

## Astigmatisches Partikel Tracking phosphoreszirender Partikel zur 3D Sauerstoffkonzentrationsmessungen in Hydrogelen

### Astigmatic particle tracking of phosphorescent particles for 3D oxygen concentration measurements in hydrogels

Till Werner<sup>1,\*</sup>, Mareike Schmidt<sup>2</sup>, Bastian J.M. Etzold<sup>2,3</sup>, Anna Fritschen<sup>4</sup>, Andreas Blesser<sup>4</sup>, Jeanette Hussong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fachgebiet für Strömungslehre und Aerodynamik, Technische Universität Darmstadt

<sup>2</sup>Ernst-Berl-Institut für Technische Chemie und Makromolekulare Wissenschaften, Technische Universität Darmstadt

<sup>3</sup>Lehrstuhl für Power-to-X-Technologien, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

<sup>4</sup>Fachgebiet für Biomedizinische Drucktechnologie, Technische Universität Darmstadt

\* Korrespondierender Autor: werner@sla.tu-darmstadt.de

Astigmatische Partikelverfolgung, Sauerstoffkonzentration, Lumineszenz-Lebensdauer  
Astigmatic Particle Tracking, Oxygen Concentration, Luminescence Lifetime

#### Zusammenfassung

In dieser Arbeit kombinieren wir die astigmatische Partikelverfolgung mit der Charakterisierung des Phosphoreszenzsignalabfalls zur Bestimmung der 3D-aufgelösten Sauerstoffkonzentration in mikrofluidischen Systemen. In unseren Experimenten erreichen wir Unsicherheiten in der Tiefenposition von weniger als 1  $\mu\text{m}$  und Unsicherheiten in der Sauerstoffkonzentration von weniger als 2 ppm. Der kalibrierte Messbereich umfasst Sauerstoffkonzentrationen von 0,6 ppm bis 27,6 ppm. Es wird eine Methode zur Korrektur von Messfehlern aufgrund von Photobleiche vorgestellt. Dabei werden die Anregungsenergie, die kumulative Belichtungszeit und das räumlich variierende Intensitätsprofil des Lasers bei der Korrektur berücksichtigt. Mit dieser Methode können selbst nach Tausenden von Anregungszyklen geringe Messfehler von weniger als 2 ppm bei Umgebungsbedingungen erreicht werden. So werden 3D-Sauerstoffkonzentrationen in einer mit Agarose-Hydrogel gefüllten mikrofluidischen Kammer gemessen, über die verschiedene Druck- und Sauerstoffgradienten unabhängig voneinander eingestellt werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sauerstoffdiffusion durch eine interstitielle Strömung überlagert wird, die die resultierende Sauerstoffkonzentration erheblich verändert.

#### Einleitung

Dreidimensionale Organoiden bieten ein großes Potenzial den Entwicklungsprozess neuer Medikamente zu beschleunigen (Mittal et al. 2019). Um eine adäquate Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, ist die Entwicklung von entsprechenden Versorgungsnetzwerken notwendig (Traore und George 2017). Hier ist besonders die Sauerstoffversorgung entscheidend, da sie für eine Vielzahl von biologischen Prozessen relevant ist (Palacio-Castañeda et al. 2022). Um Sauerstoffkonzentrationen in Mikrofluidischen- und Zellkulturanwendungen zu messen werden unter anderem lumineszenzlöschende Farbstoffe verwen-

