deutlich erkennbar, sodass ein vollständiger Mediumwechsel und ein damit verbundener Gasaustausch durchgeführt wurde. Das Nährmedium der Kontrollprobe wurde ebenfalls nach 40 h ausgetauscht, wobei sich das Austauschvolumen auf jeweils 1 ml belief. Nach Ablauf der Inkubation waren mit bloßem Auge keine Trübungen oder Auffälligkeiten im Nährmedium sichtbar.

Fotos des Messaufbaus der gestarteten Inkubation und der befüllten Probeneinheit befinden sich im Anhang A.7.2.

5.4.2 Probenpräparation nach Inkubationsabschluss

Zur qualitativen Bestimmung der Zellviabilität nach der Inkubation wird eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein und Ethidiumhomodimer durchgeführt, um diese anschließend mit dem Zweiphotonenfluoreszenzmikroskop abzubilden. Das Calcein liegt zunächst als nicht fluoreszierendes Calcein-Acetoxymethylester vor, das in der Lage ist, die Zellmembran der Proben zu durchdringen. Die interzelluläre Esteraseaktivität lebender Zellen wandelt das eingedrungene Molekül in Calcein um, das unter der Anlagerung von Calcium-Ionen grün fluoresziert. Es erfolgt ausnahmslos die Markierung lebender Zellen mit Calcein, da defekte Zellen nicht über die notwendige Esteraseaktivität verfügen. Das Anregungsmaximum von Calcein liegt bei einer Wellenlänge

von etwa 494 nm und das Emissionsmaximum bei ca. 517 nm. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumhomodimer gelangt lediglich durch beschädigte Zellmembranen, nicht aber durch intakte. Ethidiumhomodimer bindet an Nukleinsäuren, wodurch seine rote Fluoreszenz 40-fach erhöht wird. Das Anregungsmaximum des Farbstoffs liegt bei einer Wellenlänge von 528 nm und das Emissionsmaximum befindet sich bei einer Wellenlänge von 617 nm. [20] Um die Zellviabilität der in der entwickelten Inkubationskammer inkubierten Sphäroide mit denen aus dem Standard-Inkubationsschrank zu vergleichen, werden zwei Proben gefärbt und untersucht. Die erste Probe stellen die in der Kammer inkubierten Aggregate dar. Dazu wird nach Ablauf der Inkubationszeit das Nährmedium aus der Proben- und Rotationseinheit abgepumpt und der Basishalter samt Küvette in steriler Umgebung entfernt. Die sich im Agarosetopf befindende Probe wird in das Nöpfchen einer Multiwell Platte im 24 Well-Format gegeben. Die Suspension weist ein Volumen von 1 ml auf. Für die Kontrollprobe werden die Zell-Sphäroide aus einem Nöpfchen der im Inkubationsschrank inkubierten Multiwell Platte in ein weiteres Nöpfchen der 24-Multiwell Platte überführt. Das Gesamtvolumen dieser Aggregate mit Nährmedium beträgt 0,5 ml.

Die Färbung der Proben erfolgt durch Zugabe von Calcein-Acetoxy-methylester und Ethidiumhomodimer, jeweils im Verdünnungsverhältnis von 1:1000, und durch die anschließende Inkubation bei 37 °C für 1 h im Inkubationsschrank. Zur Messung der Fluoreszenzintensitätsverteilung mit dem Zweiphotonenfluoreszenzmikroskop werden die Proben in jeweils eine Petrischale mit einem Durchmesser von 60 mm gegeben und mit je 10 ml RPMI-Kulturmedium aufgefüllt. Die Petrischalen wurden im Vorfeld mit einer 3 mm dünnen Schicht eines 2%-Agarosegel gefüllt, in die zylindrische Vertiefungen eingebracht sind, um die Sphäroide besser zu lokalisieren. Dies erleichtert das Finden der Sphäroide unter dem Mikroskop, wobei durch den Einsatz der Petrischale gleichzeitig genügend Platz vorhanden ist, mit dem Immersionsobjektiv des Mikroskops (W Plan-Apochromat 20X/1,0, Carl Zeiss AG, Deutschland) ausreichend nah an die Probe zu gelangen.

5.4.3 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bildaufnahme der Fluoreszenzintensitätsverteilung und zur damit verbundenen Bestimmung der Zellviabilität der beiden Proben wird ein Zweiphotonenfluoreszenzmikroskop eingesetzt. Bei dieser Methode der Fluoreszenzmikroskopie werden anstelle von einem Photon zwei Photonen doppelter Wellenlänge zur Anregung benötigt. Die beiden Photonen werden dabei quasi simultan absorbiert. Um die Wahrscheinlichkeit dieses Absorptionsprozesses zu steigern und die Zweiphotonenfluoreszenz zur Bildgebung zu verwenden, ist eine hohe Photonendichte unerlässlich. Die Anregung findet im Gegensatz zur gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie nur im fokalen Volumen statt, da nur hier die Leistungs-

dichte ausreichend groß ist. Mit diesem Verfahren können Fluorophore, deren Anregung beispielsweise bei einer Wellenlänge im ultravioletten Bereich liegt, mit Licht im nahen Infrarotbereich angeregt werden. Dies bedeutet insbesondere für biologische Proben eine höhere Eindringtiefe und eine geringere Schädigung der Probe. [4]

Das zur Messung der Zellviabilität benutzte Mikroskop (TriM Scope II, LaVision BioTec GmbH, Deutschland) weist als Lichtquelle einen gepulsten Titan-Saphir Laser (Chameleon Ultra II, Coherent Inc., USA) auf, der im Wellenlängenbereich von 680 nm bis 1080 nm durchstimmbare ist. Der Messaufbau ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

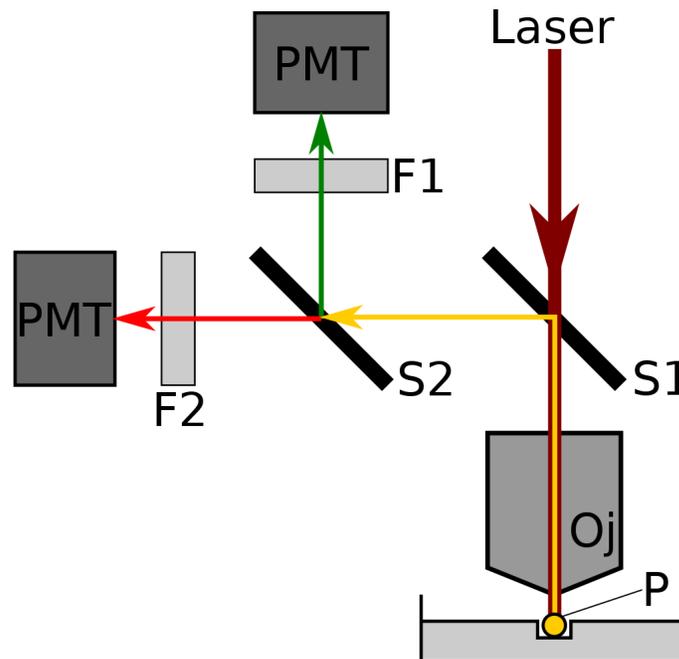


Abbildung 5.8: Messaufbau des Zweiphotonenfluoreszenzmikroskops mit zwei Detektionskanälen. Laserlicht mit einer Wellenlänge von 1000 nm wird durch das Objektiv (Oj) in der Probe (P) fokussiert und führt im fokalen Volumen zur Zweiphotonenanregung beider in der Probe vorhandener Fluorophore. Das rückgestreute Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt und durch die Reflexion am dichroitischen Strahlteiler (S1) vom Anregungslicht getrennt. An einem weiteren Strahlteiler (S2) wird das Licht unterhalb einer Wellenlänge von 560 nm reflektiert (grün) und trifft über einen Bandpassfilter (F1, 525/50) auf einen PMT. Das transmittierte Emissionslicht (rot) wird ebenfalls von einem PMT detektiert, nachdem es einen Bandpassfilter (F2, 620/60) durchlaufen hat.

Das Licht passiert Komponenten zur Strahlformung und eine Scan-Einheit, bevor es durch das Objektiv in der Probe fokussiert wird. Das eingesetzte Wasserimmersionsobjektiv verfügt über eine numerischen Apertur von 1,0. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird in Rückrichtung detektiert. Das rückgestreute Fluoreszenzlicht wird folglich durch

das gleiche Objektiv gesammelt und mittels eines dichroitischen Strahlteilers vom Anregungslicht separiert. Über drei verschiedene Filter und Detektoren ist die gleichzeitige Detektion drei unterschiedlicher Kanäle möglich, wovon für die Messung der Zellviabilität lediglich zwei Kanäle zum Einsatz kommen. Zur parallelen Anregung beider in die Probe eingebrachter Fluorophore wird Licht einer Wellenlänge von 1000 nm verwendet. Das emittierte Licht trifft auf einen im Winkel von 45° platzierten Strahlteiler, der Licht unterhalb einer Wellenlänge von 560 nm reflektiert und sonst transmittiert. Das reflektierte Licht durchläuft einen Bandpassfilter, der zwischen 500 nm und 550 nm lichtdurchlässig ist und wird von einem PMT detektiert. Das erfasste Signal entspricht der Fluoreszenzintensität des Calceins. Das am Strahlteiler transmittierte Licht passiert einen Bandpassfilter, der im Wellenlängenbereich von 590 nm bis 650 nm durchlässig ist, und wird von einem weiteren PMT detektiert. Dieser Detektionskanal entspricht dem Emissionslicht des Ethidiumhomodimers. Beide Detektoren werden simultan ausgelesen und durch ein Abrastern der Probe in der x-y-Ebene entsteht Pixel für Pixel eine zweidimensionale Bildaufnahme der Fluoreszenzintensitätsverteilung innerhalb der Probe. Eine volumetrische Aufnahme wird durch das Scannen in verschiedenen Ebenen realisiert. Hierfür wird der Probenstisch in z-Richtung verschoben.

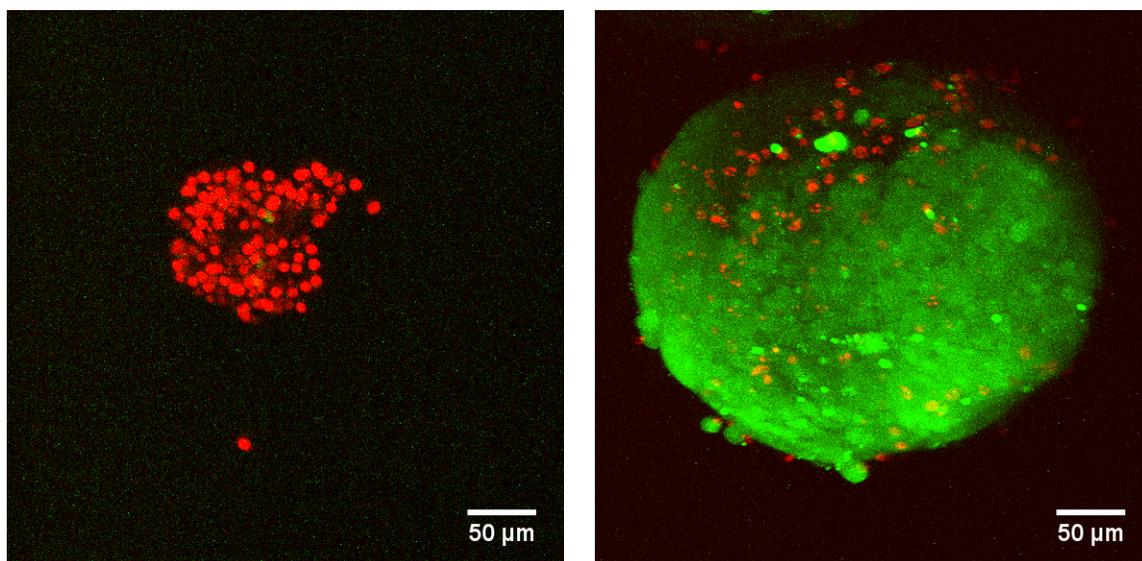


Abbildung 5.9: Mit dem Zweiphotonenfluoreszenzmikroskop aufgenommene Fluoreszenzintensitätsverteilung je eines eingefärbten Zell-Sphäroiden nach der Inkubation in der Inkubationsprobenkammer (links) und im Inkubationsschrank (rechts). Die Darstellungen zeigen die Projektionen der maximalen Intensität. Die Calceinverteilung ist grün gefärbt und mit der rot dargestellten Ethidiumhomodimerverteilung überlagert.

Die Bildaufnahme zur Bestimmung der Zellviabilität erfolgte unmittelbar nach der Fär-

bung der Proben. Zur Bearbeitung der Bilder wurde die quelloffene Software *ImageJ* verwendet. In Abbildung 5.9 ist je eine Darstellung der Fluoreszenzintensitätsverteilung in der Maximumintensitätsprojektion eines Zell-Sphäroiden zu sehen, der in der Inkubationsprobenkammer (links) und im Inkubationsschrank (rechts) inkubiert wurde. Dabei sind die Verteilungen beider Fluoreszenzfarbstoffe in einem Bild überlagert und in grün (Calcein) bzw. rot (Ethidiumhomodimer) dargestellt.

Die Bildaufnahme erfolgte jeweils in einem quadratischen Scanbereich mit einer Seitenlänge von 400 μm , bestehend aus 583 px. Die Farbtiefe pro Pixel betrug 16 bit. Die aufgenommenen Ebenen in z-Richtung variierten mit der Probengröße, wobei sich der Ebenenabstand auf 1 μm belief.

5.4.4 Analyse der Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden

Das prinzipielle Bereitstellen und Austauschen von Medium und Gas wurde bei der Testung durchgeführt. Allerdings konnte die Automatisierung des Medium- und Gasaustauschs während des Inkubationsbetriebs nicht getestet werden, da zwei gestörte Systemfunktionen vorlagen. Zum einen war bei der Testung der Gaszufluss blockiert, sodass das U-Rohr-Manometer und folglich der Gasaustausch über das am U-Rohr angeschlossene Gasreservoir nicht funktioniert haben. Dies führte dazu, dass die Füllhöhe innerhalb der Küvette nicht über das U-Rohr-Manometer definiert werden konnte, sondern über den durch das abgepumpte Gas erzeugte Unterdruck manuell eingestellt bzw. begrenzt werden musste. Ursache für die Störung könnten Wassertröpfchen im Schlauchsystem des Gaszuflusses gewesen sein, die durch den Dampfsterilisationsprozess hervorgerufen wurden. Durch das Ausdampfen der verbliebenen Feuchtigkeit im System könnte außerdem der Sterilfilter, der im Schlauchsystem zwischen Basishalter und U-Rohr-Manometer geschaltet ist, feucht geworden und dadurch verstopft sein. Ein weiterer Grund für die Blockade des Gasflusses könnte ein abgeknickter dünner Gasschlauch sein, der von der Unterseite des Basishalters in einem steilen Winkel in das Küvetteninnere führt. Das für die Inkubation geforderte Gasgemisch wurde dennoch aus dem Gasreservoir des Druckausgleichs zur Verfügung gestellt, sodass die kontrollierte Begasung der Probenumgebung trotzdem durchgeführt werden konnte.

Zum anderen stellte eine weitere Schwierigkeit beim Inkubationsbetrieb das Nachströmen von Luft in den Vorratsbehälter dar. Das Nachströmen erfolgte nicht gleichmäßig und wurde durch vorhandene Luftbläschen in der Mediumzuleitung erschwert. Darüber hinaus blieb ein Nachströmen von Luft nach Öffnen des Ventils zunächst aus, sodass auch an dieser Stelle manuell nachgeholfen werden musste. Durch das zeitweise Erhöhen der Druckdifferenz im System, das heißt durch eine größere Höhendifferenz von Luftrohrende und

Proben- und Rotationseinheit, konnten die Startschwierigkeiten aufgehoben werden. Somit konnte das automatisierte Steuerungssystem nicht getestet werden. Stattdessen wurde der Mediumwechsel und die Begasung manuell über die einzelnen Steuerungsbefehle des entwickelten Steuerungsprogramms realisiert.

