

Steuerung eines Detektors durch LabVIEW für Zellexpositionsstudien

Pierre Madl, Benjamin Lehner, Philipp Meyer, Paolo Sereni
Universität Salzburg, Institut für Physik & Biophysik, Salzburg, Österreich

Kurzfassung

Die hier beschriebene Arbeit befasst sich mit dem in Fertigstellung befindlichen „Kohärenzmonitor“ für die schnelle Erfassung von ultra-schwachen elektromagnetischen Emissionen aus biologischen Proben. Dafür wurde sowohl für Kern- als auch für Peripherie-Komponenten eine spezifische Steuerung programmiert, welche in der Lage ist, Photonenvervielfacher, Temperaturregelung, elektromechanische Blenden, LED-Kaskade und Stroboskop anzusteuern. Durch die Steuerung sind zwei elementare Messmodi (spontaner und induzierter) realisierbar, welche die Emissionen der Lebendproben charakterisieren. Die gesamte Programmstruktur wurde in LabVIEW 2013 entwickelt.

Abstract

The article describes a finalized “coherence monitor” which is able to detect ultra-weak electromagnetic emissions originating from biological samples in almost real-time. Due to specific hardware requirements, a tailor-made software-solution was developed, which controls a photo multiplier, temperature and relative humidity sensors, electro-mechanical shutters, and an illumination source consisting of four-color LEDs as well as a strobe-light. The software is designed to enable two fundamental but distinct modes of operation (spontaneous and induced) in order to characterize living samples. The whole software is written in LabVIEW 2013.

Photonenemissionen von Lebendproben

Im Unterschied zur Chemo- oder Biolumineszenz, kennt man in der Biologie auch noch elektromagnetische Emissionen, welche um zwei bis vier Größenordnungen schwächer sind als erstgenannte. Das Phänomen liegt fast allen Lebensformen zugrunde und betrifft einen Emissionsbereich von $\lambda = 200 \text{ nm}$ bis 800 nm , wobei die Flussrate (bei Zellkulturen im spontanen Emissionsmodus) typischerweise bei $\sim 1 \text{ Photon} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ liegt. Dieser Photonenfluss nimmt zu, je komplexer die Probe strukturiert ist und kann $\sim 100 \text{e Photonen} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ erreichen. Im induzierten Messmodus erzielt man sogar ein Vielfaches davon. Aufgrund des biogenen Ursprungs, werden diese ultra-schwachen Emissionen auch Biophotonen genannt. [1]

Einsatzbereiche dieser Technologie

Lebendproben emittieren „schwache“ Photonenströme aus zwei unterschiedlichen Gründen. Neben den reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS-spezifisch) [2], stellt die Emission durch Dekohärenz [3] die zweite große Emissionsgruppe dar. Für den hier in Fertigstellung befindli-

chen Detektor, soll nicht auf die Unterschiede der zugrunde liegenden Mechanismen eingegangen, sondern der Fokus auf das Messprinzip bzw. die Ansteuerung selbst gelegt werden. Die nicht-invasive und innert Minuten durchführbare Detektion dieser zellspezifischen Signale ermöglicht die Untersuchung: i) physiko-chemischer Stresseinwirkung auf biologische Proben (Vitalität); ii) der intra-zellulären Biokommunikation während der Ontogenese; iii) der Korrelation von Metabolismus und neg-/Entropie; iv) der interzellulären Biokommunikation bei mehrzelligen Proben sowie v) in der Systemtheorie; und vi) des Einflusses toxischer Stoffe in Vielzellern zudem kann sie vii) dazu benutzt werden zwischen konventionell und biologisch gezogenen Lebensmitteln zu unterscheiden.

Das hier vorgestellte System erfüllt eine Vielzahl von verschiedenen Anforderungen, denn es erlaubt nicht nur die Erfassung biogener Photonen, sondern auch, Stressoren gezielt auf die Proben zu bringen und die daraus resultierende Reaktionsdynamik anhand des Emissionsspektrums zu studieren. Bild 1 veranschaulicht das Konzept. [3] Dabei wurden die Emissionen von Flechten im induzierten Emissionsmodus erfasst; d. h. die Probe wurde im Vorfeld einer jeden Messung für 60 s einem weißen, roten sowie UV-Licht ausgesetzt bzw. mit einer 5 %-Essig-Aerosol-Lösung benebelt – Letzteres führte zu einem klaren Abfall der Signalintensität (Vitalitätsverlust).

