

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/064990 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N (74) **Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR**,  
Gostritzer Strasse 61-63, 01217 Dresden (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00219 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
24. Januar 2003 (24.01.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 04 531.3 1. Februar 2002 (01.02.2002) DE (84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): INSTITUT FÜR CHEMO- UND BIOSENSORIK  
MÜNSTER E.V.** [DE/DE]; Mendelstrasse 7, 48149 Mün-  
ster (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): KATERKAMP, An-  
dreas** [DE/DE]; Wilhelmstrasse 65, 48149 Münster (DE).  
**BRINKMANN, Uwe** [DE/DE]; Am Eschbach 1, 48366  
Laer (DE). **GRAWE, Frank** [DE/DE]; Laurenzstrasse 75,  
48607 Ochtrup (DE). **KEY, Göran** [DE/DE]; Jeggen-  
weg 160, 49084 Osnabrück (DE). **SCHREIBER, Sabine**  
[DE/DE]; Gartenstrasse 42, 59387 Ascheberg (DE). **UCK-  
ELMANN, Jochen** [DE/DE]; Geiststrasse 9, 48151 Mün-  
ster (DE).
- Erklärung gemäß Regel 4.17:**  
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*
- Veröffentlicht:**  
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** LID ELEMENT

(54) **Bezeichnung:** DECKELELEMENT

(57) **Abstract:** The invention relates to a lid element that is placed on cell culture vessels in which cells are stored in a liquid medium. The aim of the invention is to provide a lid element which allows to determine the metabolic activities of cells contained in the cell culture vessels by optical measuring methods, and which is easy to handle. According to the invention, the lid element which is placed on the cell culture vessels is provided with light-carrying elements that project into the interior of cavities of the cell vessel when the lid element is placed on the vessel. At least one optically sensitive layer is configured on a front face and/or on the outer periphery of the light-carrying elements that are preferably configured as rod-shaped optical waveguides and allows detection of changing chemical substance concentrations in the cavities.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Deckelelement, das auf Zellkulturgefäße, in denen in einem flüssigen Medium enthaltene Zellen aufgenommen sind. Das erfindungsgemäße Deckelelement soll eine Bestimmung von Stoffwechselaktivitäten von in den Zellkulturgefäßen enthaltenen Zellen, mit optischen Messmethoden ermöglichen, wobei durch einfache Handhabung beim Laborpersonal erreicht werden kann. Am auf die Zellkulturgefäße aufsetzbaren Deckelelement sind lichtführende Elemente vorhanden, die in aufgesetzter Stellung des Deckelelementes in das Innere von Kavitäten des Zellgefäßes hineinragen. Auf einer Stirnfläche und/oder auf der äusseren Mantelfläche der lichtführenden Elemente, die bevorzugt als stabförmige Lichtwellenleiter ausgebildet sind, ist mindestens eine optisch sensitive Schicht, zur Detektion von innerhalb der Kavitäten sich verändernden chemischen Stoffkonzentrationen, ausgebildet.



WO 03/064990 A2

Deckelelement

Die Erfindung betrifft ein Deckelelement, das auf  
Zellkulturgefäße, wie z.B. Petrischalen und bevorzugt  
5 Mikrotiterplatten sowie eine Vorrichtung und ein Ver-  
fahren unter Verwendung eines solchen Deckelelementes  
zur Detektion der Stoffwechselaktivität von in flüs-  
sigen Medien enthaltenen Zellen. Die Erfindung kann  
vorteilhaft z.B. für Untersuchungen von Wirkungen un-  
terschiedlicher Umwelt- und (bio-)chemischer Stoffe-  
10 einflüsse auf die Vitalität von Zellen eingesetzt wer-  
den. Es besteht auch die Möglichkeit, Untersuchungen  
für die Verbesserung von Kultivierungsbedingungen für  
die Zellen vorzunehmen, um beispielsweise die Bil-  
15 dungsrates von durch Zellen gebildeter Biomoleküle,  
wie verschiedene Proteine, zu erhöhen.

Unter dem Begriff Zellen sollen z.B. Mikroorganismen,  
Zellen von Pilzen sowie menschliche, tierische oder  
20 pflanzliche Zellen wie z.B. Zelllinien-Zellen wie HL-

60 (human, Promyeloblast), U-937 (human, Lymphom),  
MCF-7 (human, Mamakarzinom), CACO-2 (human, Colonkar-  
zinom, J774A.1 (murin, Makrophage), 3T3 (murin, Fi-  
broblast), BHK-12 (Hamster, Niere), aber auch primäre  
5 Zellen, wie sie z.B. aus Biopsien oder Blut gewonnen  
werden können, verstanden werden.