Die Biokompatibilität aller Werkstoffe des konstruierten Inkubationssystems wird entweder durch den Hersteller gewährleistet oder kann als gegeben angenommen werden, da die Werkstoffe als Standardmaterialien auch in der Zellkultur zum Einsatz kommen. Die zytotoxische Wirkung der verwendeten Bauteile der Inkubationsprobenkammer wurde jedoch nicht experimentell ausgeschlossen. Die Sterilität des Inkubationssystems wurde bei dieser Testung nicht näher evaluiert. Allerdings erfolgte der Einsatz von Antibiotika und mit bloßem Auge waren nach Ende des Inkubationsbetriebs keine Kontaminationen sichtbar. Die Lebend-Tot-Färbung mit den verwendeten Farbstoffen scheint erfolgreich, da die Fluoreszenz beider Farbstoffe im Bereich der Sphäroide lokalisiert ist und zudem insbesondere die einzelnen, kugelförmigen Zellen der Aggregate markiert. Eine Hintergrundfluoreszenz ist nur schwach vorhanden. In den Aufnahmen ist deutlich erkennbar, dass das erfasste Signal im Wellenlängenbereich des Calceins für den Sphäroiden der Inkubationsprobenkammer nur sehr schwach ausgeprägt ist, während die Kontrollprobe eine starke Fluoreszenzverteilung zeigt. Umgekehrt verhält es sich mit der Verteilung des detektierten Emissionslicht des Ethidiumhomodimers, das in der Probe der Inkubationsprobenkammer die meisten, gefärbten Zellen markiert. Der Fluoreszenzintensitätsverteilung zufolge zeigt der Zell-Sphäroid nach Inkubation in der entwickelten Inkubationsprobenkammer im Gegensatz zur Kontrollprobe des Inkubationsschranks fast keine lebende Aktivität. In der Kontrollprobe sind lediglich wenige, vereinzelte Zellen beschädigt, die sich hauptsächlich im äußeren Bereich des Sphäroids befinden.

Die Sphäroidgröße der in der Kammer inkubierten Probe ist mit einem Durchmesser von rund 100 μm deutlich geringer als der Zell-Sphäroid der Kontrollprobe. Der Durchmesser dieses Sphäroids beträgt etwa 300 μm . Neben der ohnehin inhomogenen Größenverteilung der Zell-Sphäroide ist dies darauf zurückzuführen, dass die Zell-Sphäroide nach Inkubation in der Probenkammer in kleinere Aggregate zerfallen sind, während die Kontrollprobe weitestgehend als Gesamttaggregat intakt blieb.

Dass die in der Inkubationsprobenkammer inkubierten Zell-Sphäroide nach Inkubationsabschluss keine Anzeichen von lebender Aktivität aufwiesen, kann vielfältige Gründe haben. Beispielsweise könnte dies auf eine mögliche Kontamination innerhalb der Probenkammer zurückzuführen sein, die trotz der Verwendung von Antibiotika nicht unterbunden werden konnte. Möglicherweise hat die Probe auch entgegen aller Vorsichtigkeit bereits Schaden beim Umfüllen in den Agarosetopf genommen oder die fixierte Halterung im Agarosetopf

hat die Vitalität der Probe negativ beeinflusst. Eine weitere Ursache mag in der veränderten Art und Weise des Nährmediumwechsels liegen. Außerdem wurde das Medium im Vorratsbehälter nicht bei 4 °C, sondern lediglich bei Raumtemperatur gelagert.

6 Diskussion und Ausblick

In diesem abschließenden Kapitel erfolgt in Abschnitt 6.1 zunächst eine Zusammenfassung der erarbeiteten Ergebnisse der vorliegenden Abschlussarbeit und eine Diskussion. Die Diskussion ist in zwei Abschnitte gegliedert, welche die beiden Schwerpunkte der Arbeit widerspiegeln. Einerseits wird in Abschnitt 6.2 die Verwendung des entwickelten Systems mit SLOT diskutiert. Dieser Teil bezieht sich im Wesentlichen auf die technischen Aspekte des Aufbaus. Andererseits ist in Abschnitt 6.3 die Diskussion der Verwendung des entwickelten Systems als Inkubator enthalten, die auch die biologischen Aspekte berücksichtigt. Das Kapitel schließt mit einem Ausblick in Abschnitt 6.4.

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Inkubationsprobenkammer entwickelt und aufgebaut, die als Proben- und Rotationseinheit zur Bildgebung einer Probe nach dem SLOT-Prinzip optimiert ist. Einerseits ist die Probenkammer mit einem minimalisierten Aufbau als Proben- und Rotationseinheit für die Bildaufnahme mit SLOT nutzbar, andererseits kann das Inkubationssystem als Probeninkubator verwendet werden. Mit der Realisierung der Kammer wurde erstmalig ein Konzept [17] der Probenrotation in SLOT von unterhalb der Probe in Verbindung mit einem tellerbasierten System [17] umgesetzt. Zu Beginn dieser Arbeit wurden Anforderungsspezifikationen an die Inkubationsprobenkammer ausgearbeitet, die unmittelbar in ihre Entwicklung eingeflossen sind. Die technischen Anforderungen resultieren aus dem Funktionsprinzip von SLOT und beinhalten den statischen Zustand und die Rotation der Probe während einer Messung sowie ihre optische Zugänglichkeit und Immersion. Die biologischen Spezifikationen basieren im Wesentlichen auf allgemeinen Inkubationsbedingungen und umfassen das Bereitstellen und Austauschen von Nährmedium und Gas, die Kontrolle der Umgebungstemperatur sowie die Sterilität und Biokompatibilität des Inkubationssystems.

Unter Berücksichtigung dieser abgeleiteten Anforderungsspezifikationen und des neuen Rotationskonzepts wurde die Inkubationsprobenkammer konstruiert und aufgebaut. Das Herzstück der Kammer stellt die Proben- und Rotationseinheit dar, die als zentrale Komponente des SLOT-Aufbaus alle geforderten Kriterien in sich vereint. In Kombination mit dem geschlossenen Immersionssystem, bei dem Immersionsflüssigkeit und Gas eine geschlossene Einheit bilden, wurde eine einfache Möglichkeit zur Probenimmersion und somit zur Bildaufnahme in SLOT generiert. Das Bereitstellen von Immersionsflüssigkeit basiert dabei auf einem Druckgleichgewicht zwischen den Flüssigkeitspegeln innerhalb der Küvette und einem angekoppelten Flüssigkeitsreservoir.

Um die Kammer im Inkubationsbetrieb nutzen zu können, wurde anstelle des geschlossenen Systems ein offenes Immersionssystem etabliert, das entsprechend der biologischen Anforderungen einen Austausch und damit einen Zu- und Abfluss von Medium und Gas in der Proben- und Rotationseinheit vorsieht. Die Bereitstellung und der mögliche Austausch wurde durch den Einsatz von Pumpen realisiert, mit denen ein Unterdruck auf das Medium und Gas der Proben- und Rotationseinheit aufgebaut werden kann. Der maximal erreichbare Gasunterdruck in der Küvette und die damit verbundene Füllhöhe wird durch das U-Rohr-Manometer definiert. Für einen kontrollierten und bedarfsgerechten Zufluss von frischem Medium aus einem Reservoir wurde ein angepasstes Nachfüllprinzip entwickelt und umgesetzt.

Zur Regelung der Probenumgebungstemperatur ohne Einflussnahme auf die Funktionalität des übrigen Systems wurde ein Heizsystem samt Regelungsalgorithmus implementiert, das eine indirekte Temperaturmessung der Probenumgebung beinhaltet. Umgesetzt wurde diese Temperaturregelung, ebenso wie eine Steuerung und Automatisierung des offenen Immersionssystems mit jeweils einem Arduino Mikrocontroller-Board. Die beiden dafür geschriebenen Steuerungsprogramme stellen verschiedene Steuerungsfunktionen bereit, die über die serielle Kommunikationsschnittstelle der Boards mit dem Computer ausgeführt werden können.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das aufgebaute System durch verschiedene Testmessungen auf seine prinzipiellen Funktionen und auf das Erfüllen der geforderten Spezifikationen technischer und biologischer Art untersucht.

Die Testmessungen zur Bildgebung von sphärischen Silikatpartikeln und Zell-Sphäroiden haben gezeigt, dass mit der Probenkammer als Proben- und Rotationseinheit in Verbindung mit dem geschlossenen Immersionssystem eine erfolgreiche Aufnahme von Projektionsdatensätzen der Proben möglich ist. Es hat sich herausgestellt, dass eine zusätzliche Fixierung innerhalb der Proben- und Rotationseinheit nötig war, um die dynamischen Komponenten und damit die Probe bezüglich der Rotationsachse mechanisch zu stabilisieren. Mit der zusätzlichen Befestigung wurden alle technische Anforderungen erfüllt und eine Rekonstruktion der aufgenommenen Datensätze konnte durchgeführt werden.

Beim Funktionstest des Heizsystems samt Temperaturregelung konnte in der Probenumgebung eine konstante Temperatur von 37 °C mit einer maximalen Abweichung von 0,19 °C eingestellt und gehalten werden. Der Regelungsalgorithmus und die Steuerung erfüllen ihre Aufgaben, sodass das Heizsystem der biologischen Anforderung der Temperatureinstellung gerecht wird.

Die Sterilität des gesamten Inkubationssystems konnte bei weiteren Testmessungen bis zur Nachweisgrenze von unter 10^2 KBE/ml sichergestellt werden. Somit sind die Sterilisier-

barkeit und Sterilität im überprüften Rahmen möglich, wodurch ein weiteres biologisches Anforderungskriterium verwirklicht wird.

Abschließend wurde der Inkubationsbetrieb des entwickelten Systems mit hES-Zell-Sphäroiden getestet. Während der Inkubation ergaben sich vereinzelt Schwierigkeiten bei der Funktion des offenen Inkubationssystems, wodurch es zwar zu Einschränkungen kam, aber die Testinkubation dennoch durchgeführt werden konnte. Bei der Untersuchung der Zellviabilität nach Inkubationsabschluss zeigte die Probe kaum Anzeichen lebender Aktivität.

6.2 Verwendung des Systems mit SLOT

Im Gegensatz zu allen bisher vorhandenen Proben- und Rotationseinheiten für SLOT ermöglicht die entwickelte und umgesetzte Probenkammer erstmalig eine Rotation von unterhalb der Probe. Dadurch wird die Probe nicht länger hängend, sondern aufrecht stehend vermessen, was neue Möglichkeiten zur Probenbefestigung eröffnet. Durch den komplexeren, tellerbasierten Aufbau der Proben- und Rotationseinheit sind beim entwickelten System mehrere Komponenten an der Probenrotation beteiligt. Die Stabilisierung der Probe in Bezug auf die Rotationsachse ist mit einer ausreichenden Befestigung der Komponenten untereinander möglich. Ist eine angemessene Befestigung realisiert, bietet der Aufbau Vorteile gegenüber anderen Systemen (vgl. [9]) hinsichtlich der Stabilität der Probe auf der Achse. Bei diesem Rotationskonzept liegt der durch den Motor gegebene Schwerpunkt der Proben- und Rotationseinheit tiefer und unterhalb der Probe, wodurch die Anfälligkeit für mechanische Störungen reduziert wird. Gleichzeitig wird die mechanische Stabilität der Probe bezüglich der Rotationsachse durch den kurzen Abstand zwischen Rotationsmotor und Probe erhöht. Darüber hinaus vereinfacht das tellerbasierte System der Proben- und Rotationseinheit die Probenhandhabung gegenüber den herkömmlichen Messaufbauten, bei denen die Probe über eine Halterung hängend befestigt werden muss. Dies ist zum einen vorteilhaft für den Anwender und zum anderen ebnet es den Weg für einen automatisierten Probenwechsel und somit eine vollständig automatisierte Vermessung von Proben. Dies war bislang so nicht möglich (vgl. [9]).

Das Platzieren der eingebetteten Probe auf der Rotationsachse bedarf bei der entwickelten Proben- und Rotationseinheit ein wenig mehr Aufwand als in anderen Systemen, da eine nachträgliche Justierung der Probe in Bezug auf die Achse durch eine Verkippeinheit nicht vorgesehen ist. Bei einer nicht zentrisch positionierten Probe tritt Exzentrizität auf, wodurch die Aufnahme der Projektionsbilder einen größeren Bildausschnitt und einen größeren DOF erfordert.

Um die Immersionsflüssigkeit aufzunehmen und die optische Zugänglichkeit für Laserlicht und Detektoreinheiten zu ermöglichen, wird auch bei diesem System eine statische, qua-

derförmige Küvette aus optischem Glas eingesetzt, die den zuvor verwendeten in ihren Eigenschaften gleichkommt, allerdings umgekehrt verwendet wird. Die Umkehrung macht ein angepasstes Immersionssystem notwendig, das die Probenimmersion gestattet, ohne die Rotation mit einer aufwändigen Abdichtung zwischen dynamischen und statischen Komponenten der Proben- und Rotationseinheit negativ zu beeinflussen. Das realisierte, geschlossene Immersionssystem beinhaltet genau diese Merkmale und erweist sich auch in der Handhabung als äußerst praktikabel und benutzerfreundlich. Im Vergleich zur aufrecht platzierten Küvette ist das entwickelte System deutlich weniger anfällig für ein Verschütten von Flüssigkeit beim Probenwechsel bzw. beim Befüllen und Entleeren der Küvette. Allerdings ist bei diesem System ein größeres Flüssigkeitsvolumen für die Immersion notwendig, da neben der Küvette auch noch die Schale, das Schlauchsystem und zumindest der untere Teil des Flüssigkeitsreservoirs mit Immersionsflüssigkeit gefüllt ist. Solange kein kostspieliges oder gering vorhandenes Immersionsmedium eingesetzt wird, entstehen durch das vergrößerte Volumen keine Nachteile. Eine Wiederverwendung der Flüssigkeit ist abhängig von der Messsituation möglich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit dem entwickelten Aufbau das grundlegende Konzept für eine Proben- und Rotationseinheit in SLOT mit einer Probenrotation von unten erfolgreich umgesetzt und seine Funktion demonstriert wurde. Daher kann der eingangs aufgestellte Anforderungskatalog, der neben dem Konzept die Basis für den realisierten Aufbau darstellt, von technischer Seite als vollständig betrachtet werden. Die konstruierte Probenkammer mit dem geschlossenen Immersionssystem bietet im Vergleich zu herkömmlichen Messsystemen insbesondere einen Vorteil durch die aufrechte Probenhalterung, die mechanische Stabilität der Probe bezüglich der Rotationsachse und bei der allgemeinen Probenhandhabung. Das theoretische Grundkonzept hat sich folglich auch in der Praxis als äußerst nützlich erwiesen. Des Weiteren wird mit dem entwickelten System die Erweiterung hin zu einer vollständig automatisierten Messroutine erleichtert.

6.3 Verwendung des Systems als Inkubator

Um die Probenkammer als Inkubator einsetzen zu können, wurden einige Erweiterungen entsprechend der biologischen Anforderungskriterien vorgenommen ohne gleichzeitig die essenziellen, technischen Anforderungen und ihre Umsetzung zu beeinträchtigen. Dies ist durch die Konzeption des offenen Immersionssystems, des Heizsystems und der Steuerung erfüllt. Auch das neue Konzept der tellerbasierten Probenkammer ist problemlos mit den Erweiterungen zum Inkubator vereinbar. Dabei bietet die aufrechte Probenhalterung auch im biologischen Kontext neue Halterungsmöglichkeiten, da die Probe in Richtung der Schwerkraft gelagert ist und so gegebenenfalls ein Herabsinken verhindert werden kann.

Alles in allem erfüllt die realisierte Inkubationsprobenkammer prinzipiell die biologischen Anforderungsspezifikationen. Im durchgeführten Inkubationstest hat das entwickelte Inkubationssystem jedoch seine Aufgabe, die Probe unter physiologisch angepassten Bedingungen am Leben zu halten, nicht erfüllt. Die Gründe dafür können vielfältig sein und es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese näher einzugrenzen und zu evaluieren. Durch die vorliegenden Testmessungen ist es keinesfalls ausgeschlossen, dass die realisierte Inkubationsprobenkammer grundsätzlich als Inkubator geeignet ist.

Das realisierte Heizsystem samt Temperaturregelung ist im Konstanthalten der Temperatur von 37 °C mit einer maximalen Abweichung von 0,19 °C äußerst präzise, wie in der Testmessung gezeigt werden konnte. Im Vergleich des Inkubatorheizsystems mit Brutschränken der Zellkultur liegen die im System auftretenden Temperaturschwankungen unterhalb der empfohlenen Schwankungshöchstgrenze von 0,2 °C [14]. Viele kommerziell erhältliche Brutschränke zeigen standardmäßig laut Herstellerangaben sogar größere Abweichungen von der Solltemperatur, auf die sich zusätzlich eine gewisse Einstellungsauflösung addiert. Die Heizleistung des Heizsystems hat sich in den Testmessungen als angemessen erwiesen. Bei einer zu geringen Leistung des Heizelements würde die Wärmezufuhr unter Umständen nicht ausreichen, um die Solltemperatur zu erreichen. Darüber hinaus stiege in dem Fall die Anfälligkeit des Systems für Störungseinflüsse von außen. Eine zu hohe Heizleistung hingegen würde zu einem großen Temperaturgradienten zwischen Heizelement und der übrigen Regelstrecke führen, sodass nach Deaktivieren des Heizelements durch den Regler weiterhin eine Wärmeabgabe an das System stattfinden würde. Diese Trägheit würde sich in einem ausgeprägten Überschwingen des Systems äußern.