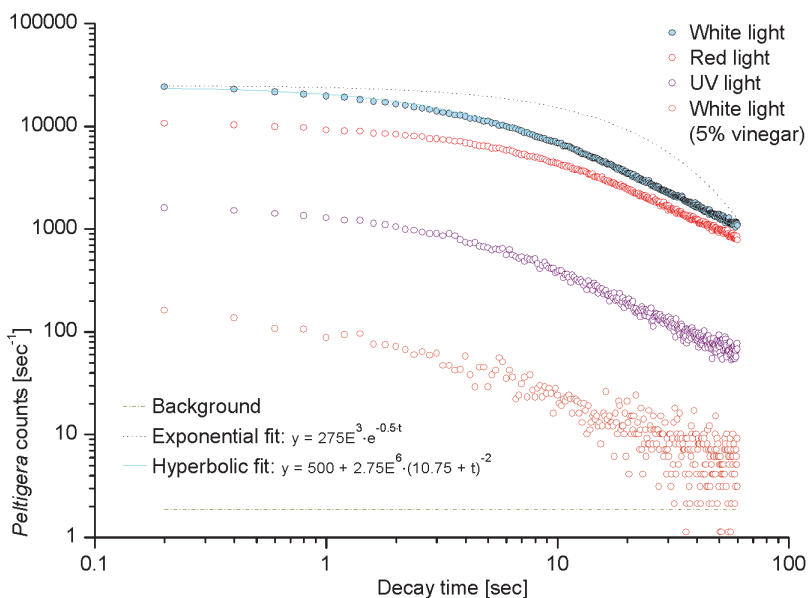


Bild 1: Flechtenemissionen (*Peltigera* sp.) unter variierenden Anregungs-Wellenlängen im induzierten Messmodus. Weißlicht-Datenreihe mit hyperbolischer und exponentieller Funktion unterlegt. Markanter Photonenfluss-Rückgang der mit Weißlicht angeregten Flechte nach Behandlung mit verdünntem Essigaerosol. [4]

Detektorsystem

Das Detektionssystem ist schematisch in Bild 2 dargestellt. Das System lässt sich in zwei verschiedenen Messmodi betreiben, i. e. a) spontanem Emissions-Modus (Messung der dunkel-angepassten Probe ohne vorausgehende elektromagnetische Anregung) und b) indu-

zierter Modus (der Messung geht eine mono- oder polychromatische elektromagnetische Stimulation der Probe über eine klar definierte Zeitdauer voran). Im letzteren Fall erfolgt die Anregung durch eine Vier-Farben-LED-Kaskade oder einen Breitband-Emittenten (Stroboskop).

Anforderungen

Die Kernkomponente bildet der Photonenvervielfacher (PMT), der separat über eine USB-Schnittstelle mit dem Rechner kommuniziert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, darf der Detektor nur unter photonenarmen Bedingungen betrieben werden. Daher muss die Messkammer mit Abschottungselementen, in Form von elektromechanischen Blenden bestückt sein. Um den Detektor möglichst versatil einsetzen zu können, bedient sich die Steuerung zweier myDAQ-Schnittstellen, die mit der Peripherie interagieren; z. B. müssen bei Expositionsversuchen mit Gasen/Aerosolen die Zuleitungsblenden invers zur PMT-Blende geschaltet sein. Wird das System im induzierten Modus betrieben, so sprechen die Schnittstellen die Lichtquellen (RBG-UV-LED oder Stroboskop) nur dann an, wenn die PMT-Blende ebenso geschlossen ist. Weiters benötigen gewisse biologische Proben konstante Bedingungen, damit keine durch die Apparatur induzierten abiotischen Messartefakte generiert werden (Temperatur-Schwankungen während der Messung führen zu Fluktuationen im Zellmetabolismus). Daher ist die Messkammer über ein Peltier-Element und einen PT-1000-Sensor in ihrer Temperatur stabilisiert. Nebenbei erfasst das System laufend die Luftfeuchte der Messkammer. All diese Funktionen werden durch die myDAQs bedient.