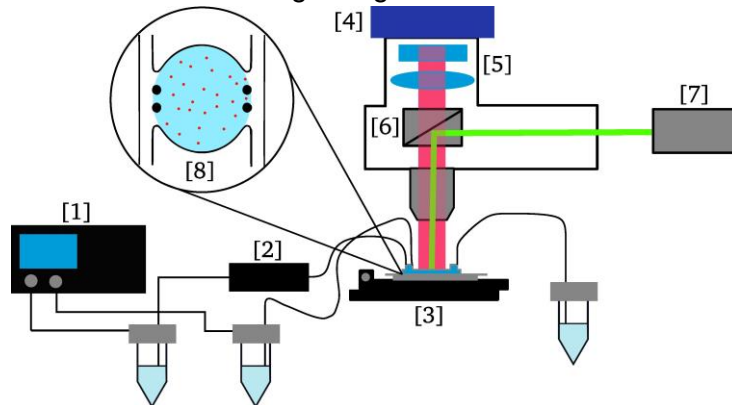
det (Azimzadeh et al. 2021). Wenn die Daten 3D aufgelöst werden, kommen konfokale Mikroskope (Wesseler et al. 2022; Wilson et al. 2019) und Lichtschnittmikroskope (Mei et al. 2023) zum Einsatz. Bei mikrofluidischen Strömungsmessungen hingegen werden die Partikelpositionen häufig mittels astigmatischer Partikelverfolgung (APT) rekonstruiert. Dabei wird ein Astigmatismus in das optische System eingebracht, um eine tiefenabhängige Verzerrung des Partikelbildes zu erzeugen. Auf diese Weise kann die Position des Partikels entlang der optischen Achse direkt aus einem Bild mit Fehlern von weniger als  $1\ \mu\text{m}$  bestimmt werden (Cierpka et al. 2010). Dieser Ansatz ermöglicht eine direkte Positionsrekonstruktion ohne die Notwendigkeit eines Scanvorgangs, wie er bei konfokalen oder Lichtschnittmikroskopen erforderlich ist. Folglich ist eine schnellere Datenerfassung möglich, und es werden kleinere Datensätze benötigt. Massing et al. 2016 und Massing et al. 2018 haben gezeigt, dass auch die Kombination von Lumineszenzmessungen mit APT möglich ist. Angesichts der oben genannten Vorteile gegenüber anderen 3D-Methoden wenden wir die astigmatische Rekonstruktionstechnik auf 3D-Sauerstoffmessungen in mikrofluidischen Chips an. Darüber hinaus wird das häufige Problem der Photobleiche mit einem detaillierten Kalibrierungsverfahren berücksichtigt. Photobleiche beschreibt die irreversible Schädigung eines Lumineszenzfarbstoffs durch photokatalytische Reaktionen, die bei jedem Anregungszyklus ablaufen (Demchenko 2020). Das Kalibrierungsverfahren und die Messtechnik werden zur Analyse von Konzentrationsprofilen in der Hydrogelkammer eines mikrofluidischen Chips eingesetzt. Dabei wird der Sauerstoffgradient von einem entgegengesetzten Druckgradienten überlagert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die überlagerte interstitielle Strömung die Sauerstoffkonzentration in der Gelkammer erheblich verändert.

### **Experimenteller Aufbau**

Der Versuchsaufbau besteht aus drei Hauptkomponenten: dem optischen Aufbau, dem Oxygenator und dem zu untersuchenden mikrofluidischen Chip. Der Hauptbestandteil des optischen Aufbaus ist ein Epifluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse LV 100), welches mit einem Objektiv mit einer Vergrößerung von  $M=20$  und einer numerischen Apertur von  $NA=0,4$  ausgestattet ist. Als Detektor wird ein Doppelbild-CCD verwendet. Zwischen der Feldlinse des Mikroskops ( $M=0,7$ ) und der Kamera ist eine zusätzliche Zylinderlinse platziert, um astigmatische Partikelbilder zu erzeugen. Außerdem ist das Mikroskop mit einem geregelten x-y-Tisch (Applied Scientific Instrumentation Inc.) und einem geregelten piezobetätigten z-Tisch (nanoFaktur GmbH) ausgestattet. Das Messvolumen wird mit einem frequenzverdoppelten, gepulsten Nd:YAG-Laser (New Wave Research Inc.) beleuchtet.

Ein Druckregler (ELVESYS S.A.S) regelt unabhängig den Durchfluss in zwei Kanälen des mikrofluidischen Aufbaus über eine PID-Regelschleife. Als Durchflusssensoren werden zwei temperaturbasierte Sensoren (Sensirion AG) mit einer Genauigkeit von 5% des Messwerts verwendet. Der eine Druckbehälter ist direkt mit dem mikrofluidischen Chip verbunden, während in der zweiten Leitung der Oxygenator vor dem Chip platziert ist. Letzterer steuert die Sauerstoffkonzentration in dieser Leitung. Dazu wird ein hoch gasdurchlässiger Teflon AF-2400-Schlauch in ein Edelstahlrohr eingesetzt. Das Wasser fließt durch den Teflon-AF-Schlauch, während die Gasphase zwischen Stahl- und Teflon-AF-Rohr von zwei Massendurchflussreglern (Bronkhorst High-Tech B.V.) für Sauerstoff und Stickstoff eingestellt wird. Im Anschluss an die Schlauch-In-Rohr-Anordnung wird der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Wasser mit einem optischen Sauerstoffsensoren (PreSens Precision Sensing GmbH) gemessen. Nach dem Oxygenator werden Polyetheretherketon (PEEK)-Schläuche und ein kurzer Verbindungsschlauch aus Fluorethylenpropylen (FEP) verwendet, um die Menge an Sauerstoff zu minimieren, die herausdiffundiert, bevor das Wasser das Experiment erreicht.