Die Steuerung des Heizsystems wurde über das Arduino Mikrocontroller-Board mit dem eigens geschriebenen Steuerungsprogramm inklusive Regelungsalgorithmus erfolgreich umgesetzt und hat sich für längere Inkubationszeiten als zweckmäßig erwiesen.

Die Sterilität der Inkubationsprobenkammer kann für fast alle Bauteile im Kontakt mit der Probe oder dem umgebenden Medium, die nicht als sterile Einweg-Komponenten erhältlich sind, durch Dampfsterilisation im Autoklaven erreicht werden, das bei korrekter Durchführung als sicherstes Sterilisationsverfahren gilt. Eine Ausnahme stellen der Sockel und die Schale dar, deren Sterilität aber durch das Sterilisieren mit 70 % Ethanol erreicht werden kann. Das Vorgehen zur Herstellung eines sterilen Inkubationsaufbaus ist durch die Komplexität des Gesamtaufbaus und den notwendigen Transport von der Sterilbank zum Inkubationsort sehr aufwändig. Insbesondere das bereits eingefüllte Barrieremedium sorgt dabei für eine nicht praktikable Handhabung. Vorteilhaft an dem entwickelten System ist allerdings, dass es nach dem sterilen Zusammenbau unter der Sterilbank vor dem Eindringen von Kontaminationsquellen von außen vollständig isoliert ist. Damit steht die

Inkubationsprobenkammer als steril abgeschlossene, separate Einheit zum Einsatz bereit, was in vielen anderen temperierten Probenkammern nicht der Fall ist. Andere Systeme sehen beispielsweise die direkte Verknüpfung von Detektoreinheiten mit dem Kammermedium vor, wodurch das Kontaminationsrisiko deutlich gesteigert wird (vgl. beispielsweise [10], [18]).

Das offene Immersionssystem, das neben dem Bereitstellen auch ein Austausch von Medium und Gas ermöglicht, neigt in der Anwendung zu Schwierigkeiten, die teilweise mit einer Einbuße der ursprünglichen Funktion einhergehen. Davon betroffen sind der Gaszufluss mit dem U-Rohr-Manometer und der Mediumzufluss in die Probenkammer. Kleine Flüssigkeitstropfen in der Gasleitung bzw. kleine Gasbläschen in der Mediumzuleitung, die durch die Dampfsterilisation bzw. durch das Befüllen generiert werden, können innerhalb der eingesetzten, dünnen Schläuche zu schwerwiegenden Blockaden führen und den Fluss, teils auch nur temporär, behindern. Für den Einsatz von dickeren Schläuchen muss allerdings in Kauf genommen werden, dass sich das vorhandene Volumen von Gas und Medium im System vergrößert und dadurch sowohl der Verbrauch als auch die notwendige Dauer für Pumpprozesse steigt.

Für eine zuverlässige Funktion des Gaszuflusses unter Verwendung des U-Rohr-Manometers sollte die Schlauchführung der Gasleitung an der Halterunterseite abgerundet werden. Somit könnte ein mögliches Abknicken des Schlauches, was durch steile Winkel verursacht wird, und eine damit einhergehende Absperrung des Gaszuflusses unterbunden werden. Zudem sollten für das Gassystem idealerweise andere Sterilfilter eingesetzt werden, die den Durchgang auch bei vorhandener Feuchtigkeit nicht blockieren.

Vom Grundsatz her ist das entwickelte Nachfüllprinzip, das Medium bedarfsgerecht aus dem Reservoir in die Proben- und Rotationseinheit nachströmen lässt, optimal für die zu erfüllende Aufgabe, da hierfür keine Pumpen notwendig sind und ein Überlaufen von Medium sowie ein unkontrollierter Mediumfluss ausgeschlossen sind. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Mediumnachfluss trotz der geringen Höhendifferenz der Flüssigkeitsstände am Luftrohrende und in der Schale zeitweise zum Erliegen kommt. Um diese Nachfüllblockaden auszuschließen, könnte die Höhendifferenz weiter vergrößert werden. Eine andere Möglichkeit könnte eine veränderte Konstruktion der Probenkammer darstellen, die in Abbildung 6.1 gezeigt ist.

Die tiefere Schale und der entsprechend verlängerte Basishalter haben zur Folge, dass sich die Trägheit um die Gleichgewichtslage der Flüssigkeitsstände nicht mehr negativ auf das System auswirkt, da der Abstand zwischen der Gleichgewichtslage und der Halterunterseite größer ist. Damit kann im System eine größere, durch Mediumabfluss herbeigeführte Höhendifferenz erreicht werden, während die Abdichtung der Halterunterseite trotzdem

erhalten bleibt. Die größere Differenz hat einen erhöhten Druck zur Folge, der wiederum das Nachströmen von Luft in den Vorratsbehälter erleichtert, welches bislang aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit am Luftrohrende gehemmt wird. Diese Möglichkeit, innerhalb der Probenkammer eine größere Höhendifferenz aufbauen zu können, macht außerdem sogar die künstliche Höhendifferenz zwischen Luftrohrende und Schale hinfällig, sodass sich auch der Einsatz eines Quetschventils am Luftrohr erübrigt.

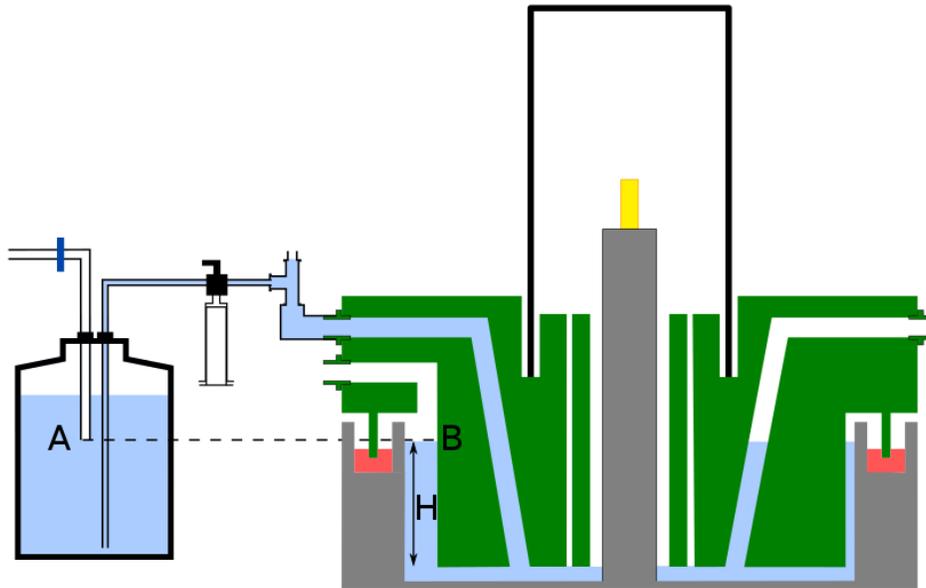


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung einer optimierten Konstruktion der Probenkammer, um die Schwierigkeit der Trägheit des Mediumflusses zu umgehen. Im Gegensatz zum ursprünglichen Aufbau ist der Abstand H zwischen der Gleichgewichtslage der Flüssigkeitsstände (A, B) und der abgedichteten Halterunterseite erhöht, sodass eine größere Druckdifferenz erreicht werden kann.

6.4 Ausblick

Die erfolgreiche Nutzung der Probenkammer als Proben- und Rotationseinheit in Kombination mit dem geschlossenen Immersionssystem im SLOT-Messaufbau ist bereits verwirklicht. Die notwendige, zusätzliche Fixierung der Schale auf dem Rotationsteller, die bislang über eine Klebeverbindung realisiert wurde, könnte benutzerfreundlicher und reproduzierbarer gestaltet werden, indem beispielsweise eine Einrastvorrichtung oder eine magnetische Verbindung integriert wird.

Um weitere Detektionskanäle zur Bildgebung mit SLOT zu nutzen, kann die lichtleitende Funktion des Sockels ausgenutzt werden. Diese ermöglicht es, von der Probe gestreutes oder emittiertes Licht durch den hohlen Rotationsmotor nach unten zu leiten, durch Linsen

zu sammeln und nach Passieren eines Filters mittels PMT zu erfassen. Darüber hinaus bietet die realisierte Proben- und Rotationseinheit die Option und das räumliche Angebot, weitere Detektionskanäle nach oben auszubauen, da das System im Gegensatz zu anderen Proben- und Rotationseinheiten nach oben keine räumlichen Limitierungen vorgibt.

Mit der entwickelten, tellerbasierten Proben- und Rotationseinheit könnte außerdem der Messvorgang und das Probenwechseln automatisiert werden. Dies würde dem Einsatz und der Anwendung von SLOT völlig neue Möglichkeiten eröffnen, beispielsweise als Hochdurchsatzmethode.

Dadurch, dass die Inkubationsprobenkammer mit dem offenen Immersionssystem als Inkubator noch nicht einwandfrei und reproduzierbar funktioniert, ist es an dieser Stelle noch nicht möglich das Inkubationssystem in den SLOT-Messaufbau einzusetzen und Bildaufnahmen einer inkubierenden Probe zu generieren. Stattdessen sollte das System zunächst durch weitere Funktionstests und Testreihen charakterisiert und entsprechend der bislang erhaltenen und der neuen Ergebnisse überarbeitet und optimiert werden. Weitere Untersuchungen und auch Inkubationstests mit weiteren Proben sind nötig, um die Ergebnisse der Einzelmessungen in einen Kontext einordnen und repräsentative Aussagen treffen zu können. Sofern die Schwierigkeiten in einer weiterentwickelten Version des Systems beseitigt sind und eine erfolgreiche Inkubation mit größerem Probenumfang gelungen ist, steht einer Integration in den Messaufbau allerdings nichts im Wege.

Es wäre denkbar, das Inkubationssystem durch zusätzliche Elemente wie zum Beispiel eine Kühlung des Mediumreservoirs zu erweitern. Dafür könnte der Vorratsbehälter etwa in einer angepassten, mit einem Peltierelement und Rippenkühler ausgestatteten Isolationsbox platziert werden. Des Weiteren könnte anstelle der Einweglösung von Schale und Sockel eine wiederverwendbare Konstruktion gefertigt werden, die aus einem einzelnen Werkstück besteht und bereits über einen integrierten Barrierering verfügt. Damit würde keine Klebestelle zwischen Sockel und Schale benötigt werden. Gleichzeitig bietet das Mehrweg-element eine Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit und der Chargenvariation der Schalen durch den Hersteller. Durch die Wahl eines geeigneten Werkstoffs wie beispielsweise Polycarbonat könnte die Sicherheit beim Sterilisationsprozess erhöht werden, da ebenfalls das sichere Verfahren der Dampfsterilisation verwendet werden könnte. Polycarbonat weist mit 1,585 einen höheren Brechungsindex als das bisher eingesetzte PMMA auf, wodurch auch im Hinblick auf die lichtleitenden Eigenschaften des Sockels eine Verbesserung stattfinden würde.

Insgesamt würde eine ausgereiftere und verbesserte Variante des verwirklichten Inkubationssystem in Verbindung mit SLOT das Potential und die Anwendungsmöglichkeiten des tomographischen Bildgebungsverfahrens um ein Vielfaches erweitern.

A Anhang

A.1 Komponentenliste

A.1.1 Proben- und Rotationseinheit

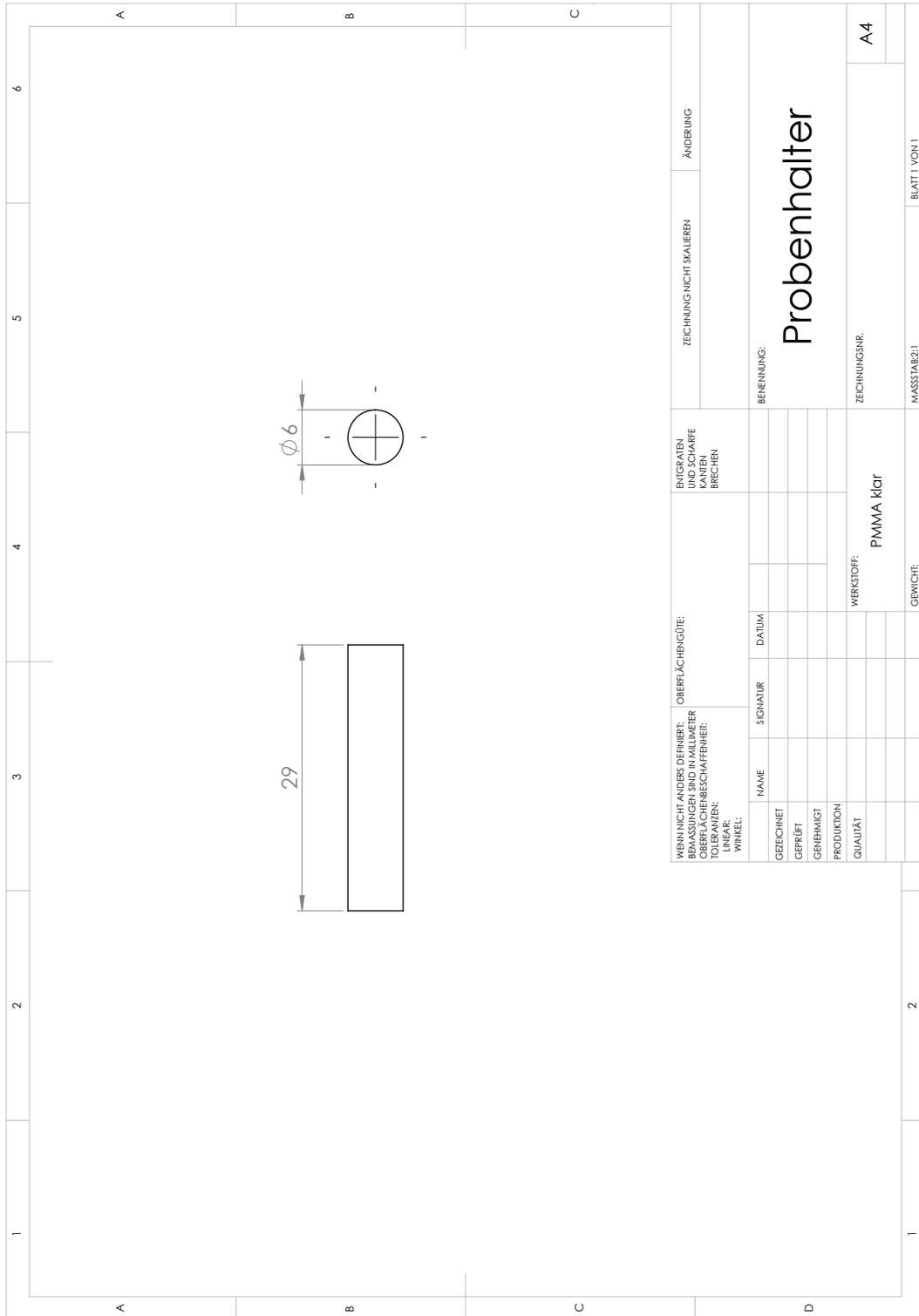
Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikel-Nr.	Bemerkung
Barrierering	Mechanische Werkstatt	–	PTFE
Basishalter	Mechanische Werkstatt	–	PTFE
Klebehilfe	Mechanische Werkstatt	–	Edelstahl (1.4401)
Klebewachs, rosa	Lange Dental	521810	–
Rechteck-Küvette	Starna	1/G/20	optisches Glas
Rotationsmotor	Oriental Motor	DGM60-ARAK	–
Rotationsteller	Mechanische Werkstatt	–	POM
Schale	Greiner Bio-One	628102	PS
Schlauchtülle	Esska	139980000911	Messing, M8x0,75
Silikonöl AP150 Wacker	Sigma Aldrich	50384	–
Sockel	Mechanische Werkstatt	–	PMMA