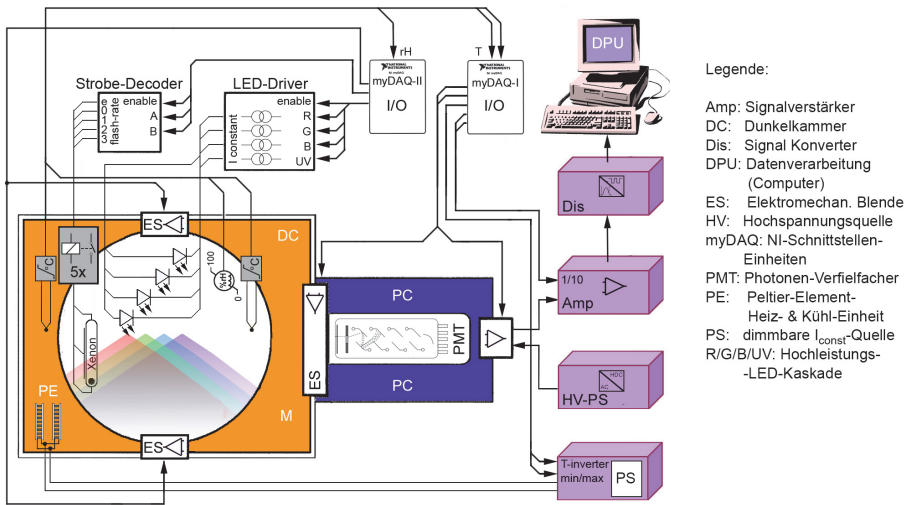


Bild 2: Schematischer Überblick des Detektorsystems [5]

Steuerung

Wie in Bild 3 angeführt, werden einige parallel laufende Regel-, Mess- und Kontrol-VIs betrieben. Diese lassen sich grob in die Kategorien „Shutter-“, LED-, „Strobe-“, „Detector-“ und „Temp-rH“ untergliedern.

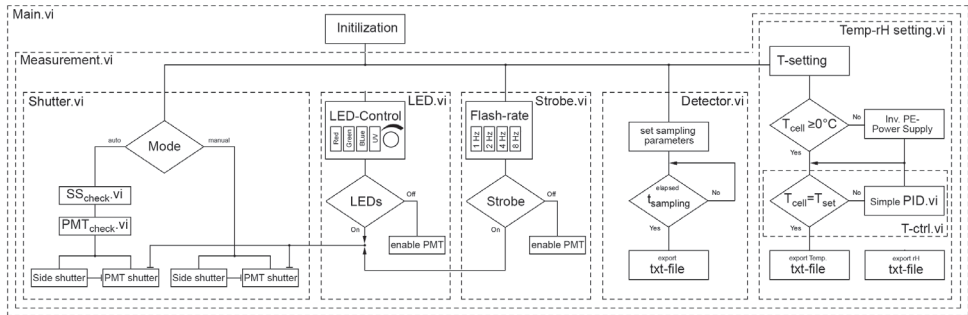


Bild 3: Prozessdiagramm der LabVIEW-Detektorsteuerung.

Blenden (Shutter)

Die Steuerung ermöglicht dem Benutzer, die Blenden über einen manuellen Modus individuell zu öffnen/schließen, oder selbige in einem automatischen Modus mit klar definierten Zyklen zu betreiben. In manchen Experimenten ist außerdem die manuelle Kontrolle der Blenden unerlässlich. Sowohl im automatischen als auch im manuellen Modus ist die Steuerung darauf ausgerichtet, die PMT-Blende über die myDAQ-I nur dann zu öffnen, wenn die seitlichen Blenden (für Gas-Aerosol-Expositionen) geschlossen sind sowie die Anregungselemente für den induzierten Messmodus (LED-Kaskade oder Stroboskop) deaktiviert sind. Die PMT-Blende stellt die wichtigste (Sicherheits-)Barriere zwischen dem PMT und der umgebenden Lichtintensität dar.

Temperatur und relative Feuchte (Temp-rH)

Über zwei analoge, an der myDAQ I angeschlossene PT-100-Sensoren sowie ein Feuchte-Modul am myDAQ II, werden sowohl relative Feuchte und Temperatur in der Messkammer als auch die Temperatur direkt am Peltier-Element erfasst. In weiterer Folge dient ein „simple_PID.vi“ zur Regulation des Peltier-basierten Kühl-Heizmoduls. Der Wert der Konstanten (Proportional-, Integral- und Differential-Regler) wird über die Ziegler-Nichols-Methode bestimmt. Die Zieltemperatur der Kammer wird am Beginn der Experimente festgelegt. Der aktuelle Wert für den Erwärmungs- bzw. Abkühlzyklus am Peltier-Element wird dem Benutzer in Echtzeit angezeigt.