Der Mikrofluidik-Chip besteht aus einer runden Hydrogelkammer mit einem Durchmesser von 3 mm. An zwei Seiten der Kammer ist sie zu rechteckigen, 500 µm breiten Kanälen geöffnet. Um die Gefahr des Eindringens von Hydrogel in die Kanäle zu verringern, befinden sich zwischen der Kammer und den Kanälen zwei runde Säulen mit einem Durchmesser von 250 µm. Die Höhe des Chips beträgt 500 µm. Abbildung 1 zeigt eine Skizze des gesamten Aufbaus, wobei Nummer [8] den mikrofluidischen Chip darstellt. Hier symbolisieren die roten Punkte die Sauerstoffsensorteilchen. Um eine Druckdifferenz zwischen den beiden Kanälen zu erzeugen, wird dem Chip eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 250 µm und einer Länge von 36,8 mm nachgeschaltet. Die Schläuche nach dem Chip haben dieselbe Länge und enden im gleichen Reservoir. Letzteres ist zur Umgebung hin offen.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit den Elementen: [1] Druckregler, [2] Oxygenator, [3] x-y-z-Tisch, [4] CCD-Kamera, [5] Linsensystem mit Zylinder- und Feldlinse, [6] dichorischer Spiegel, [7] Nd:YAG-Laser, [8] Mikrofluidik-Chip mit Hydrogel in blau und Partikeln in rot.

Die Kalibrierungsversuche werden in einer Metallzelle mit einem Saphirglasfenster durchgeführt, in der ein Hydrogeltropfen platziert werden kann. Sie wird mit Wasser einer definierten Sauerstoffkonzentration durchströmt.

### Messmethodik

Die Sauerstoffkonzentration wird durch die Charakterisierung des Lumineszenzsignals eines sauerstofflöschenden Farbstoffs quantifiziert. In unserem Fall sind Polystyrolpartikel mit einem Durchmesser von 5 µm mit Platin(II)-5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorphenyl)-porphyrin (PtTFPP) gefärbt (Surflay Nanotec GmbH). Die Partikel werden in ein einprozentiges Agarose-Hydrogel gegeben. In dem Hydrogel fungieren die Partikel als stationäre, punktförmige Sauerstoffsensoren. Nachdem die Farbstoffmoleküle durch den Laser angeregt worden sind, können sie in einen Triplet-Zustand überwechseln. Aus diesem Zustand kann Energie durch Phosphoreszenz, aber auch durch dynamisches Quenchen mit Sauerstoff emittiert werden. Folglich nimmt die beobachtete Lichtintensität sowie die Zeitspanne, in der sie beobachtet werden kann, mit zunehmender Sauerstoffkonzentration ab (Papkovsky 1993). In dieser Arbeit wird die Lebensdauer als Maß für den gelösten Sauerstoff verwendet. Folgt der Lumineszenzsignalabfall einer einfachen Exponentialfunktion, so sind zwei Bilder eines Abfalls ausreichend um die Lebensdauer zu ermitteln (Woods et al. 1984). In der Realität weicht der Zerfall oft von einer monoexponentiellen Funktion ab, was zu nicht linearen Kalibrierkurven führt. Zur Bestimmung der Intensitäten der Partikelbilder werden jeweils die 100 hellsten Pixel ausgewertet. Um das Rauschen zu kompensieren, werden fünf Doppelbilder der gleichen Partikel aufgenommen und mit einem Minimumfilter kombiniert.

Ein häufiges Problem bei quantitativen Lumineszenzmessungen ist Photobleiche (Demchenko 2020). Daher wird dieser Effekt systematisch kalibriert und die Belichtungshistorie jedes Partikels verfolgt, um die Anzahl der möglichen Messungen mit annehmbarem Fehler zu erhöhen.

Um den Einfluss des Verbllassens zu kompensieren, muss sichergestellt werden, dass dieses unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ist, da sonst eine Kompensation nicht möglich ist (siehe Kapitel: Ergebnisse der Kalibrierung). Darüber hinaus skaliert der Photobleicheeffekt nicht nur mit der Gesamtenergie, der das Partikel ausgesetzt war, sondern ist auch von den Intensitäten der einzelnen Belichtungen abhängig (Demchenko 2020). Folglich muss der Einfluss der Anregungsenergie der einzelnen Belichtungen sowie der Photobleicheeffekt über mehrere Pulse hinweg kalibriert werden. Auf Basis von Partikelbildern aufgenommen über 5000 Anregungszyklen bei verschiedenen Anregungsenergien schlagen wir eine empirische Beziehung vor, um den Einfluss der Photobleiche eines Partikels auf das Intensitätsverhältnis vorherzusagen:

$$\frac{I_R}{I_{R0}} = a(nE_{ex}(r))^{1,66} + 1$$

Dabei ist  $I_{R0}$  das mit neuen, ungebleichten Partikeln gemessene Intensitätsverhältnis.  $I_R$  steht für das erwartete Intensitätsverhältnis nach  $n$  Laserpulsen mit einer Pulsenergie von  $E_{ex}$ , während  $a$  und  $b$  Fittingfaktoren sind. Die nicht lineare Abhängigkeit des Verbllassens von der Anregungsenergie ist bekannt (Eggeling et al. 1998). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch bei der Betrachtung des Intensitätsverhältnisses eine nichtlineare Skalierung erforderlich ist, um die Abhängigkeit von der Anregungsenergie zu beschreiben (siehe: Ergebnisse der Kalibrierung). Aufgrund des begrenzten Platzes unter dem Mikroskopobjektiv ist es nicht möglich, die Laserenergie am Messort zu bestimmen. Die Energie wird stattdessen vor der Strahlauflaufweite, dem Diffusor und dem Mikroskop gemessen. Unter der Voraussetzung, dass der optische Pfad gegenüber dem bei der Bleichkalibrierung verwendeten unverändert bleibt, werden die erzielten Ergebnisse nicht beeinträchtigt. Weiterhin ist das Intensitätsprofil des Laserstrahls für eine genaue Vorhersage des Ausbleichens in einer realen Messung erforderlich. Es wird mit einem herkömmlichen Strahlprofilometer gemessen, welches entlang der Strahlachse verfahren wird, um das Profil über die gesamte Höhe des Messvolumens zu erfassen. Dabei wird festgestellt, dass der Einfluss der z-Koordinate gering ist. Es wird vereinfacht angenommen, dass das Intensitätsprofil unabhängig von der tiefen Koordinate ist und dass der Brechungsindexunterschied zwischen Luft und Hydrogel vernachlässigt werden kann. Darüber hinaus wird angenommen, dass das Strahlprofil radialsymmetrisch ist, was das Fitten einer Gauß-Kurve höherer Ordnung ermöglicht, die nur vom radialen Abstand vom Strahlenmittelpunkt abhängt. Die Kombination des Strahlprofils mit der obigen Gleichung ermöglicht die räumliche Vorhersage des Bleichens. Dank der Skalierung der Anregungsenergie kann auch das Verbllassen von Partikeln vorhergesagt werden, deren Anregungsenergie sich im Laufe der Messung ändert.

Während die x-y-Position der Partikel direkt aus den Bildern bestimmt werden kann, wird die Tiefenposition durch den weitverbreiteten, astigmatischen Ansatz rekonstruiert (Kao und Verkman 1994; Brockmann et al. 2020; Cierpka et al. 2010). Die Form des defokussierten Partikelbildes wird durch die Breite des Autokorrelationspeaks in x- und y-Richtung charakterisiert, die mit  $a_x$  bzw.  $a_y$  bezeichnet werden. Die bei der Messung erhaltenen Werte werden dann durch ihren kürzesten euklidischen Abstand auf eine Kalibrierkurve abgebildet. Die Kalibrierungskurve wird in der Regel durch das Aufnehmen von Bildern sedimentierter Partikel an verschiedenen bekannten Tiefenpositionen (Cierpka et al. 2010) erstellt. Es wird empfohlen, die Kalibrierungskurve unter realen optischen Bedingungen zu erstellen. In unseren Experimenten sind die Partikel zufällig in einem Gel verteilt und können nicht sedimentieren, sodass die Kalibrierkurven einzelner Partikel in Bezug auf ihre z-Position verschoben werden müssen. Dazu definieren wir ein Partikel als Nullposition und bestimmen eine Kalibrierkurve. Anschließend wird die Partikelverschiebung in z-Richtung der anderen Partikel so bestimmt, dass der

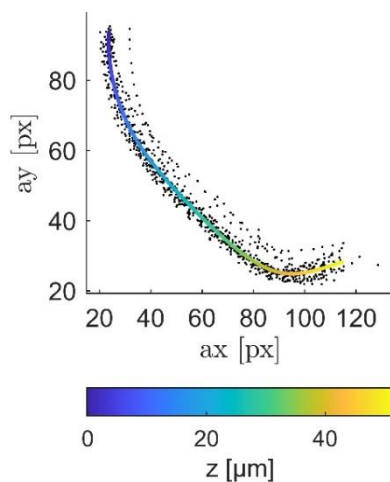
Abstand ihrer ax-ay-Wertepaare relativ zur Kalibrierkurve des Referenzpartikels minimal ist. Abschließend wird eine Kalibrierkurve an alle Partikel gefittet.