A.1.2 Geschlossenes und offenes Immersionssystem

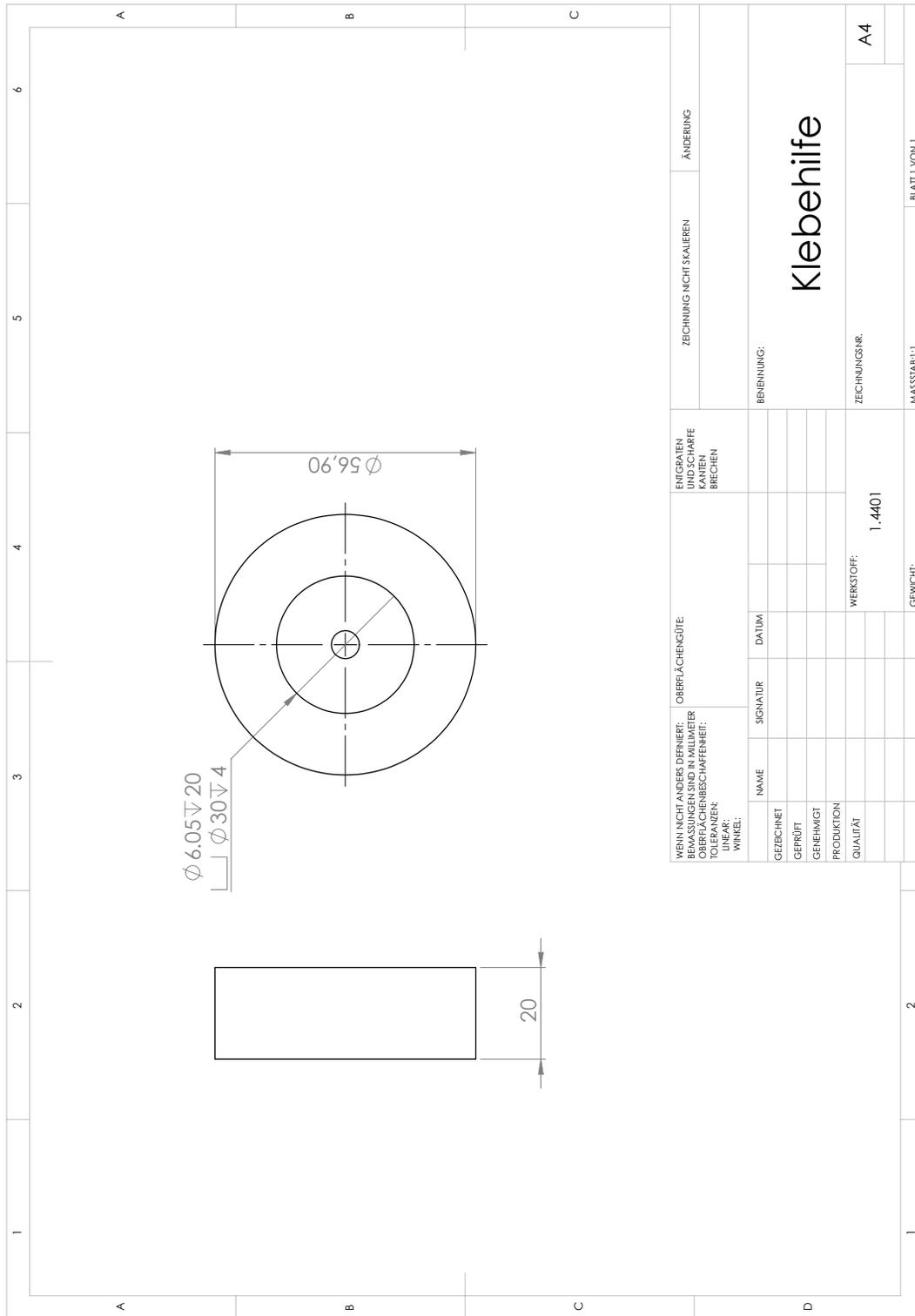
Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikel-Nr.	Bemerkung
Dreiwegehahn Discofix	B. Braun	4095111	versch. Kunststoffe
Einmalspritze Injekt, 2 ml	B. Braun	4606027V	PP, PE
Einmalspritze Injekt, 5 ml	B. Braun	4606051V	PP, PE
Infusionsbeutel Infubag	Nündel	k.A.	PP
Kinderurinbeutel Urosid	Rainer Med	109510	versch. Kunststoffe
Gewindeflasche, 250 ml	Carl Roth	CK34.1	GL 45, Duran
Luer-Lock Adapter, ID:2 mm, w	Vieweg	990091-20	Nylon
Luer-Lock Adapter, ID:2 mm, m	Vieweg	990090-20	Nylon
Luer-Lock Adapter, ID:4 mm, w	Vieweg	990091-40	Nylon
Luer-Lock Adapter, ID:6 mm, w	Vieweg	990091-60	Nylon
Luer-Lock Adapter, ID:8 mm, w	Vieweg	990091-80	Nylon
Luer-Lock-T-Koppelstück, www	Reichelt Ch.	15839	PP
Schlauch, ID:1 mm; AD:1,6 mm	Bola	S 1810-12	PTFE
Schlauch, ID:1,5 mm AD:3 mm	LabMarket	3101503	Silikon
Schlauch, ID:1,5 mm AD:3,5 mm	LabMarket	3101535	Silikon
Schlauch, ID:9 mm AD:12 mm	LabMarket	3100912	Silikon
Schlauchpumpe	BMT	040.K91A.B15	–
Schlauchpumpe	BMT	040.KK1A.B15	–
Schlauchquetschventil	BMT	PS-1615NC	–
Schraubkappe, 2 Zugänge	Carl Roth	HX84.1	GL 45 mit GL 14, PP
Schraubkappe mit Schlaucheinsatz	Carl Roth	HX87.1	GL 14, PP, PTFE, Silikon
Schraubkappe mit Bohrung	Carl Roth	L993.1	GL 14, PP
Septum für Schraubkappe	Carl Roth	LL48.1	GL 14, Silikonkautschuk
Spritzenvorsatzfilter	Carl Roth	PA59.1	PES; Porengröße 0,2 µm

A.2 Konstruktionszeichnungen

A.2.1 Sockel

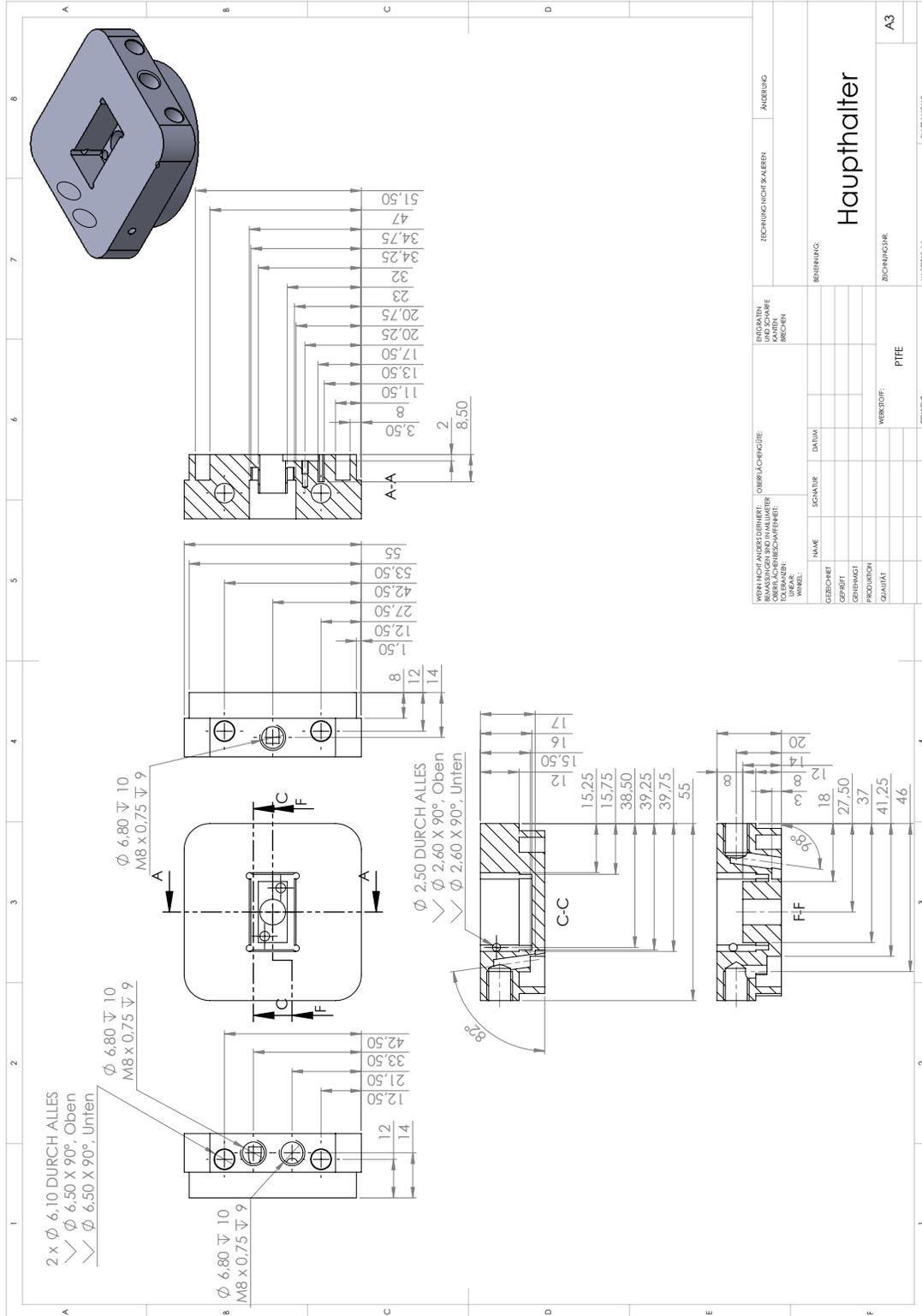


A.2.2 Klebehilfe



WENN NICHT ANDERS DEFINIERT: BEZÜGLICHEN SIND IN MILLIMETER BEREICHEN: ANGEBEN TOLERANZEN: ANGEBEN LINEAR: WINKEL:		OBERFLÄCHENGÜTE:		ENGRÄTEN IN V-SCHARFE KANTEN BEREICHEN		ZEICHNUNG NICHT SKALIEREN	ÄNDERUNG
NAME	SIGNATUR	DATUM					
GEZEICHNET							
GEPRÜFT							
GENEHMIGT							
PRODUKTION							
QUALITÄT							
				WERKSTOFF:	1.4401		
				WERKZEUG:			
				ZEICHNUNGSNR.			
				BEZEICHNUNG:	Klebehilfe		
				MASSSTAB: 1:1			BLATT 1 VON 1
				GEWICHT:			
				ZEICHNUNGSNR.			A4

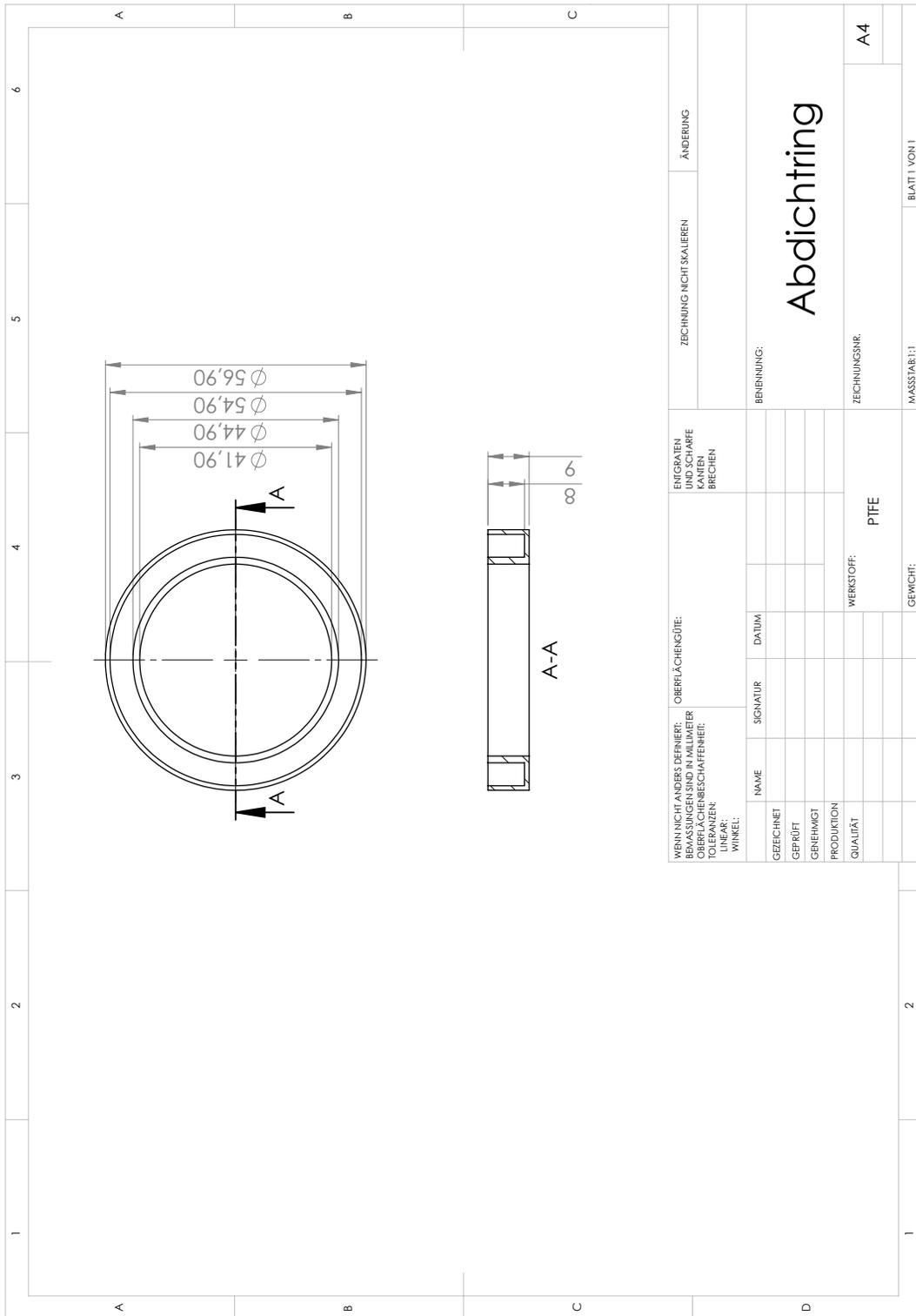
A.2.4 Basishalter



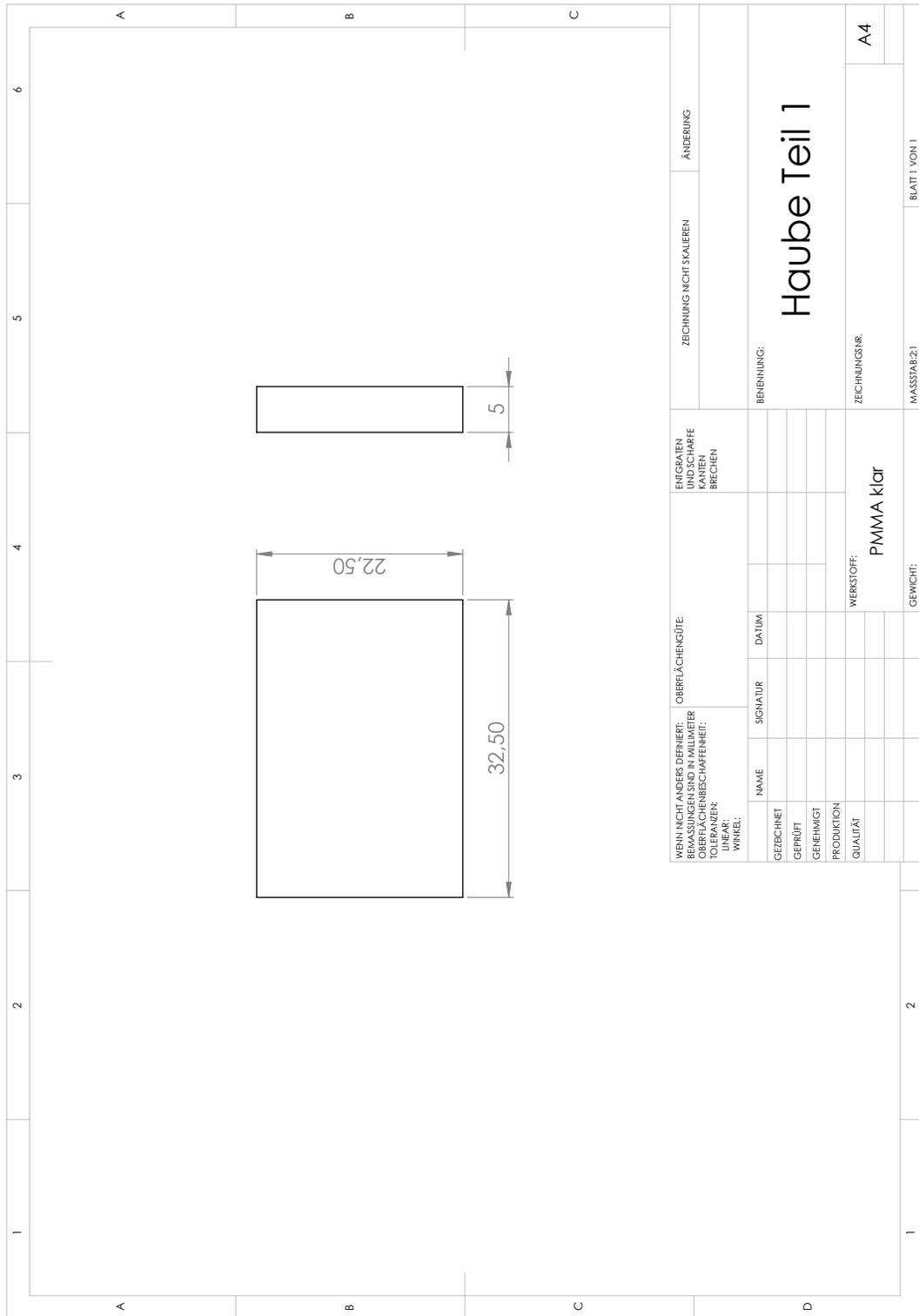
WENN NICHT ANSONSTEN ERWÄHNT, BEWÄHRUNGEN UND MATERIALIEN ÜBERNIMMEN SIE VON DER WERKSCHAFT		OBERFLÄCHENBEHANDLUNG		ZEICHNUNG NICHT SKALIEREN		ÄNDERUNG	
NAME	SCHNITT	DATUM					
GEZEICHNET							
GEPRÜFT							
GEZEICHNET							
PRODUKTION							
QUALITÄT							
WERKSCHAFT:			PITTE		BRÜNNING:		
GEWICHT:			MAßSTAB: 1:1		BLATT: VON 2		
					ZEICHNUNGSR.		
					A3		