Aus DE 199 03 506 A1 ist eine entsprechende Lösung  
bekannt, bei der in speziell ausgebildeten Gefäßen,  
10 die sich verändernde Sauerstoffkonzentration inner-  
halb eines flüssigen Mediums, in dem Zellen enthalten  
sind, gemessen wird und diese Veränderung als Maß für  
die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen be-  
nutzt wird.

15 Die dort beschriebenen Gefäße sind in einer speziel-  
len Form ausgebildet und die zu verwendende Sensor-  
membran ist innerhalb der Gefäße zur Vermeidung von  
Messfehlern definiert angeordnet. Nachteilig ist eine  
20 Anordnung der Sensormembran auf dem Boden der Zell-  
kulturgefäße auf dem sich auch die Zellen befinden.  
Insbesondere werden dadurch die Kultivierungsbedin-  
gungen für die Zellen verschlechtert.

25 Daneben ist in US 5,567,598 eine Vorrichtung für den  
Nachweis von Mikroorganismen in flüssigen Proben bzw.  
zur Überwachung von Wirkungen bestimmter auf solche  
Mikroorganismen Einfluss nehmenden chemischer Stoffe  
bekannt. Gemäß der dort vermittelten Lehre sollen unter  
30 anderem Sensormembranen an den Enden von dort mit  
„Prongs“ bezeichneten keilförmigen Elementen angeord-  
net werden. Diese keilförmigen Elemente sind an einem  
Rahmenelement befestigt und werden mit dieser Sensor-  
membran in eine Probenflüssigkeit, die in einem Re-  
35 servoir enthalten ist, eingetaucht. Diese keilförmigen  
Elemente sind in ihrem Inneren jedoch teilweise

hohl ausgebildet und lediglich an der Stirnseite, an der die Sensormembran angeordnet ist, verschlossen gehalten. Die in US 5,567,598 beschriebene Vorrichtung zur Messsignalerfassung von der Sensormembran ist sehr Messfehler anfällig, da durch das flüssige Medium hindurch gemessen wird, und liefert keine quantitative Messsignale, damit ist diese Anordnung für eine automatisierte Routineanwendung nicht geeignet.

In EP 0 425 587 ist für den gleichen Anwendungsbereich der Einsatz sogenannten „Optoden“ bezeichnet. In einem Beispiel, der dort beschriebenen Lösung, soll eine solche Optode an der Spitze einer in einen Behälter einführbaren Sonde befestigt werden, wobei innerhalb einer solchen Sonde Lichtleiter für eine Anregungs- und Detektionseinrichtung aufgenommen sind. Bemerkenswert ist es aber, dass diese Lösung ausschließlich in geschlossenen Systemen, die vollständig gegenüber der Umwelt abgeschlossen sind und demzufolge auch ein Stoffaustausch zwischen System und Umwelt ausgeschlossen ist, eingesetzt werden soll.

Ausgehend hiervon, ist es daher Aufgabe der Erfindung, eine kostengünstige, in vielfältiger Form einsetzbare Lösung zu schaffen, mit der über eine optisch sensitive Schicht und optischer Messung die Stoffwechselaktivität von kultivierten Zellen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Einflusskriterien, mit hoher Akzeptanz durch Laborpersonal bewertet werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit einem Deckelement, das die Merkmale des Anspruchs 1 aufweist, sowie mit einer Vorrichtung und einem Verfahren, bei

denen solche Deckelelemente Verwendung finden, gemäß dem Anspruch 14 für eine Vorrichtung und dem Anspruch 21 für ein Verfahren gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungsformen und Weiterbildungen der Erfindung können mit den in den untergeordneten Ansprüchen bezeichneten Merkmalen erreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Deckelelemente können in angepasster Form auf die verschiedensten an sich bekannten Zellkulturgefäße unmittelbar aufgesetzt werden und mit Hilfe dieser Deckelelemente eine optische Erfassung und davon abgeleitet die Stoffwechselaktivitäten von in einem flüssigen Medium, wie beispielsweise einer Nährlösung, enthaltenen Zellen bestimmt werden. Die Anpassung der Geometrie und Dimensionierung der Deckelelemente kann relativ einfach erfolgen und bezüglich der üblicherweise in Labors eingesetzten Zellkulturgefäße ausgebildet sein. So kann ein solches Deckelelement bevorzugt für die sogenannten Mikrotiterplatten unter Berücksichtigung der jeweiligen Anzahl und Anordnungen der einzelnen Kavitäten (Wells) ausgebildet sein.