### Ergebnisse der Kalibrierung

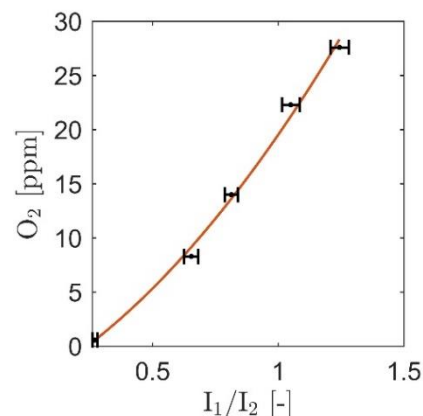
Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der verschiedenen Kalibrierungen vorgestellt. Abbildung 2 a) zeigt die für die Rekonstruktion der Tiefenposition verwendete Euklidische-Kalibrationskurve. In dieser Grafik ist die Breite des Korrelationspeaks entlang x gegen die Breite des Korrelationspeaks entlang y aufgetragen. Die Farbe der Punkte kennzeichnet die entsprechende z-Position. Obwohl sich die Partikel während der Kalibrierung an unterschiedlichen z-Positionen befinden, wird bei dieser beispielhaften Kalibrierung eine Standardabweichung von  $0,74 \mu\text{m}$  bei einem Messbereich von  $50 \mu\text{m}$  erreicht. Bei der Berechnung des Fehlers wird davon ausgegangen, dass die Position jedes Partikels, die durch das in Kapitel Messmethodik beschriebene Verfahren geschätzt wurde, richtig ist. Die Fehler sind vergleichbar mit anderen in der Literatur beschriebenen APT-Messungen (Brockmann et al. 2020).

Die Kalibration für die Sauerstoffkonzentration ist in Abbildung 2 b) dargestellt. Hier ist die Sauerstoffkonzentration über dem Intensitätsverhältnis aus Bild 1 und 2 aufgetragen. Die schwarzen Punkte stellen den Mittelwert von mindestens 79 Partikeln bei einem bestimmten Sauerstoffgehalt dar, und die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung des Intensitätsverhältnisses an. Die orangefarbene Linie stellt eine quadratische Anpassung dar, die mit der Standardabweichung der einzelnen Datenpunkte gewichtet wurde. Die Ergebnisse weichen geringfügig von einer linearen Kurve ab, was wahrscheinlich auf einen exponentiellen Zerfall der Signalintensitäten höherer Ordnung zurückzuführen ist. Über den gezeigten Messbereich werden Standardabweichungen unter 2 ppm erreicht.

a)



b)

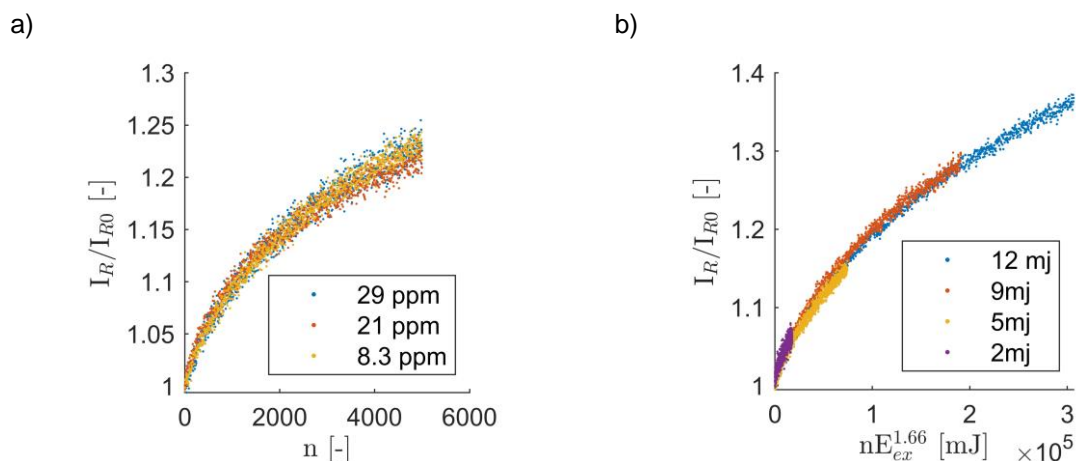


**Abbildung 2** Kalibrationsdaten für a) die Positionsrekonstruktion und b) die Sauerstoffkonzentration; Hier sind die Messdaten in schwarz und ein quadratischer fit in orange dargestellt.