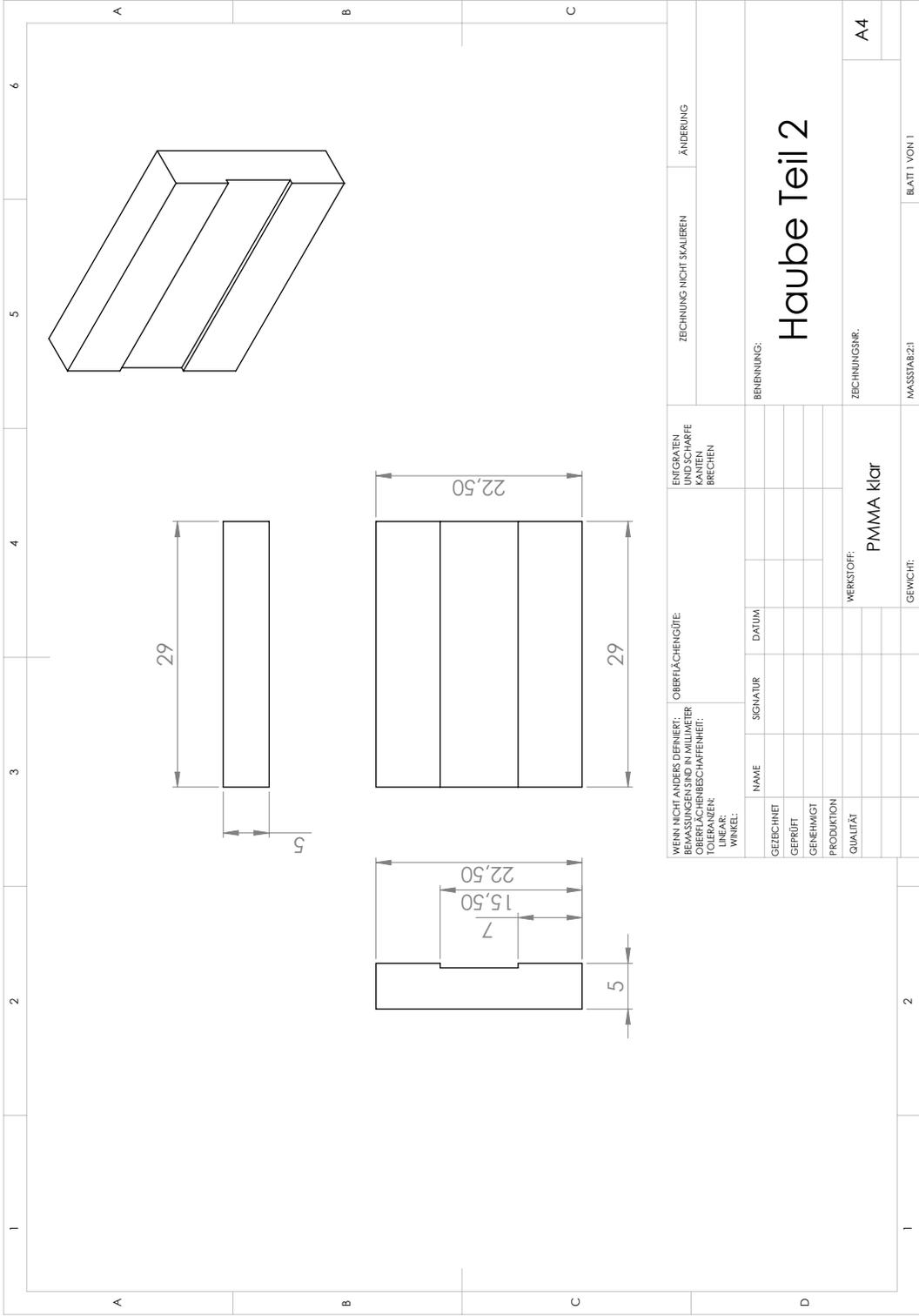
Haupthalter

A.2.5 Barrierering

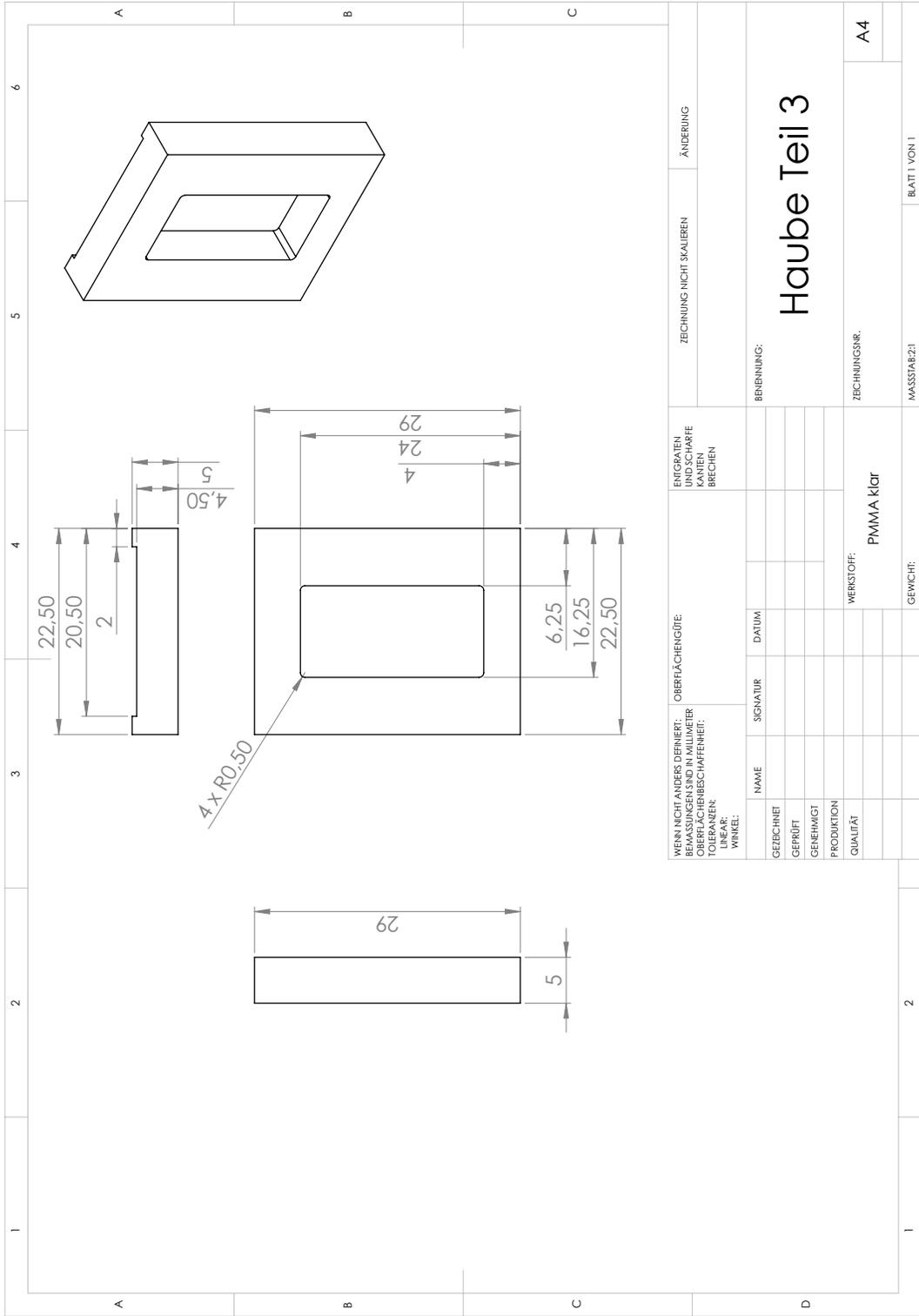


A.2.6 Isolationshaube





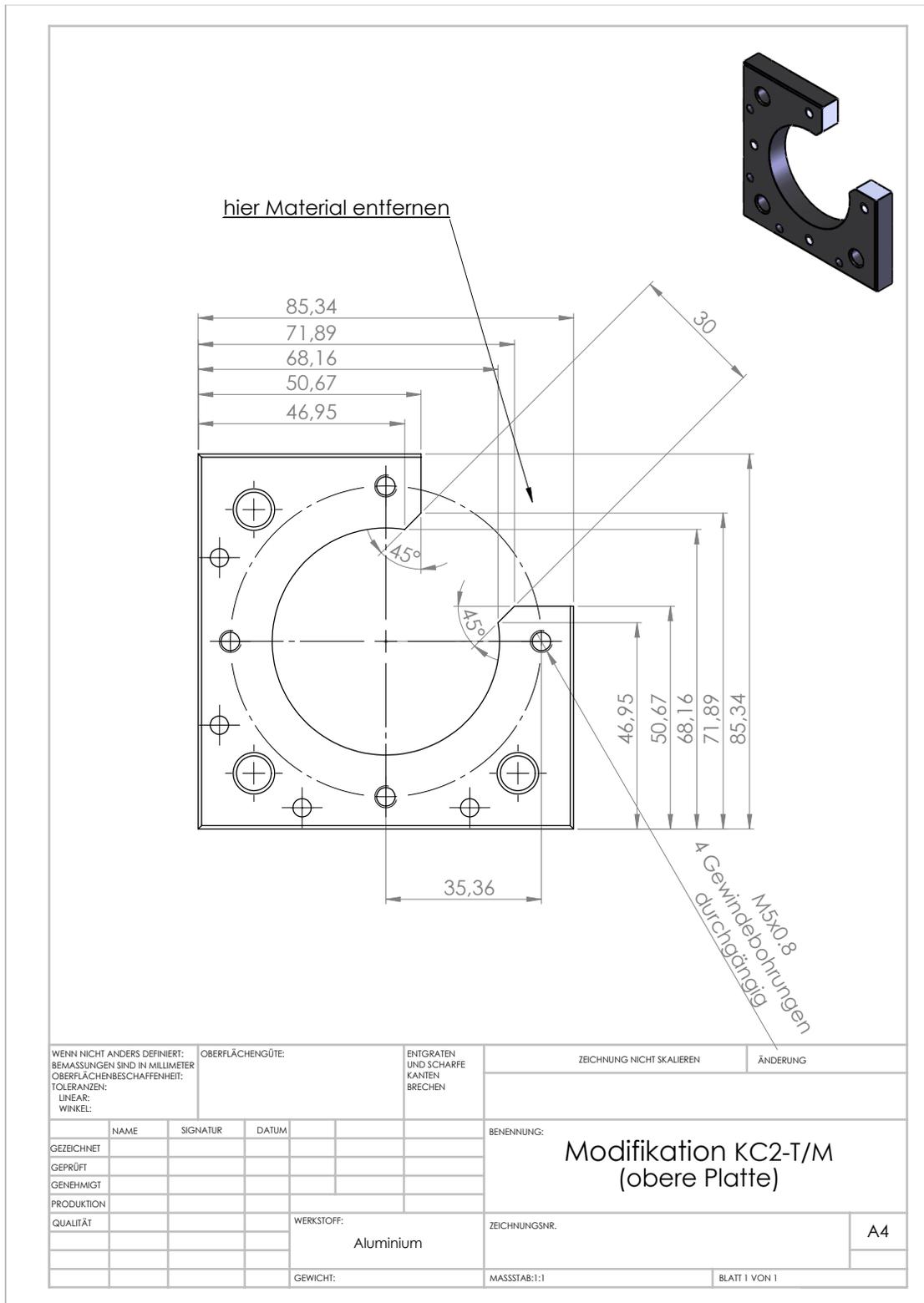
WENN NICHT ANDERS DIERNIERT: BEMASSUNGEN SIND IN MILLIMETER OBERFLÄCHENBESCHAFENHEIT: TOLERANZEN: WINKEL:		OBERFLÄCHENGÜTE:		ENTGRATEN UND SCHÄRFE KANTEN BRECHEN		ÄNDERUNG
GEZEICHNET	NAME	SIGNATUR	DATUM	BENENNUNG:		
GEPRÜFT				Haube Teil 2		
GENEHMIGT				ZECHNUNGSNR.:		
PRODUKTION				A4		
QUALITÄT				WERKSTOFF: PMMA klar		
				MASSTAB: 2:1		
				GEWICHT:		
				BLATT 1 VON 1		

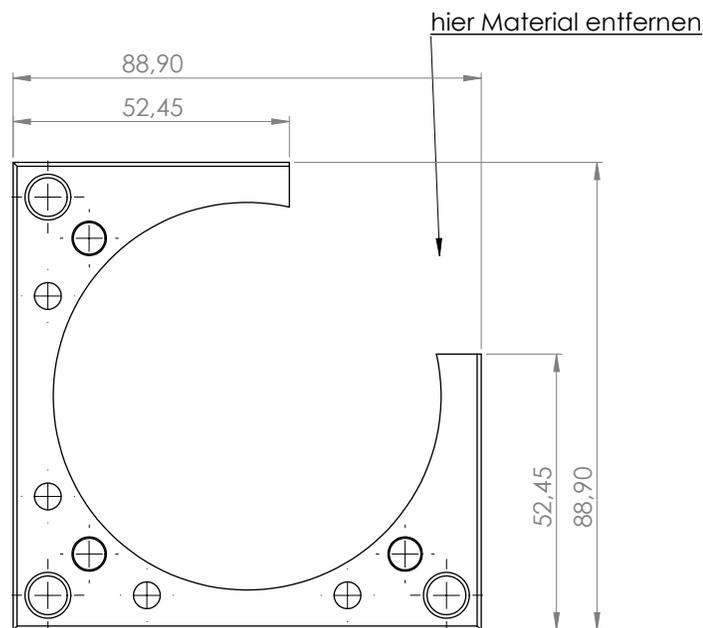
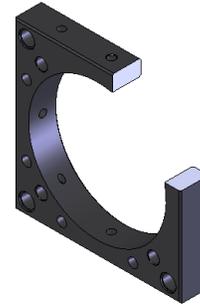


WENN NICHT ANDERS DERNIERT: GRÖßENANGABEN IN MILLIMETER GERÄTHESCHREIBUNG TOLERANZEN LINEAR: WINKEL:		OBERFLÄCHENGÜTE:		ENTGRATEN KANTEN KANTEN BRECHEN		ZEICHNUNG NICHT SKALIEREN		ÄNDERUNG	
NAME	SIGNATUR	DATUM							
GEZEICHNET									
GEPRÜFT									
GENEHMIGT									
PRODUKTION									
QUALITÄT									
WERKSTOFF:			PMMA klar			ZEICHNUNGSNR.		A4	
GEWICHT:						MASSSTAB: 2:1		BLATT 1 VON 1	

Haube Teil 3

A.2.7 Halterung des Rotationsmotors





WENN NICHT ANDERS DEFINIERT: BEMASSUNGEN SIND IN MILLIMETER OBERFLÄCHENBESCHAFFENHEIT: TOLERANZEN: LINEAR: WINKEL:		OBERFLÄCHENGÜTE:		ENTGRATEN UND SCHARFE KANTEN BRECHEN		ZEICHNUNG NICHT SKALIEREN		ÄNDERUNG	
NAME	SIGNATUR	DATUM				BENENNUNG: Modifikation KC2-T/M (untere Platte)			
GEZEICHNET						ZEICHNUNGSNR.			A4
GEPRÜFT						WERKSTOFF: Aluminium			
GENEHMIGT						GEWICHT:			MASSSTAB:1:1
PRODUKTION						BLATT 1 VON 1			
QUALITÄT									