Am erfindungsgemäßen Deckelelement ist mindestens ein lichtführendes Element vorhanden, das vorzugsweise als stabförmiger Lichtwellenleiter ausgebildet ist. Diese lichtführenden Elemente ragen in aufgesetzter Position des Deckelelementes auf das jeweilige Zellkulturgefäß, in jeweils eine Kavität hinein.

An den lichtführenden Elementen sind jeweils mindestens eine optisch sensitive Schicht ausgebildet. Eine solche optisch sensitive Schicht kann an der Stirnfläche, die an das Innere der jeweiligen Kavität hineinragt, in/oder auf einer äußeren Mantelfläche ausgebildet sein.

Selbstverständlich besteht auch die Möglichkeit, auf einem solchen lichtführenden Element zwei und mehr unterschiedliche optisch sensitive Schichten auszubilden.

Eine solche optisch sensitive Schicht verändert seine optischen Eigenschaften in Abhängigkeit der zu detektierenden, vom Stoffwechsel der Zellen veränderten, (bio-)chemischen Stoffkonzentration, in der Kavität des Zellkulturgefäßes.

So können sich die optischen Eigenschaften solcher optisch sensitiver Schichten bezüglich ihrer Lumineszenz, Lichttransmission oder Lichtstreuung verändern.

Beispielsweise ist es bekannt, dass eine Lumineszenzanregung mit geeignetem Licht in einer solchen Schicht erfolgt und eine stoffkonzentrationsabhängige Veränderung des angeregten Lumineszenzlichtes auftritt und diese Veränderung des Lumineszenzlichtes als Maß für die jeweilige Stoffkonzentration genutzt werden kann.

Zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration sind beispielsweise Ruthenium-Komplexe bekannt (Otto S. Wolfbeis (ed.), Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors, Vol, II, CRC Press 1991), die in eine für Sauerstoff permeable polymere Matrix eingebettet sind. Diese Ruthenium-Komplexe haben die Eigenschaft, dass sich die Lumineszenzintensität in Abhängigkeit der jeweiligen Sauerstoffkonzentration bzw. des Sauerstoffpartialdruckes verändert. Dadurch kann die Intensität des Lumineszenzlichtes oder das zeitliche Abklingverhalten des Lumineszenzlichts, nach Abschaltung einer entsprechend zur Lumineszenzanregung ge-

eigneten Lichtquelle genutzt werden.

Da aber insbesondere die zur Lumineszenz-anregung geeigneten Stoffe, die in einer solchen polymeren Matrix eingebettet sind, einer gewissen Alterung unterworfen sind und die Erfassung der Lumineszenzintensität durch Störlicht verfälscht werden kann, ist es besonders vorteilhaft, die sich sauerstoffkonzentrationsabhängig verändernde Abklingzeit der Lumineszenz durch eine Phasenverschiebung zwischen dem sinusförmigen Anregungslicht und dem Fluoreszenzlicht zu messen.

Eine bei einem erfindungsgemäßen Deckelelement einsetzbare optisch sensitive Schicht kann beispielsweise so ausgebildet sein, wie sie in DE 198 31 770 A1 beschrieben ist.

Die optisch sensitiven Schichten können aber auch in anderer Form ausgebildet sein, ohne dass Lumineszenzerscheinungen auftreten und berücksichtigt werden können.

So kann beispielsweise eine optisch sensitive Schicht aus einem Stoff gebildet sein bzw. einen solchen Stoff enthalten, der in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffkonzentration seine Lichttransmissionseigenschaften, beispielsweise durch einen entsprechenden sukzessiven Farbumschlag, verändert. Dementsprechend wird von einer solchen optisch sensitiven Schicht entsprechend mehr oder weniger Licht absorbiert, so dass die Intensität des durch eine solche sensitive Schicht gelangenden und auf einen optischen Detektor auftreffenden transmittierten Lichtes ebenfalls ein geeignetes Maß ist. Zu nennen wäre hier als Beispiel optische Sensormembranen, wie sie zur Bestimmung der

Kohlendioxidkonzentration oder des pH-Wertes aus Otto S. Wolfbeiss (ed.), Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors, Vol. II, CRC Press 1991, bekannt sind.