Im folgenden Abschnitt werden die Kalibrierungsergebnisse zur Kompensation des Bleichefekts vorgestellt. In Abbildung 3 a) wird der Einfluss der umgebenden Sauerstoffkonzentration untersucht. Dazu werden die Intensitätsverhältnisse von Partikeln, die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, über 5000 Anregungen hinweg aufgenommen. Das Diagramm zeigt das mittlere Intensitätsverhältnis in jedem Bild über die Anzahl der Anregungen. Die Daten werden mit dem Intensitätsverhältnis des ersten Bildes  $I_{R0}$  normiert. Die drei Gruppen verhalten sich identisch, was die Voraussetzung dafür ist, den Einfluss des Bleichens kompensieren zu können. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die die Photobleiche verursachen. Manche der Reaktionen sind sauerstoffabhängig. Für

detailliertere Informationen kann auf zusammenfassende Literatur von z.B. Demchenko 2020 zurückgegriffen werden. In unseren Experimenten kommen wir zu dem Schluss, dass der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Änderung des Intensitätsverhältnisses vernachlässigbar klein ist.

Um die räumlich variierenden Intensität des anregenden Strahls zu berücksichtigen, ist eine Skalierung der Energie notwendig. Wie in Abschnitt Messmethodik erwähnt, schlagen wir  $nE_{ex}^{1,66}$  als Skalierungsfaktor vor. Die sehr gute Eignung dieser Skalierung zeigt Abbildung 3 b), in der die mittleren normalisierten Intensitätsverhältnisse mehrerer Partikel über den Skalierungsfaktor für verschiedene Anregungsenergien aufgetragen sind. Für diese Analyse werden nur Datenpunkte gemittelt, die mit mindestens 90 % der maximalen Energie angeregt wurden.



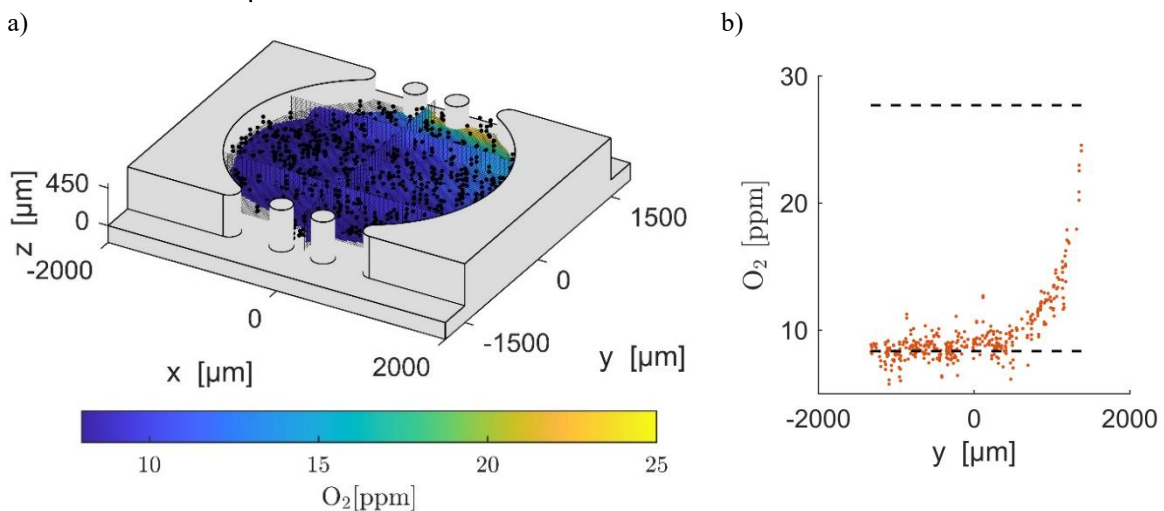
**Abbildung 3** Einfluss des Bleichens der Partikel auf das Intensitätsverhältnis a) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und b) für verschiedene Anregungsenergien.

Setzt man die mit dem Strahlprofilometer gemessene Gaußsche Intensitätsverteilung in die empirische Gleichung aus Kapitel Messmethodik ein und fitted die Parameter a und b auf die Kalibrierungsdaten, ist eine effektive Korrektur möglich. Über 5000 Anregungen steigt der mittlere absolute Fehler des korrigierten Falls leicht von 0,6 ppm auf 1,2 ppm. Bei den nicht korrigierten Daten würde der mittlere absolute Fehler auf 6,0 ppm ansteigen. Die Analyse wird bei Umgebungsbedingungen durchgeführt. Es sei darauf hingewiesen, dass bei allen in diesem Abschnitt vorgestellten Auswertungen fünf Bilder mit einem Minimumfilter kombiniert werden, um den Einfluss des Rauschens zu verringern. In der Praxis würde der analysierte Fehlerbereich daher 1000 Messungen eines Partikels umfassen.