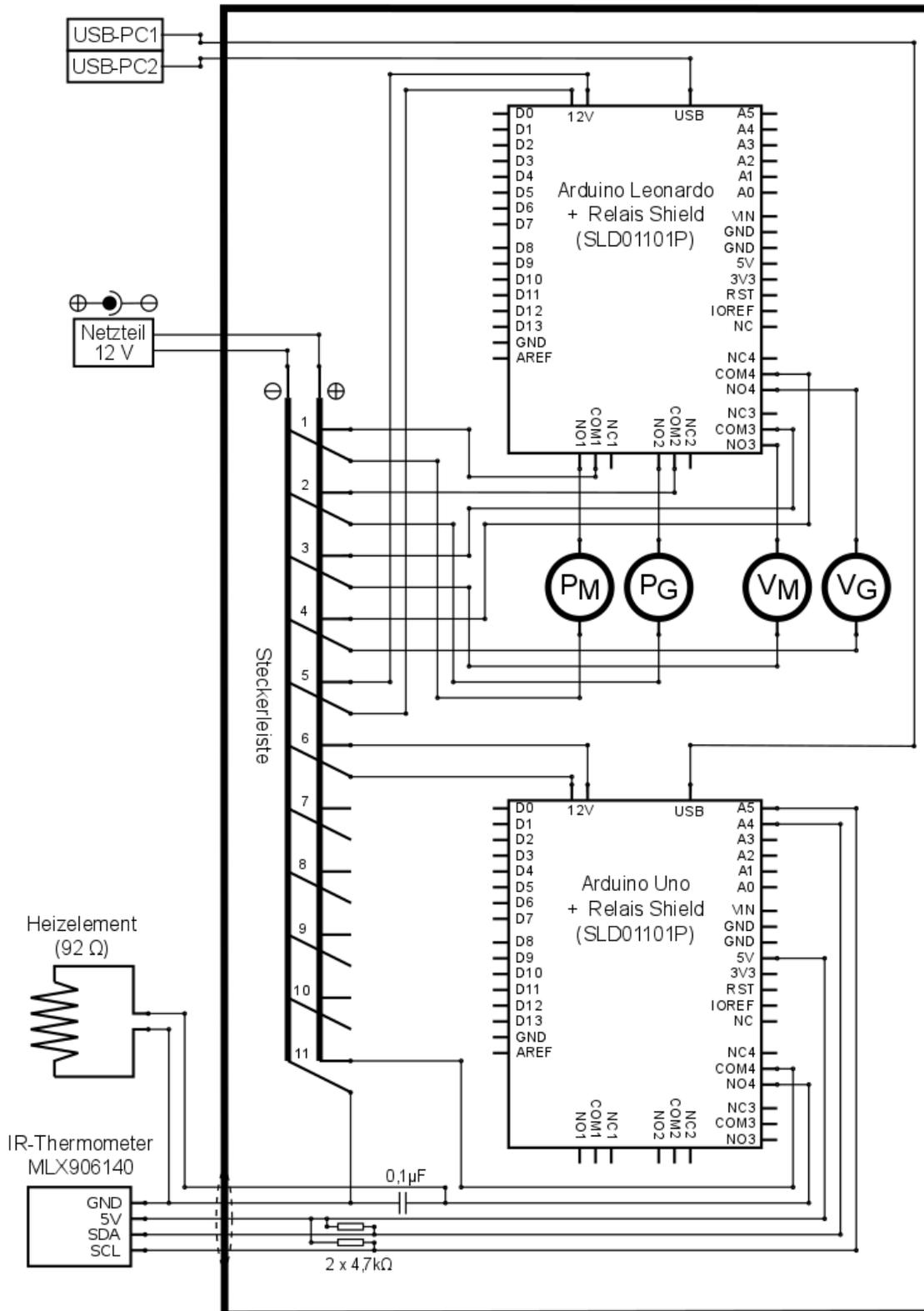
A.3 Protokoll

A.3.1 Herstellung eines 2 %-Agarosegel

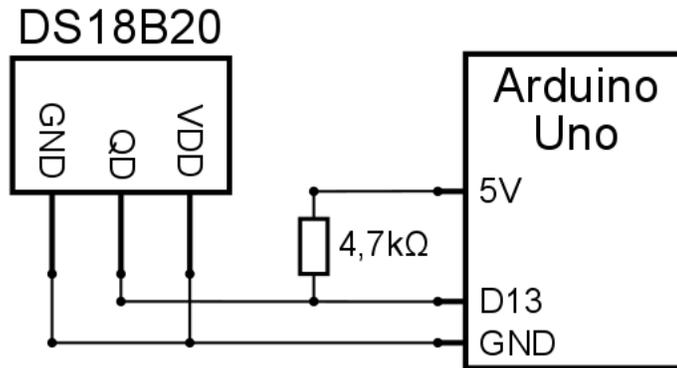
In ein Falcon-Röhrchen werden unter Zuhilfenahme einer Feinwaage 0,8 g Agarose (Low Melting, Biozym Plaque GP Agarose, Biozym Scientific GmbH, Deutschland) eingewogen und mit 39,2 g VE-Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird im Röhrchen ohne verschlossenen Deckel in kleinen Schritten in der Mikrowelle erwärmt, wobei gelegentlich ein Schwenken der Lösung erfolgt. Ist die Agarose vollständig aufgelöst, wird 1 ml des flüssigen Gels zur Weiterverwendung in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Unterhalb der Geliertemperatur von 26 °C bis 30 °C wird das Gel fest. Durch erneutes Aufwärmen in der Mikrowelle kann das Gel wiederum in den flüssigen Zustand überführt werden.

A.4 Schaltpläne

A.4.1 Gesamtes Steuerungssystem



A.4.2 Halbleiter-Temperatursensor DS18B20



A.5 Quellcode

A.5.1 Programm zur Steuerung des Pumpsystems

Hauptprogramm

```
/**
 * Controlling the incubation chamber
 * Arduino Leonardo with one relay shield
 * medium pump: Pin7, J1: connecting COM1 and NO1
 * gas pump: Pin6, J2: connecting COM2 and NO2
 * medium valve: Pin5, J3: connecting COM3 and NO3
 * gas valve: Pin4, J4: connecting COM4 and NO4
 */

//pin relations
const int MPumpPin = 7;
const int GPumpPin = 6;
const int MValvePin = 5;
const int GValvePin = 4;

//time start values
long previousMillis = 0;
long previousMillis2 = 0;
long previousMillis3 = 0;

//parameter values
long val_1 = 0;
long val_2 = 0;
long val_3 = 0;
long val_4 = 0;

//serial communication: incoming
String inputString = ""; // a string to hold incoming data
boolean stringComplete = false; // whether the string is complete

/**
```

```

void setup()
{
  Serial.begin(9600); //initialize serial
  pinMode(MPumpPin, OUTPUT);
  pinMode(GPumpPin, OUTPUT);
  pinMode(MValvePin, OUTPUT);
  pinMode(GValvePin, OUTPUT);
}
//*****
void loop()
{
  if (stringComplete)
  {
    //print the string when a new line arrives
    Serial.print(inputString);

    //start pumping medium
    if (inputString == ("MEDIUM_ON\n"))
    {
      stopPumpMG();
      pumpMediumOn();
    }
    //stop pumping medium
    else if (inputString == ("MEDIUM_OFF\n"))
    {
      pumpMediumOff();
    }
    //start pumping gas
    else if (inputString == ("GAS_ON\n"))
    {
      stopPumpMG();
      pumpGasOn();
    }
    //stop pumping gas
    else if (inputString == ("GAS_OFF\n"))
    {
      pumpGasOff();
    }
    //filling the cuvette
    else if (inputString == ("FILL\n"))
    {
      stopPumpMG();
      gasWithoutValveOn();
    }
    //filling the tubes with medium
    else if (inputString == ("M_FILL\n"))
    {
      stopPumpMG();
      mediumWithoutValveOn();
    }
    //start a periodical pumping of medium and gas
    else if (inputString.startsWith("MG_CYCLE"))
    {
      if(inputString.indexOf("=") != -1)

```

```

{
  //get the four time parameters for this process: medium and gas
  pumping
  //duration, pumping interval and the amount of cycles of the
  process
  getVal_1();
  getVal_234();
  float pumpDurationM = val_1 * 1000.0;
  float pumpDurationG = val_2 * 1000.0;
  float pumpInterval = val_3 * 1000.0;
  long cycles = val_4;

  Serial.print("Pumping_medium:_");
  Serial.print(pumpDurationM/1000); Serial.print("s_____");
  Serial.print("Pumping_gas:_");
  Serial.print(pumpDurationG/1000); Serial.print("s_____");
  Serial.print("Pumping_interval:_");
  Serial.print(pumpInterval/1000); Serial.print("s_____");
  Serial.print("Amount_of_cycles:_"); Serial.println(cycles);
  Serial.print("Total_duration:_");
  Serial.print(pumpInterval/1000 * cycles); Serial.println("s");
  Serial.println("Cancel_process_with_STOP!");

  stopPumpMG();
  int i = 1;
  while (i <= cycles)
  {
    serialEvent();
    delay(50);
    long currentMillis = millis();
    if (currentMillis - previousMillis > pumpInterval + 10)
    {
      previousMillis = previousMillis2 = previousMillis3 =
        currentMillis;
      Serial.print("cycle:_");
      Serial.print(i); Serial.print("_of_"); Serial.println(cycles);
      if (pumpDurationM > 0)
      {
        pumpMediumOn();
      }
      if (pumpDurationM == 0 && pumpDurationG == 0 )
      {
        i++;
      }
    }
    else if (currentMillis - previousMillis2 > pumpDurationM)
    {
      previousMillis2 = currentMillis + pumpInterval;
      previousMillis3 = currentMillis;
      if (pumpDurationM > 0)
      {
        pumpMediumOff();
      }
      if (pumpDurationG > 0)

```

```

        {
            pumpGasOn();
        }
        if (pumpDurationG == 0)
        {
            i++;
        }
    }
    else if (currentMillis - previousMillis3 > pumpDurationG &&
        pumpDurationG > 0)
    {
        previousMillis3 = currentMillis + pumpInterval + pumpDurationM;
        pumpGasOff();
        i++;
    }
    else if (inputString == ("STOP\n"))
    {
        Serial.println(inputString);
        clearInput();
        stopPumpMG();
        break;
    }
    else if(inputString != "")
    {
        clearInput();
    }
}
}
else
{
    Serial.println("Please use: MG_CYCLE='pumping_duration_of_medium_in_
        s', 'pumping_duration_of_gas_in_s', 'pumping_interval_in_s', '
        amount_of_cycles'");
}
}
//if you need help
else if (inputString == "HELP\n")
{
    Serial.println("MEDIUM_ON\t pumping_medium_on");
    Serial.println("MEDIUM_OFF\t pumping_medium_off");
    Serial.println("GAS_ON\t pumping_gas_on");
    Serial.println("GAS_OFF\t pumping_gas_off");
    Serial.println("FILL\t filling_the_cuvette");
    Serial.println("M_FILL\t filling_the_tubes_with_medium");
    Serial.println("MG_CYCLE\t pumping_medium_and_gas_in_cycles");
}
//any incorrect input
else
{
    Serial.println("What do you mean? Use: 'HELP'");
}

//clear the input after every new input
Serial.println("_____");

```

```
    clearInput();
  }
}
```

Funktionen der seriellen Kommunikation

```
//function to run the serial Event
void serialEventRun(void)
{
  if (Serial.available()) serialEvent();
}

//SerialEvent occurs whenever a new data comes in the hardware serial RX
void serialEvent()
{
  while (Serial.available() > 0)
  {
    char inChar = (char)Serial.read(); // get the new byte
    inputString += inChar; // add it to the inputString

    // if the incoming character is a newline, set a flag
    // so the main loop can do something about it
    if (inChar == '\n')
    {
      stringComplete = true;
    }
  }
}

void clearInput()
{
  inputString = ""; //clear the string
  stringComplete = false;
}
```

Funktionen der Programmroutine

```
void pumpMediumOn()
{
  Serial.println("Pumping_medium_started!");
  digitalWrite(MPumpPin, HIGH);
  digitalWrite(MValvePin, HIGH);
}

void pumpMediumOff()
{
  Serial.println("Pumping_medium_stopped!");
  digitalWrite(MValvePin, LOW);
  digitalWrite(MPumpPin, LOW);
}

void pumpGasOn()
{
  Serial.println("Pumping_gas_started!");
  digitalWrite(GPumpPin, HIGH);
  digitalWrite(GValvePin, HIGH);
}

void pumpGasOff()
{
  Serial.println("Pumping_gas_stopped!");
  digitalWrite(GValvePin, LOW);
  digitalWrite(GPumpPin, LOW);
}

void mediumWithoutValveOn()
{
  Serial.println("Pumping_medium_started!");
  digitalWrite(MPumpPin, HIGH);
}

void gasWithoutValveOn()
{
  Serial.println("Pumping_gas_started!");
  digitalWrite(GPumpPin, HIGH);
}

//make sure, every pumping process is turned off
void stopPumpMG()
```

```

{
  if (digitalRead (MPumpPin) == HIGH)
  {
    pumpMediumOff();
  }
  if (digitalRead (GPumpPin) == HIGH)
  {
    pumpGasOff();
  }
}

// get the entered parameter values
void getVal_1()
{
  int index_eq = inputString.indexOf("=");
  String substr = inputString.substring(index_eq+1, inputString.length());
  substr.trim();
  val_1 = substr.toInt();
}

void getVal_234()
{
  long index_c1 = inputString.indexOf(",");
  long index_c2 = inputString.indexOf(",", index_c1 +1);
  long index_c3 = inputString.indexOf(",", index_c2 +1);
  String substr_1 = inputString.substring(index_c1 +1, index_c2);
  substr_1.trim();
  val_2 = substr_1.toInt();
  String substr_2 = inputString.substring(index_c2 +1, index_c3);
  substr_2.trim();
  val_3 = substr_2.toInt();
  String substr_3 = inputString.substring(index_c3 +1, inputString.length
    ());
  substr_3.trim();
  val_4 = substr_3.toInt();
}

```

A.5.2 Programm zur Steuerung des Heizsystems

Hauptprogramm

```
//*****  
// Controlling the heating of the incubation chamber  
// Arduino Uno with one relay shield  
// wire(heating): Pin4, J4: connecting COM4 and N04  
// IR-Thermometer MLX90614_ESF_ACF_000_TU: SDA (A4), SCL (A5)  
//*****  
  
//library  
#include <i2cmaster.h> //IR-Thermometer  
  
//IR-Thermometer MLX90614  
#define address 0x5A //slave address  
double temperatureIR = 0x0000;  
float celsiusDiff = 273.15; //convert kelvin to celsius  
double tempFactor = 0.02; // 0.02 degrees per LSB  
  
//pin relation  
const int wirePin = 4;  
  
//time start value  
long previousMillis = 0;  
  
//temperature setpoint  
int setpoint = 37;  
  
//parameter value  
long val_1 = 0;  
  
//serial communication: incoming  
String inputString = ""; // a string to hold incoming data  
boolean stringComplete = false; // whether the string is complete  
  
//*****  
void setup()  
{  
  Serial.begin(9600);  
  i2c_init(); //initialise the i2c bus  
  PORTC = (1 << PORTC4) | (1 << PORTC5); //enable pullups  
  pinMode(wirePin, OUTPUT);  
}  
//*****
```

```

void loop()
{
  if (stringComplete)
  {
    //print the string when a new line arrives
    Serial.print(inputString);

    //print the current temperature of IR-sensor
    if (inputString == ("GET_TEMP\n"))
    {
      getTempIR();
      printTempIR();
    }

    //print the current temperature every x seconds
    else if (inputString.startsWith("INTERVAL"))
    {
      if(inputString.indexOf("=") != -1)
      {
        //get the parameter x called interval in ms and print it in s
        getVal_1();
        float interval = val_1 * 1000.0;
        Serial.print("Interval_=_");
        Serial.print(interval / 1000);
        Serial.println("s");
        printHeader();
        //use the interval, print the temperature until the input is STOP
        while(true)
        {
          serialEvent();
          long currentMillis = millis();
          delay(50);
          if(currentMillis - previousMillis > interval)
          {
            previousMillis = currentMillis;
            getTempIR();
            printTempIR2();
          }
          else if (inputString == ("STOP\n"))
          {
            Serial.println(inputString);
            clearInput();
            break;
          }
        }
      }
    }
  }
}