5 In einer weiteren Alternative kann aber auch die mit einer solchen optisch sensitiven Schicht auftretende Lichtstreuung, die sich ebenfalls in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffkonzentration ändert, genutzt werden.

10 In diesem Fall sind in einer solchen optisch sensitiven Schicht lichtstreuende Partikel enthalten, wobei diese Partikel in einem polymeren Material eingebettet sein können. Dieses Material wird von der jeweiligen Stoffkonzentration beeinflusst und es erfolgt  
15 eine Verschiebung bzw. Ausrichtung der lichtstreuenden bzw. reflektierenden Partikel innerhalb der Schicht, so dass auch hier der Anteil des durch diese Schicht transmittierten Lichtes in Richtung eines optischen Detektors sich entsprechend der Stoffkonzentration verändert. Das Schichtmaterial, in dem solche  
20 Partikel eingebettet sind, kann beispielsweise gel-förmig oder eine Flüssigkristallform sein.

Neben den reinen Lumineszenz-, Lichttransmissions-  
25 und Lichtstreuungsmessungen sind auch Kombinationen von mindestens zwei Messarten möglich. Sinnvolle Kombinationen wären z.B. eine Lumineszenzmessung und eine Lichtstreuungsmessung oder eine Lichttransmissionsmessung und eine Lichtstreuungsmessung.

30 Das erfindungsgemäße Deckelelement kann vorteilhaft eine Oberfläche aufweisen, die im Bereich von stabförmigen Lichtwellenleitern, als lichtführende Elemente, eine Struktur bildet. Eine solche Struktur ist  
35 demzufolge auf der solchen stabförmigen Lichtwellenleitern gegenüberliegenden Seite des Deckelelementes

ausgebildet.

5 So kann beispielsweise eine solche Struktur in Form konvexer Erhebungen oder konkaver Vertiefungen ausgebildet sein, um die Lichtführung vorteilhaft beeinflussen zu können.

10 So können konvexe Erhebungen plankonvexe optische Linsen oder konkave Vertiefungen konkave Linsen bilden, die das in die stabförmige Lichtwellenleiter einzukoppelnde Licht gezielt formen. Die plankonvexen Linsen können aber auch an dieser Seite des Deckelementes austretendes Licht gezielt geformt auf einen optischen Detektor richten oder zur Einkopplung in  
15 eine Lichtleitfaser fokussieren.

20 Möglich sind auch Vertiefungen die trichterförmig ausgebildet sein können, wobei das Licht durch den jeweils ausgebildeten Trichter in die jeweiligen stabförmigen Lichtwellenleiter eingekoppelt wird. In diesem Fall ist es vorteilhaft, innerhalb des trichterförmigen Bereiches eine planare Fläche zur Ein- und/oder Auskopplung von Licht in den bzw. aus dem jeweiligen stabförmigen Lichtwellenleiter auszubilden.  
25

30 Des weiteren besteht die Möglichkeit, allein oder zusätzlich zu den beschriebenen Strukturen auf der Oberfläche eines erfindungsgemäßen Deckelementes auch die am Deckelement vorhandenen Lichtwellenleiter gezielt geometrisch zu gestalten, um die Lichtführung innerhalb der Lichtwellenleiter positiv beeinflussen zu können. Dabei können die Lichtwellenleiter, ausgehend von oben nach unten einen in Trichter-, Kegelstumpf- oder Pyramidenstumpfform ausgebildeten Bereich aufweisen, der dann in einen stabförmigen  
35

gen Bereich übergeht, dadurch lassen sich günstigere Lichtführungsverhältnisse innerhalb der Lichtwellenleiter für die Einkopplung und/oder Auskopplung von Licht erreichen.

5

Die gänzlich in Stabform oder lediglich einen stabförmigen Bereich aufweisenden Lichtwellenleiter, können zumindest in den stabförmig ausgebildeten Teilen einen kreisförmigen, ovalen, drei- oder mehreckigen Querschnitt aufweisen.