Induzierter Messmodus (via LEDs oder Stroboskop)

Vier unterschiedliche Hochleistungs-LED-Kaskaden (je 12 x R: 625 nm, G: 520 nm, B: 462 nm und UV 365 nm mit jeweils 1 W/LED) kommen beim induzierten Messmodus zum Einsatz. Neben dieser Vier-Farben- steht auch eine Breitband-Anregung per Stroboskop zur Verfügung. Die Lichtquellen müssen daher, noch bevor die PMT-Blende geöffnet wird, dunkelgeschaltet sein, da sonst der PMT irreversibel geschädigt wird. Um das zu vermeiden, sind mehrere Sicherheitsbarrieren im Programm realisiert. Die Stärke der LED-Intensität lässt sich per Pulsweitenmodulation kontinuierlich über das myDAQ II einstellen. Die entsprechende Farbe/Farbmischung der LED-Kaskade wird über vier Digital-IOs ausgewählt bzw. die Blitzfrequenz des Stroboskops (in vier Stufen über einen Dekoder) mit zwei Digital-IOs vorgegeben. Zur sicheren Ansteuerung der beiden Lichtquellen, steuert selbiges myDAQ mit jeweils einer separaten Freigabe-IO diese Peripherie an.

Erfassung der Photonenemissionen (Detector)

Das „Detector.vi“ ist ein vom Hersteller bereitgestelltes Programmelement, welches zusammen mit dem PMT, dem dazugehörigem Kühlaggregat sowie dem Hochspannungsnetzteil und den passenden signalverarbeitenden Komponenten (Verstärker, Zählereinheit kombiniert mit Diskriminator, TTL-Konverter) geliefert und in die Gesamtlösung bereits integriert wurde. [6] Dieses Gesamtpaket (inklusive obiger Peripherie) ist so konzipiert, dass ausschließlich das Zählen der Lichtpulse während eines vom Benutzer vorgegeben Zeitfensters mit einer entsprechenden Abtastrate möglich ist (ms, s, min, h). Die Systemlogik besteht aus einer normalen „State Machine“, die eine grafische Darstellung erstellt und mittels globaler Variable diese an das „Main.vi“ überträgt. Die Datenerfassung startet sofort, nachdem Temperatur und Zielpfad (Speicherverzeichnis der generierten Daten) festgelegt wurden und läuft bis zum Abschalten des „Measurement.vi“. Bei der Aktivierung des „Global Stop“ werden auch alle aktiven Sub-VIs deaktiviert.

Da die Datenflussstruktur von LabVIEW eine sehr einfache Umsetzung derlei parallel laufender Schleifen ermöglicht, arbeiten das „Detector.vi“ und die verschiedenen Kontroll-VIs gleichzeitig. Dies war mit ein Grund dafür, LabVIEW als Entwicklungsumgebung zu nutzen.

Zusammenfassung

Ähnliche Grafen wie in Bild 2 gezeigt lassen sich bereits mit diesem System routinemäßig generieren. Derzeit befindet sich das System im Prototyp-Status und erste Testmessungen mit biologischen Proben sind bereits erfolgreich durchgeführt worden.

Literatur

- [1] A. G. Gurwitsch, L. D. Gurwitsch: 1943. Twenty Years of Mitogenetic Radiation: Emergence, Development, and Perspectives. *Uspekhi Sovremennoi Biologii* 16. S. 305–334. (English translation: *21st Century Science & Technology*. 1999, Vol. 12 (3): S. 41–53)
- [2] M. Cifra, P. Posposil: Ultra-Weak Photon Emission from Biological Samples: Definition, Mechanisms, Properties, Detection and Applications. In: *J Photochem Photobiol B*. Vol. 139. 2014. S. 2–10
- [3] M. Bischof, E. DelGiudice: Communication and Emergence of Collective Behavior in Living Organisms: A Quantum Approach. In: *Mol. Biol. Int.* 2013
- [4] P. Madl, P. Kolarž, E. Del Giudice, A. Tedeschi, A. Hartl, M. Gaisberger, W. Hofmann: Formation of Coherence Domains for Aerosolized Water Molecules at Alpine Waterfalls – Part 1. Sixth Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water, Vermont (USA), 2011. <http://biophysics.sbg.ac.at/poster/wc-madl-2011-a.pdf> (Zugriff: Juni'16)
- [5] P. Madl: Detection and Measurement of Biogenic Ultra-Weak Photon Emission. In: D. Fels, M. Cifra, F. Scholkmann (Hrsg): *Fields of the Cell*. 2015. S. 55–69
- [6] System Configuration According to Electron Tubes Inc.: PC-Software for Photon Counting with CT2 Counter Timer, Supplemented with the Corresponding LabVIEW-Driver. Uxbridge, England: ET-Enterprises Ltd