```

```

        else if(inputString != "")
        {
            clearInput();
        }
    }
}
else
{
    Serial.println("Please use: INTERVAL='x in s'");
}
}

//start heating until the input is STOP, parameters defined on top
//print the temperature every second
else if (inputString == ("HEATING\n"))
{
    Serial.println("Heating started!");
    printHeader();
    while(true)
    {
        serialEvent();
        delay(50);
        long currentMillis = millis();
        if (currentMillis - previousMillis > 1000)
        {
            previousMillis = currentMillis;
            getTempIR();
            printTempIR2();
            if (temperatureIR < setpoint)
            {
                digitalWrite(wirePin, HIGH);
            }
            else
            {
                digitalWrite(wirePin, LOW);
            }
        }
    }
    else if (inputString == ("STOP\n"))
    {
        Serial.println(inputString);
        clearInput();
        digitalWrite(wirePin, LOW);
        break;
    }
}

```

```

        else if(inputString != "")
        {
            clearInput();
        }
    }
}

//if you need help
else if (inputString == "HELP\n")
{
    Serial.println("GET_TEMP\tcurrent temperature of IR-sensor");
    Serial.println("INTERVAL\tcurrent temperature and pressure in the
        interval");
    Serial.println("HEATING\tstart heating");
}

//any incorrect input
else
{
    Serial.println("What do you mean? Use: 'HELP'");
}

//clear the input after every new input
Serial.println("_____");
clearInput();
}
}

```

Funktionen der seriellen Kommunikation

vgl. Abschnitt A.5.1 - Funktionen der seriellen Kommunikation

Funktionen der Programmroutine

```

void getTempIR()
{
    int dev = address << 1; //one shift left, library does not do it
    int data_low = 0; //data byte low
    int data_high = 0; //data byte high
    int pec = 0; //packet error code

    i2c_start_wait(dev+I2C_WRITE); //set device address and write mode
    i2c_write(0x07); // write address

```

```

i2c_rep_start(dev+I2C_READ); //set device address and read mode
data_low = i2c_readAck(); //read 1 byte and then send ack
data_high = i2c_readAck(); //read 1 byte and then send ack
pec = i2c_readNak(); //read 1 byte and stop
i2c_stop();

//This converts high and low bytes together and processes temperature
//MSB is a error bit and is ignored for temps
//This masks off the error bit of the high byte,
//then moves it left 8 bits and adds the low byte
temperatureIR = (double)(((data_high & 0x007F) << 8) + data_low);
temperatureIR = (temperatureIR * tempFactor);
temperatureIR = temperatureIR - celsiusDiff;
}

void printTempIR()
{
    Serial.print("Temperature: ");
    Serial.print(temperatureIR);
    Serial.println("_deg_C");
}

void printTempIR2()
{
    Serial.println(temperatureIR);
}

// get the entered parameter value
void getVal_1()
{
    int index_eq = inputString.indexOf("=");
    String substr = inputString.substring(index_eq+1, inputString.length());
    substr.trim();
    val_1 = substr.toInt();
}

// print the header
void printHeader()
{
    Serial.println("Cancel_process_with_STOP!");
    Serial.println("Temperature_[degC]");
}

```

A.5.3 Programm zur Messung der Sprungantwort

Hauptprogramm

```
// *****  
// Heating Test I  
// Arduino Uno with one relay shield  
// wire(heating): Pin4, J4: connecting COM4 and N04  
// Data of sensor DS18B20: Pin 13  
// IR-Thermometer MLX90614_ESF_ACF_000_TU: SDA (A4), SCL (A5)  
// *****  
  
//libraries  
#include <i2cmaster.h> //IR-Thermometer  
#include <DallasTemperature.h> //temperature sensor  
#include <OneWire.h> //temperature sensor  
  
//IR-Thermometer MLX90614  
#define address 0x5A //slave address  
double temperatureIR = 0x0000;  
float celsiusDiff = 273.15; //convert kelvin to celsius  
double tempFactor = 0.02; // 0.02 degrees per LSB  
  
//temperature sensor DS18B20  
OneWire oneWire(13); //sensor: digital pin number  
DallasTemperature sensor(&oneWire);  
double temperatureDS = 0;  
  
//pin relation  
const int wirePin = 4;  
  
//time start value  
long previousMillis = 0;  
  
//temperature setpoint  
int setpoint = 37;  
  
//parameter value  
long val_1 = 0;  
  
// *****  
void setup()  
{  
  Serial.begin(9600);  
  i2c_init(); //initialise the i2c bus
```

```

sensor.begin(); //initialize temperature sensor
PORTC = (1 << PORTC4) | (1 << PORTC5); //enable pullups
pinMode(wirePin, OUTPUT);

//print a header
Serial.println("Heating_started!");
Serial.print("TemperatureIR_[degC]");
Serial.print("\t");
Serial.println("TemperatureDS_[degC]");
}
//*****
void loop()
{
  digitalWrite(wirePin, HIGH);
  long currentMillis = millis();
  if (currentMillis - previousMillis > 1000)
  {
    previousMillis = currentMillis;
    getTempIRDS();
    printTempIRDS();
  }
}

```

Funktionen der Programmroutine

```

void getTempIR()
{
  int dev = address << 1; //one shift left, library does not do it
  int data_low = 0; //data byte low
  int data_high = 0; //data byte high
  int pec = 0; //packet error code

  i2c_start_wait(dev+I2C_WRITE); //set device address and write mode
  i2c_write(0x07); // write address

  i2c_rep_start(dev+I2C_READ); //set device address and read mode
  data_low = i2c_readAck(); //read 1 byte and then send ack
  data_high = i2c_readAck(); //read 1 byte and then send ack
  pec = i2c_readNak(); //read 1 byte and stop
  i2c_stop();

  //This converts high and low bytes together and processes temperature
  //MSB is a error bit and is ignored for temps

```

```

    //This masks off the error bit of the high byte,
    //then moves it left 8 bits and adds the low byte
    temperatureIR = (double)(((data_high & 0x007F) << 8) + data_low);
    temperatureIR = (temperatureIR * tempFactor);
    temperatureIR = temperatureIR - celsiusDiff;
}

void getTempDS()
{
    //request temperature, put it into a buffer
    sensor.requestTemperatures();
    //reads temperature from the first sensor
    temperatureDS = sensor.getTempCByIndex(0);
}

void getTempIRDS()
{
    getTempIR();
    getTempDS();
}

void printTempIRDS()
{
    Serial.print(temperatureIR);
    Serial.print("\t\t\t");
    Serial.println(temperatureDS);
}

```

A.5.4 Programm Testung des Heizsystem

Hauptprogramm

```
//*****  
// Heating Test II  
// Arduino Uno with one relay shield  
// wire(heating): Pin4, J4: connecting COM4 and N04  
// Data of sensor DS18B20: Pin 13  
// IR-Thermometer MLX90614_ESF_ACF_000_TU: SDA (A4), SCL (A5)  
//*****  
  
//libraries  
#include <i2cmaster.h> //IR-Thermometer  
#include <DallasTemperature.h> //temperature sensor  
#include <OneWire.h> //temperature sensor  
  
//IR-Thermometer MLX90614  
#define address 0x5A //slave address  
double temperatureIR = 0x0000;  
float celsiusDiff = 273.15; //convert kelvin to celsius  
double tempFactor = 0.02; // 0.02 degrees per LSB  
  
//temperature sensor DS18B20  
OneWire oneWire(13); //sensor: digital pin number  
DallasTemperature sensor(&oneWire);  
double temperatureDS = 0;  
  
//pin relation  
const int wirePin = 4;  
  
//time start value  
long previousMillis = 0;  
  
//temperature setpoint  
int setpoint = 37;  
  
//parameter value  
long val_1 = 0;  
  
//*****  
void setup()  
{  
  Serial.begin(9600);  
  i2c_init(); //initialise the i2c bus
```

```

sensor.begin(); //initialize temperature sensor
PORTC = (1 << PORTC4) | (1 << PORTC5); //enable pullups
pinMode(wirePin, OUTPUT);

//print a header
Serial.println("Heating_started!");
Serial.print("TemperatureIR_[degC]");
Serial.print("\t");
Serial.println("TemperatureDS_[degC]");
}
//*****
void loop()
{
  long currentMillis = millis();
  if (currentMillis - previousMillis > 1000)
  {
    previousMillis = currentMillis;
    getTempIRDS();
    printTempIRDS();
    if (temperatureIR < setpoint)
    {
      digitalWrite(wirePin, HIGH);
    }
    else
    {
      digitalWrite(wirePin, LOW);
    }
  }
}
}

```

Funktionen der Programmroutine

vgl. Abschnitt A.5.3 - Funktionen der Programmroutine

A.6 Rekonstruktion erfasster Datensätze

A.6.1 Testmessung an Silikatpartikeln

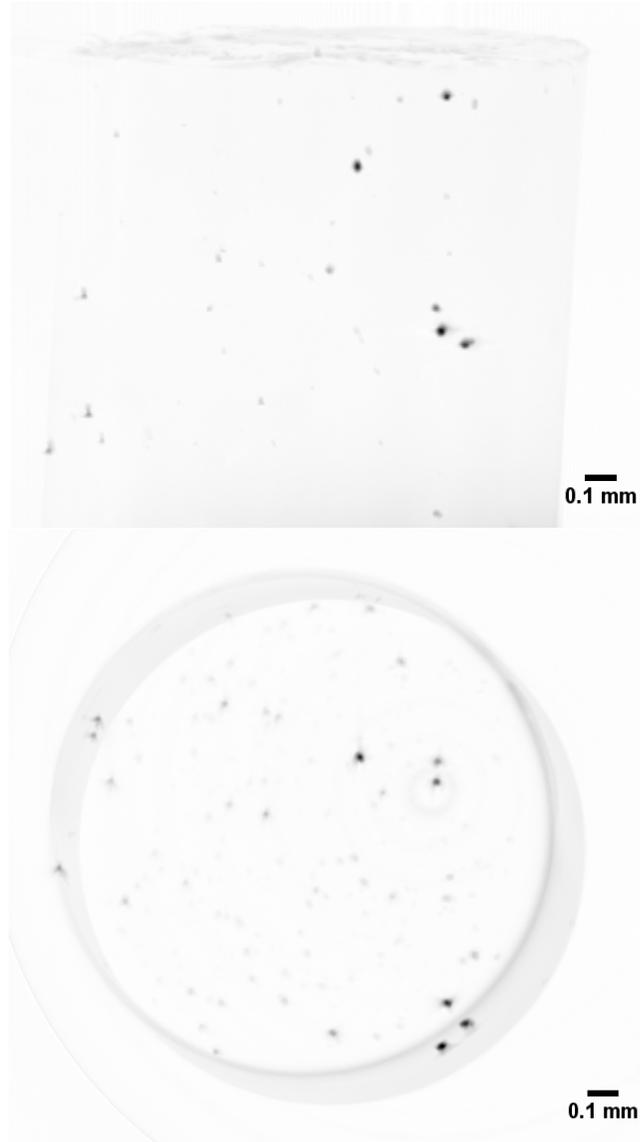


Abbildung A.1: Bildgebung der Silikatpartikel: Projektionsaufnahme (oben) und Maximumintensitätsprojektion (unten) des rekonstruierten Datensatzes. Im Projektionsbild wird die Verteilung der fixierten Silikatpartikel im Agarosezylinder in der abgerasterten x-y-Ebene deutlich, während die z-Projektion eine Darstellung der maximalen Intensität in der x-z-Ebene repräsentiert. Einige Kügelchen sind zu Aggregaten zusammen gelagert und bilden aufgrund erhöhter Absorption eine dunklere Färbung. Der einbettende Zylinder ist als schwacher Schatten sichtbar, da eine geringfügige Absorption stattfindet. Dadurch, dass der Agarosezylinder leicht schräg fixiert ist, zeigt die Maximumintensitätsprojektion keine exakte Kreisform, sondern ein Oval. Die Auflösung beträgt $3,3\ \mu\text{m}$.

A.6.2 Testmessung an hES-Zell-Sphäroiden

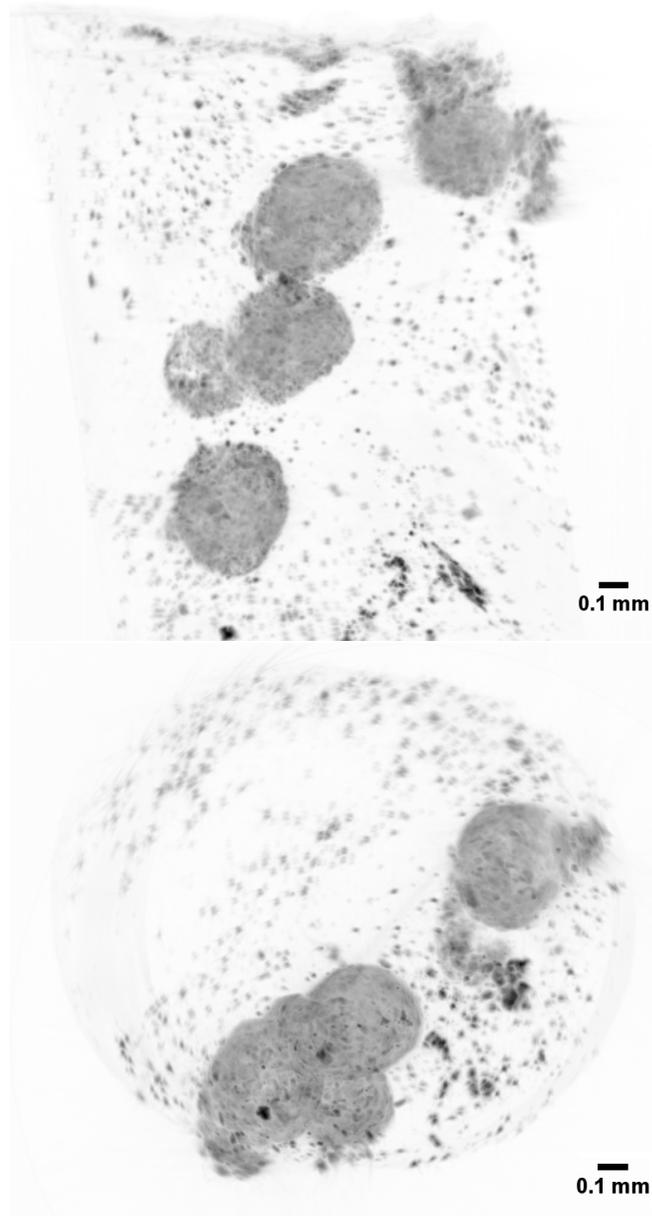


Abbildung A.2: Bildgebung der hES-Zell-Sphäroide: Projektionsaufnahme (oben) und Maximumintensitätsprojektion (unten) des rekonstruierten Datensatzes. Das Agarosemedium ist als leichter Schatten erkennbar. Die Aufnahmen zeigen fünf große Sphäroide im Durchmesser von 200 bis 300 μm . Darüber hinaus sind über den gesamten Zylinder sowohl kleine Zellaggregate als auch vereinzelte Zellen verteilt sichtbar. Die Auflösung der Aufnahmen liegt bei 2,67 μm .