10

So kann beispielsweise die Ausbildung von mehreren optisch sensitiven Schichten auf einem stabförmigen Lichtwellenleiter mit drei- oder mehreckigem Querschnitt auf den entsprechend planaren Mantelflächenbereichen relativ einfach erfolgen und eine deutliche Trennung solcher dann bevorzugt unterschiedlicher optisch sensitiver Schichten erreicht werden.

15

20.

Insbesondere für Untersuchungen über längere Zeiträume ist es günstig, an einem erfindungsgemäßen Deckelement Abstandshalter oder Öffnungen vorzusehen. Mit diesen Elementen wird ein hermetischer Abschluss zwischen dem flüssigen Medium und der Umwelt vermieden, so dass ein Stoffaustausch zwischen Umwelt und dem flüssigen Medium erfolgen kann. Dies ist insbesondere für den aeroben Stoffwechsel Zellen von Bedeutung, da z.B. der notwendige Sauerstoff somit aus der Umgebung in das flüssige Medium eindringen und durch Diffusion zu den sauerstoffverbrauchenden Zellen gelangen kann.

25

30

Solche Abstandshalter können beispielsweise an der Unterseite, also an der Seite, an der die stabförmigen Lichtwellenleiter ausgebildet oder vorhanden sind, ausgebildete Erhebungen sein.

35

Abstandshalter können aber auch an die jeweils verwendeten Zellkulturgefäße in üblicher Form und Größe angepasste Rahmenelemente sein, die zwischen Zellkulturgefäß und Deckelelement aufgesetzt werden können.

5 Mit in dieser Form ausgebildeten rahmenförmigen Abstandshaltern kann außerdem ein zweiter Effekt erreicht werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, eine gezielt veränderbare Anordnung der optisch sensitiven Schichten innerhalb der Kavitäten eines solchen Zellkulturgefäßes vorzunehmen. So können beispielsweise  
10 die eine oder auch mehrere optisch sensitiven Schichten mehr oder weniger tief in das jeweilige flüssige Medium eingetaucht werden oder gar erreicht werden, dass die eine oder mehrere optische sensitive  
15 Schicht(en) oberhalb des flüssigen Mediums angeordnet ist und dort die jeweilige Messung der Stoffkonzentration im Gasraum über der Flüssigkeit durchgeführt werden kann.

20 Bei Deckelelementen, in denen für einen Gasaustausch mit der Umgebung Öffnungen ausgebildet sind, sind diese Öffnungen günstigerweise mit gaspermeablen Membranen verschlossen, so dass beispielsweise die unerwünschte Einschleppung von fremden Zellen wie z.B.  
25 Mikroorganismen vermieden werden kann.

Die Ausbildung von reflektierenden oder absorbierenden Schichten auf der Oberfläche eines erfindungsgemäßen Deckelelementes kann Fremd- und Streulichteinflüsse bzw. die Beeinflussung aus benachbarten Kavitäten unterdrücken bzw. zumindest behindern. In diesem Fall ist eine solche reflektierende oder absorbierende Schicht nicht vollflächig auf der Oberfläche eines erfindungsgemäßen Deckelelementes ausgebildet,  
30 sondern die Bereiche für die Ein- und/oder Auskopp-  
35 lung von Licht in oder aus den lichtführenden Elemen-

ten sind selbstverständlich von einer solchen Beschichtung freigehalten.

Das erfindungsgemäße Deckelelement, wie es in unterschiedlichen Ausführungsformen vorab beschrieben worden ist, kann in einer Vorrichtung zur Bestimmung der optischen Eigenschaften der sensitiven Schichten an den lichtführenden Elementen, die durch den Stoffwechsel der zu kultivierenden Zellen beeinflusst werden, eingebracht werden. Dabei wird Licht mindestens einer Lichtquelle durch am Deckelelement vorhandene lichtführende Elemente, wie stabförmige Lichtwellenleiter auf oder durch dort ausgebildete optisch sensitive Schichten gerichtet und das von der einen oder auch mehreren optisch sensitiven Schicht(en) beeinflusste Licht wird mit mindestens einem optischen Detektor gemessen, wobei die Messung, wie bereits vorab beschrieben, in unterschiedlicher Form erfolgen kann, wie z.B. Lumineszenzlichtmessung, Lichttransmissionsmessung oder Lichtstreuungsmessung oder auch eine Kombination von mindestens zwei dieser Messungen.