### Messungen im mikrofluidischem Chip

Für das nachfolgend beschriebene Experiment wird die runde Kammer mit 1 % Agarose-Hydrogel gefüllt, das mit ca. 0,0065 Gew.-% PtTFPP-Partikeln versetzt ist. Bei der Messung wird durch den Druckregler in beiden Kanälen eine konstante Durchflussrate von 300  $\mu$ l/min erzeugt. Die Konzentration der Gasatmosphäre in der Schlauch-In-Rohr-Anordnung wird so eingestellt, dass sie 80% Sauerstoff und 20% Stickstoff enthält. Daraus ergibt sich in einem Kanal eine Sauerstoffkonzentration von 27,6 ppm, während der zweite Kanal bei Umgebungsbedingungen gehalten wird, was einer Konzentration von 8,3 ppm entspricht. In dem Kanal, in dem die Sauerstoffkonzentration der Umgebung beibehalten wird, ist der Druck um 19 mbar erhöht. Sobald die Sauerstoffkonzentration des durch den Oxygenator geleiteten Wassers ein stabiles Niveau erreicht hat, werden die Bedingungen für weitere 60 Minuten aufrechterhalten, um einen stationären Zustand in der Gelkammer des Chips zu erreichen. Abbildung 4 a) zeigt das 3D-Konzentrationsprofil in der Mikrofluidikkammer. Das aufgeschnittene CAD-Modell des

Chips ist hellgrau dargestellt. Die schwarzen Punkte stellen die Partikelpositionen im Chip dar. Eine „natural nearest neighbour“ Interpolation wird genutzt, um das Konzentrationsprofil auf einem regelmäßigen Gitter zu erhalten. In der z-Richtung werden keine Gradienten beobachtet. Trotz der Symmetrie des Chips ist die Sauerstoffkonzentration auf der rechten Seite der Kammer etwas höher. Dies kann auf eine ungleichmäßige Füllung der Gelkammer zurückgeführt werden, die durch das Fehlen von Partikeln im oberen linken Teil der Kammer erkennbar ist. Entlang der y-Richtung ist die Konzentration bis jenseits der Kammermitte konstant. Über die letzten 750  $\mu\text{m}$  nimmt sie deutlich zu und nähert sich der Konzentration im Kanal an. In Abbildung 4 b) sind die Datenpunkte mit  $-250\mu\text{m} < x < 250\mu\text{m}$  entlang ihrer Position auf der y-Achse aufgetragen. Hier ist das steile Profil deutlich zu erkennen. Dies zeugt von einem starken Einfluss des Druckgradienten auf die resultierende Konzentration. Bei einem rein diffusiven Sauerstofftransport wäre ein lineares Profil zu erwarten.



**Abbildung 4** Sauerstoffkonzentration in der Gelkammer mit einem Druckgradienten, der dem Sauerstoffgradienten entgegengesetzt ist a) interpoliert auf einem regelmäßigen Gitter und b) entlang der y-Achse für  $-250 \mu\text{m} < x < 250 \mu\text{m}$ .

### Fazit

In dieser Arbeit wird die astigmatische Partikelverfolgung mit der Charakterisierung des Phosphoreszenzsignalabfalls kombiniert, um die 3D-Sauerstoffkonzentration in mikrofluidischen Systemen zu messen. Diese Technik ermöglicht Messungen mit Unsicherheiten von weniger als  $1 \mu\text{m}$  in der Tiefenkoordinate und Unsicherheiten von weniger als 2 ppm in der Sauerstoffkonzentration. Die Messungen können mit herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopen durchgeführt werden, die in vielen biologischen und mikrofluidischen Labors vorhanden sind. Die astigmatische Rekonstruktion ermöglicht eine schnelle Datenerfassung. Besonderes Augenmerk wird auf eine systematische Korrektur des Photobleiche-Effekts gelegt. In unseren Experimenten wird ein signifikanter Einfluss des Photobleiche-Effekts auf die Messdaten beobachtet, wenn die Partikel mehrfach angeregt werden. Mit dem vorgeschlagenen Verfahren sind valide Messungen über Tausende von Anregungszyklen möglich. Daher kann der Sauerstoffgehalt mehrfach mit denselben Partikeln gemessen werden, um z.B. sich ändernde Sauerstoffkonzentrationen während Langzeitexperimenten zu überwachen. Gemessen wird das Konzentrationsprofil in einer Gelkammer mit einem Druck- und Sauerstoffgradienten, die in entgegengesetzter Richtung wirken. Dabei wird ein signifikanter Einfluss der interstitiellen

Strömung auf die Konzentration beobachtet. Der vorgeschlagene Versuchsaufbau in Kombination mit der Messtechnik ermöglicht eine Methodik zur minimal-invasiven Echtzeit-Analyse des 3D-Sauerstofftransports.