A.7 Bilder

A.7.1 DipSlides nach Inkubation

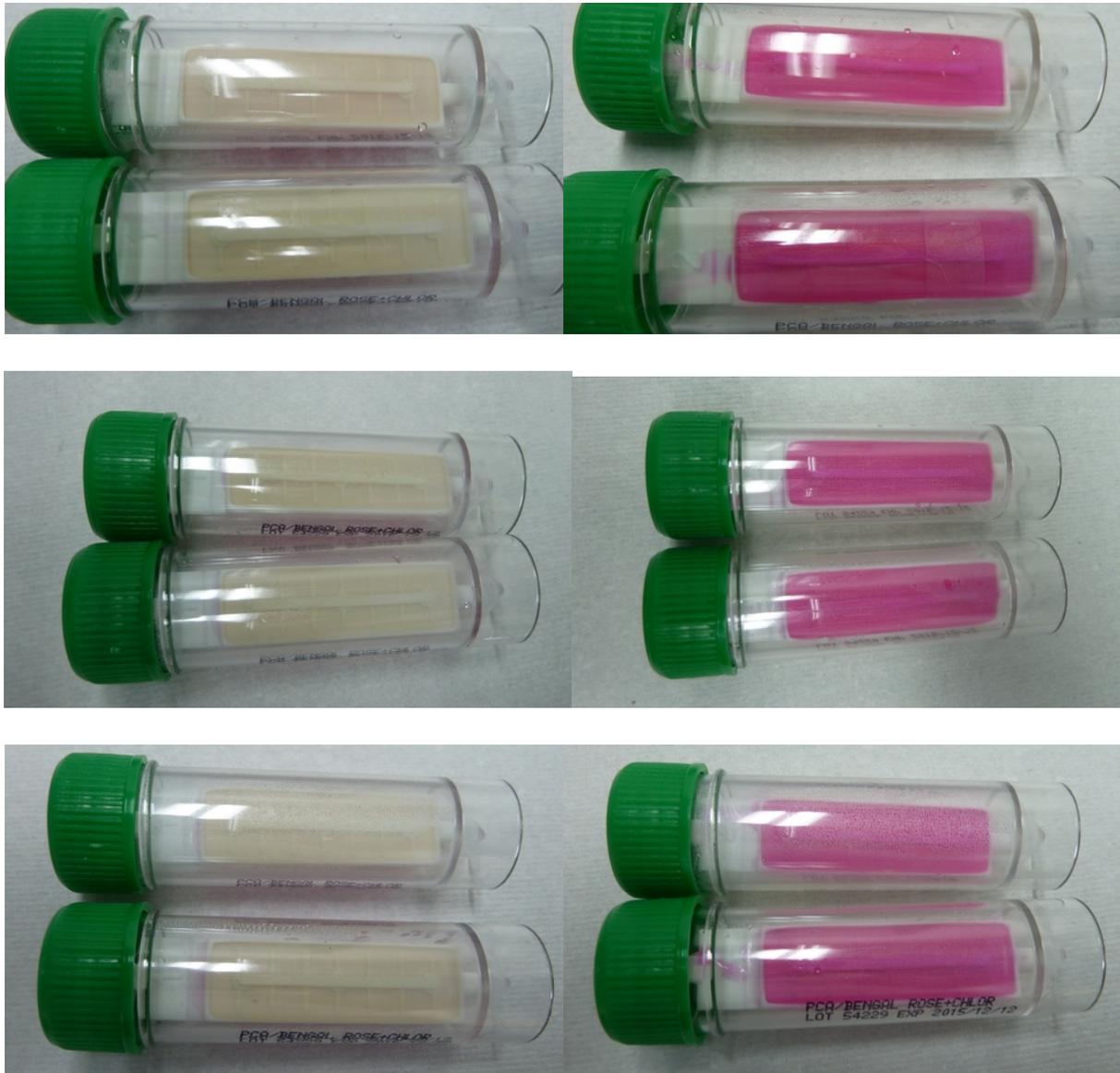


Abbildung A.3: Fotos der Nährböden der DipSlides nach einer Inkubation von insgesamt 5 d. Jeweils zwei DipSlides von abgepumptem Medium (oben), Medium des Vorratsbehälters (Mitte) und Medium der Negativkontrolle (unten) mit der Gesamtkeimzahl (links) und Hefen und Schimmelpilzen (rechts). (Anm.: Aufgrund von Kondenswasser an den Röhrcchen kommt es bei den Fotos vereinzelt zu Lichtreflexionen.)

A.7.2 Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden

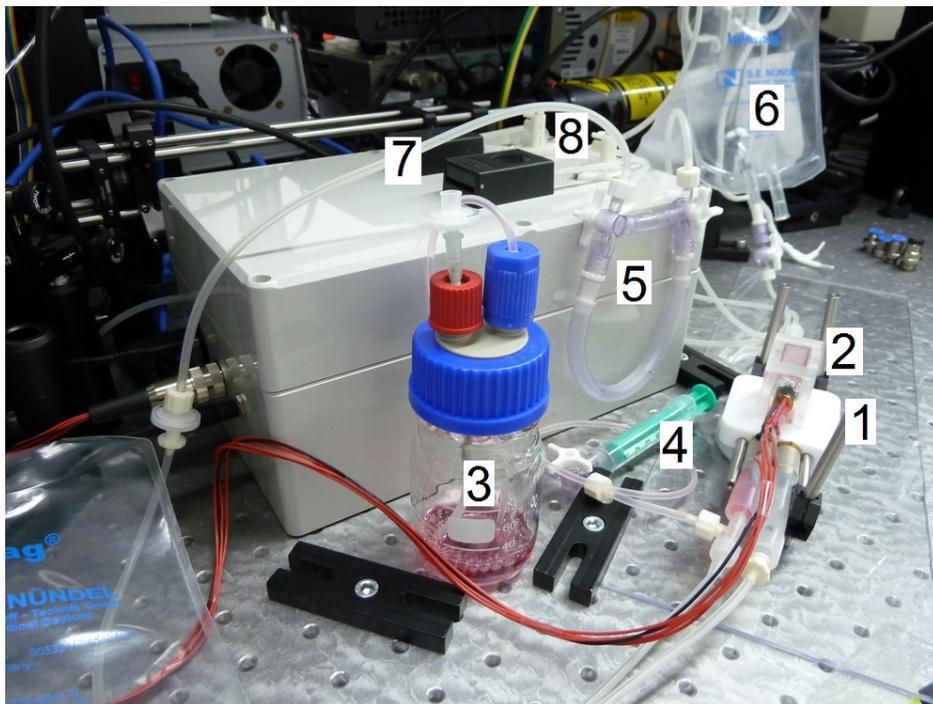
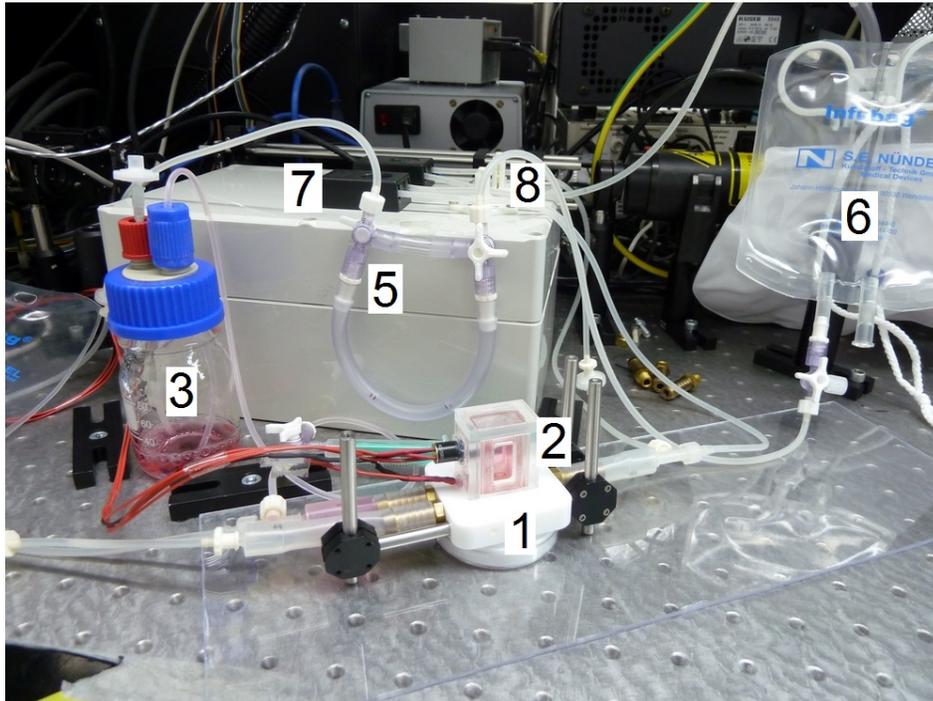


Abbildung A.4: Fotos des Messaufbaus der gestarteten Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden. Zu sehen sind in den Bildern die Probeneinheit (1), das Heizsystem (2), das Mediumreservoir (3), die Befüllhilfe (4), das U-Rohr-Manometer (5), das Gasreservoir (6), die Schlauchpumpen (7) und die Schlauchquetschventile (8).

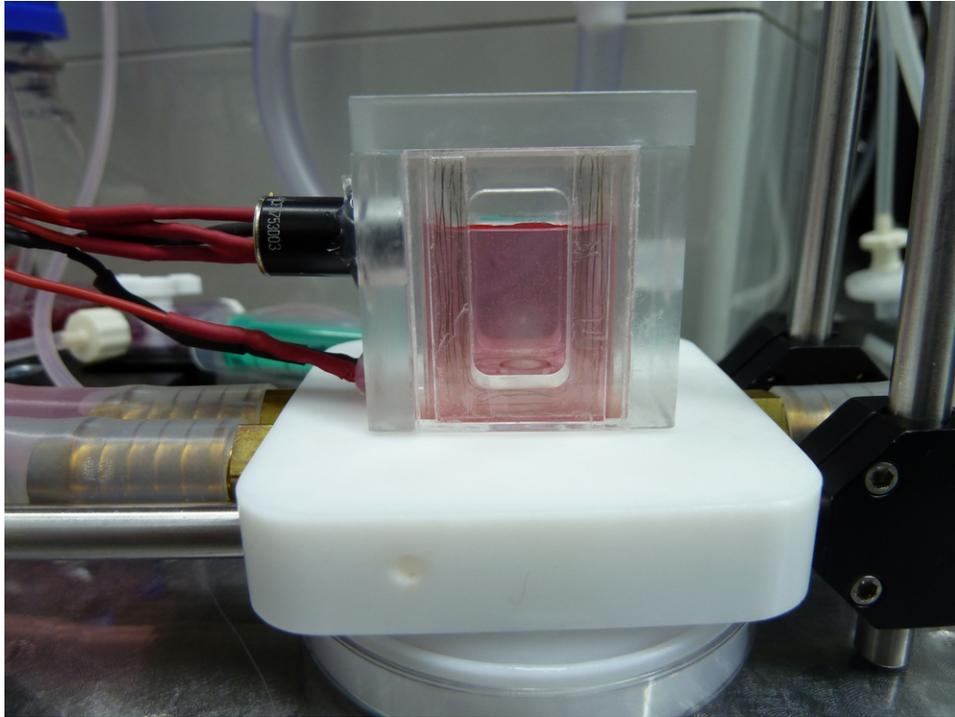


Abbildung A.5: Foto der Probeneinheit der gestarteten Inkubation von hES-Zell-Sphäroiden.

Literatur

- [1] ABBOTT, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 6951 (2003), 870–872.
- [2] ANTONOPOULOS, G. *Bildgebung und digitale Rekonstruktion von lichtbrechenden Proben in den Lebenswissenschaften*. PhD thesis, Manuskript in Vorbereitung, Laser Zentrum Hannover e.V., 2016.
- [3] CHEN, G., GULBRANSON, D. R., HOU, Z., BOLIN, J. M., RUOTTI, V., PROBASCOC, M. D., SMUGA-OTTO, K., HOWDEN, S. E., DIOL, N. R., PROPSON, N. E., WAGNER, R., LEE, G. O., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., TENG, JOYCE M C, AND THOMSON, J. A. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* 8, 5 (2011), 424–429.
- [4] DENK, W., STRICKLER, J., AND WEBB, W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 4951 (1990), 73–76.
- [5] DODT, H.-U., LEISCHNER, U., SCHIERLOH, A., JÄHRLING, N., MAUCH, C. P., DEININGER, K., DEUSSING, J. M., EDER, M., ZIEGLGÄNSBERGER, W., AND BECKER, K. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature methods* 4, 4 (2007), 331–336.
- [6] GSTRAUNTHALER, G., AND LINDL, T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, 7. Aufl. [überarb. und aktual.] ed. Springer Spektrum, Berlin, 2013.
- [7] HEIDRICH, M. *SLOT: Eine auf optischer Computertomographie basierende Bildgebungsmethode für die Lebenswissenschaften*. PhD thesis, Laser Zentrum Hannover e.V., 2014.
- [8] HEIDRICH, M., KÜHNEL, M. P., KELLNER, M., LORBEER, R.-A., LANGE, T., WINKEL, A., STIESCH, M., MEYER, H., AND HEISTERKAMP, A. 3D imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph. *Biomedical optics express* 2, 11 (2011), 2982–2994.
- [9] HEINEMANN, R. *Realisierung eines optischen Tomographen zur in vitro Langzeituntersuchung konstruktbildender Zellverbände*. PhD thesis, Laser Zentrum Hannover e.V., 2012.

- [10] HUISKEN, J., SWOGER, J., DEL BENE, F., WITTBRODT, J., AND STELZER, ERNST H K. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science (New York, N.Y.)* 305, 5686 (2004), 1007–1009.
- [11] ISABELLENHÜTTE HEUSLER GMBH & CO. KG. Technical Information of Precision Alloys.
- [12] KELLNER, M., HEIDRICH, M., BEIGEL, R., LORBEER, R.-A., KNUDSEN, L., RIPKEN, T., HEISTERKAMP, A., MEYER, H., KÜHNEL, M. P., AND OCHS, M. Imaging of the mouse lung with scanning laser optical tomography (SLOT). *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 113, 6 (2012), 975–983.
- [13] KREMER, J. R., MASTRONARDE, D. N., AND MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of structural biology* 116, 1 (1996), 71–76.
- [14] LIFE TECHNOLOGIES. *Cell culture basics: Handbook*. 2014.
- [15] LORBEER, R.-A., HEIDRICH, M., ANTONOPOULOS, G., RIPKEN, T., AND MEYER, H. Dreidimensionale und effiziente Erfassung mesoskopischer Proben. *BioPhotonik* 3, 3 (2013), 2–5.
- [16] LORBEER, R.-A., HEIDRICH, M., LORBEER, C., RAMÍREZ OJEDA, DIEGO FERNANDO, BICKER, G., MEYER, H., AND HEISTERKAMP, A. Highly efficient 3D fluorescence microscopy with a scanning laser optical tomograph. *Optics express* 19, 6 (2011), 5419–5430.
- [17] LORBEER, R.-A., HEIDRICH, M., MEYER, H., AND SPIECKER, H. Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung von Proben in einer Flüssigkeit, 2014.
- [18] LORENZO, C., FRONGIA, C., JORAND, R., FEHRENBACH, J., WEISS, P., MAANDHUI, A., GAY, G., DUCOMMUN, B., AND LOBJOIS, V. Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy. *Cell division* 6 (2011), 22.
- [19] LUTZ, H., AND WENDT, W. *Taschenbuch der Regelungstechnik*, 5., erw. aufl. ed. Deutsch, Frankfurt am Main, 2003.
- [20] MOLECULAR PROBES, I. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*: Product Information, 2005.

- [21] MONK, S. *Programming Arduino: Getting started with sketches*. McGraw, New York, 2012.
- [22] RADON, J. Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-Physische Klasse*, 69 (1917), 262–277.
- [23] RATNER, B. D. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 2. ed., transferred to digital print ed. Elsevier, Acad. Press, Amsterdam [u.a.], 2011.
- [24] SCHMITZ, S. *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. ed. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [25] SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., AND ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 7 (2012), 671–675.
- [26] SHARPE, J., AHLGREN, U., PERRY, P., HILL, B., ROSS, A., HECKSHER-SØRENSEN, J., BALDOCK, R., AND DAVIDSON, D. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science (New York, N.Y.)* 296, 5567 (2002), 541–545.
- [27] VOIE, A. H., BURNS, D. H., AND SPELMAN, F. A. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *Journal of Microscopy* 170, 3 (1993), 229–236.

Abkürzungen und Symbole

AD	Außendurchmesser
CAD	computer-aided design
CRISTAL	curing resin-infiltrated sample for transparent analysis with light
CT	computed tomography
cw	continuous wave
DIN	Deutsches Institut für Normung
DOF	depth of field
FOV	field of view
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hES-Zellen	humane embryonale Stammzellen
I ² C	inter-integrated circuit
ID	Innendurchmesser
KBE	koloniebildende Einheit
NC	normally closed
NO	normally open
OPT	optical projection tomography
PES	Polyethersulfon
PMMA	Polymethylmethacrylat, Plexiglas
PMT	photomultiplier tube
POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCL	serial clock
SDA	serial data
SLOT	scanning laser optical tomography
USB	universal serial bus
UV	Ultraviolett

Dankesworte

Mein herzlichster Dank gilt all denjenigen, die mich beim Entstehen meiner Masterarbeit auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben. Alle Personen namentlich zu nennen, ist sicherlich unmöglich, jedoch gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Dario Anselmetti, Dr. Heiko Meyer, Dr. Marko Heidrich, Lena Nolte, Georgios Antonopoulos, Moritz Hitzemann, Dr. Raoul-Amadeus Lorbeer, Anton Hördt, Stefan Kalies, Miroslav Zabic, Dr. Tammo Ripken, Dr. Alexander Krüger, Dr. Dag Heinemann, Dr. Nadine Tinne, Jan Hahn, Margaux Schmeltz, meinen Bürokollegen Benjamin, Basti, Fabian, Dierk, Sina und Thomas sowie der gesamten Abteilung Biomedizinische Optik, Christina Kropp, der mechanischen Werkstatt am LZH e.V., meinen Freunden und meiner Familie

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt habe.

Hannover, den

(Tanja Beckmann)