Für eine solche Vorrichtung können an sich bekannte Lumineszenzmessgeräte wie z.B. Fluoreszenzscanner/-reader und photometrisch messende Geräte wie z.B. ELISA Plattenreader eingesetzt werden, wenn auf den stabförmigen Lichtwellenleitern, als lichtführende Elemente eine entsprechende optisch sensitive Schicht ausgebildet ist.

Die Lichtführung von einer Lichtquelle auf bzw. durch solche optisch sensitiven Schichten an den stabförmigen Lichtwellenleitern kann aber auch mittels Lichtleitfasern erfolgen. Diese Lichtleitfasern oder weitere zusätzliche Lichtleitfasern können auch das jeweils zu messende Licht auf mindestens einen opti-

schen Detektor richten. Werden mehrere einzelne Zellkulturgefäße oder Zellkulturgefäße mit einer Mehrzahl von Kavitäten eingesetzt, ist es vorteilhaft, die Vorrichtung so auszubilden, dass eine Relativbewegung zwischen dem Deckelelement auf dem Zellkulturgefäß, der Lichtquelle bzw. den Stirnflächen von Lichtleitfasern, die für die Lichtkopplung in und/oder aus den stabförmigen Lichtwellenleiter am Deckelelement genutzt werden, möglich ist. Dadurch kann eine gezielte Positionierung in Bezug zur optisch sensitiven Schicht am jeweiligen lichtführenden Element in der Kavität des Zellkulturgefäßes erreicht werden, so dass die Messungen in den einzelnen Kavitäten sequentiell durchgeführt werden können. Selbstverständlich besteht auch die Möglichkeit, eine entsprechende Relativbewegung in Bezug zu mindestens einer Lichtquelle, einer Lichtleitfaser und/oder einem optischen Detektor vorzunehmen.

Bei einer solchen Vorrichtung ist es vorteilhaft, für die Beleuchtung der optisch sensitiven Schichten die eine bzw. mehrere Lichtquelle(n) oder die Stirnfläche einer Lichtleitfaser, aus der das auf solche optisch sensitiven Schichten gerichtete Licht ausgekoppelt wird, oberhalb des Deckelelementes und demzufolge auch der Öffnungen der Kavitäten, die im Zellkulturgefäß ausgebildet sind, anzuordnen. Insbesondere dann, wenn eine Lumineszenzanregung in den optisch sensitiven Schichten erfolgt, sollte auch der mindestens eine optische Detektor oberhalb des Deckelelementes angeordnet oder zumindest die Stirnfläche einer Lichtleitfaser, in die das Lumineszenzlicht eingekoppelt und durch die das Lumineszenzlicht auf den optischen Detektor gerichtet wird, entsprechend dort angeordnet sein.

Insbesondere für den Fall, dass die Intensität von durch eine optisch sensitive Schicht gerichtetem Licht zur Bewertung der Stoffwechselaktivität der zu kultivierenden Zellen gemessen werden soll, ist es jedoch günstiger, einen optischen Detektor unterhalb des Zellkulturgefäßes oder eine entsprechende Stirnfläche einer Lichtleitfaser, in die dieses Licht eingekoppelt und durch die das Licht auf einen optischen Detektor gerichtet wird, dort entsprechend anzuordnen.

Vorteilhaft ist es außerdem, eine Vergleichsmessung in einer Kavität durchzuführen, in der sich zwar ein entsprechend gleiches flüssiges Medium wie in anderen Kavitäten befindet, jedoch keinerlei stoffwechselaktiven Zellen oder zusätzliche Stoffe enthalten sind, diese Kavität demzufolge als Normal anzusehen ist.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung können neben der bereits mehrfach erwähnten Sauerstoffkonzentration auch die  $\text{CO}_2$ -,  $\text{H}_2$ -,  $\text{H}^+$ -,  $\text{H}_2\text{S}$ -,  $\text{NH}_4^+$  - Konzentration und/oder der pH-Wert bestimmt werden.

Des weiteren besteht die Möglichkeit die Konzentration und/oder die Veränderung der Konzentration von Enzym Substraten, die durch den Stoffwechsel der Zellen erzeugt worden sind, zu bestimmen. Hierbei können Enzym Sensoren für optisch sensitive Schichten eingesetzt werden. Es können aber auch Glucose und/oder Lactat mit solchen Enzym Sensoren detektiert werden.