### Dankesworte

Die Autoren bedanken sich für die finanzielle Unterstützung durch das LOEWE-Forschungscluster FlowForLife. Außerdem danken die Autoren der Ibidi GmbH für die Bereitstellung der mikrofluidischen Chips.

### Literatur

**Azimzadeh, M., Khashayar, P., Amereh, M., Tasnim, N., Hoorfar, M., Akbar, M., 2021:** "Microfluidic-Based Oxygen (O<sub>2</sub>) Sensors for On-Chip Monitoring of Cell, Tissue and Organ Metabolism", *Biosensors*, Bd. 12, Nr. 1, S. 6.

**Brockmann, P., Kazerooni, H. T., Brandt, L., Hussong, J., 2020:** "Utilizing the ball lens effect for astigmatism particle tracking velocimetry", *Experiments in Fluids*, Bd. 61, Nr. 67, S. 1–19.

**Cierpka, C., Rossi, M., Segura, R., Kähler, C. J., 2010:** "On the calibration of astigmatism particle tracking velocimetry for microflows", *Measurement Science and Technology*, Bd. 22, Nr. 1, S. 15401.

**Demchenko, A. P., 2020:** "Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection\*", *Methods and Applications in Fluorescence*, Bd. 8, Nr. 2, S. 22001.

**Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., Seidel, C. A. M., 1998:** "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis", *Analytical Chemistry*, Bd. 70, Nr. 13, S. 2651–2659.

**Kao, H. P., Verkman, A. S., 1994:** "Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position", *Biophysical Journal*, Bd. 67, Nr. 3, S. 1291–1300.

**Massing, J., Kaden, D., Kähler, C. J., Cierpka, C., 2016:** "Luminescent two-color tracer particles for simultaneous velocity and temperature measurements in microfluidics", *Measurement Science and Technology*, Bd. 27, Nr. 11, S. 115301.

**Massing, J., Kähler, C. J., Cierpka, C., 2018:** "A volumetric temperature and velocity measurement technique for microfluidics based on luminescence lifetime imaging", *Experiments in Fluids*, Bd. 59, Nr. 11, S. 163.

**Mei, X., Fang, Q., Selvaganapathy, P. R., 2023:** "Three-dimensional oxygen concentration monitoring in hydrogels using low-cost phosphorescence lifetime imaging for tissue engineering", *Biomedical Optics Express*, Bd. 14, Nr. 9, S. 4759–4774.

**Mittal, R., Woo, F. W., Castro, C. S., Cohen, M. A., Karanxha, J., Mittal, J. et al., 2019:** "Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications", *Journal of cellular physiology*, Bd. 234, Nr. 6, S. 8352–8380.

**Palacio-Castañeda, V., Velthuijs, N., Le Gac, S., Verdurmen, W. P. R., 2022:** "Oxygen control: the often overlooked but essential piece to create better in vitro systems", *Lab on a Chip*, Bd. 22, Nr. 6, S. 1068–1092.

**Papkovsky, D. B., 1993:** "Luminescent porphyrins as probes for optical (bio) sensors", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Bd. 11, Nr. 1-3, S. 293–300.

**Traore, M. A., George, S. C., 2017:** "Tissue Engineering the Vascular Tree", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Bd. 23, Nr. 6, S. 505–514.

**Wesseler, M. F., Johansen, M. N., Kiziltay, A., Mortensen, K. I., Larsen, N. B., 2022:** "Optical 4D oxygen mapping of microperfused tissue models with tunable in vivo-like 3D oxygen microenvironments", *Lab on a Chip*, Bd. 22, Nr. 21, S. 4167–4179.

**Wilson, R. L., Connell, J. P., Grande-Allen, K. J., 2019:** "Monitoring oxygen levels within large, tissue-engineered constructs using porphyrin-hydrogel microparticles", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Bd. 5, Nr. 9, S. 4522–4530.

**Woods, R. J., Scypinski, S., Love, L. J. C., 1984:** "Transient digitizer for the determination of microsecond luminescence lifetimes", *Analytical Chemistry*, Bd. 56, Nr. 8, S. 1395–1400.