Nachfolgend soll die Erfindung beispielhaft erläutert werden.

Dabei zeigen:



- Figur 9 in schematischer Form die Lichtführung von in einer optisch sensitiven Schicht angeregtem Lumineszenzlicht aus einem stabförmigen Lichtwellenleiter, das in eine Lichtleitfaser eingekoppelt und durch diese Lichtleitfaser auf einen nicht dargestellten optischen Detektor gerichtet werden kann;
- Figur 10 in schematischer Form einen optischen Aufbau zur Beleuchtung optisch sensitiver Schichten und Erfassung von durch diese beeinflusstem Licht, in einem Beispiel mit Lichtleitfaser;
- Figur 11 ein weiteres Beispiel eines entsprechend geeigneten optischen Aufbaus;
- Figur 12 in schematischer Form eine Möglichkeit zur Anordnung von Lichtleitfasern über die das Licht einer nicht dargestellten Lichtquelle auf eine optisch sensitive Schicht und aus dieser Schicht austretendes Lumineszenzlicht durch den Boden einer Kavität auf einen nicht dargestellten Detektor gerichtet wird;
- Figur 13 in schematischer Form eine Möglichkeit zur Anordnung von Lichtleitfasern über die das Licht einer nicht dargestellten Lichtquelle auf eine optisch sensitive Schicht und durch dieser Schicht sowie den Boden einer Kavität hindurch auf einen nicht dargestellten Detektor gerichtet wird;
- Figur 14(a) ein Beispiel eines optischen Aufbaus,

wie er für eine Beleuchtung einer optisch sensitiven Schicht und

5           Figur 14(b)       ein Beispiel für einen optischen Aufbau für die Detektoren des Lichtes von einer optisch sensitiven Schicht, wie sie gemeinsam bei den in den Figuren 12 und 13 gezeigten Beispielen eingesetzt werden können;

10

Figur 15   in schematischer Form ein Beispiel einer Vorrichtung, bei der gleichzeitig und ortsaufgelöst eine Messung in mehreren Kavitäten eines Zellkulturgefäßes durchführbar ist;

15

Figur 16   ein Beispiel einer Vorrichtung mit zusätzlichen optischen Elementen;

20

Figur 17   ein Beispiel mit Lichtleitfasern, als lichtführende Elemente;

25

Figur 18   ein Diagramm von Messsignalverläufen, die in fünf Kavitäten eines Zellkulturgefäßes in unkorrigierter Form gemessen worden sind und

30

Figur 19   ein Diagramm der normierten Messsignalverläufe gemäß Figur 18.

35

In Figur 1 ist in schematischer Form ein Beispiel eines erfindungsgemäßen Deckelelementes 6, wie es auf ein Zellkulturgefäß 5, mit einer Mehrzahl von Kavitäten aufgesetzt ist, dargestellt.

Dabei ist an dem erfindungsgemäßen Deckelelement 6 für jeweils eine Kavität 8 ein stabförmiger Lichtwellenleiter 1 vorhanden, wobei bei diesem Beispiel das gesamte Deckelelement 6 inklusive der stabförmigen Lichtwellenleiter 1 aus einem optisch transparenten Material hergestellt worden sind. Ein solches Deckelelement kann beispielsweise im Spritzgußverfahren aus einem geeigneten für Licht transparenten polymeren Kunststoffmaterial, wie z.B. PMMA hergestellt werden.

In den Kavitäten 8 des Zellkulturgefäßes 5 sind ein flüssiges Medium sowie in diesem Medium Zellen enthalten, was mit der Wellenlinie in den Kavitäten 8 angedeutet ist.

An den unteren Stirnflächen 2 der stabförmigen Lichtwellenleiter 1 sind bei diesem Beispiel eines erfindungsgemäßen Deckelelementes 6, jeweils eine optisch sensitive Schicht 4 ausgebildet. Solche optisch sensitiven Schichten 4 können aber auch allein oder zusätzlich auf der äußeren Mantelfläche 3 der stabförmigen Lichtwellenleiter 1 ausgebildet sein.

Figur 2 zeigt das Beispiel nach Figur 1 in einer geschnittenen Draufsicht entlang der Linie A - A aus Figur 1. Hier wird deutlich, dass die stabförmigen Lichtwellenleiter 1 am Deckelelement 6 jeweils mittig in Bezug zu den einzelnen Kavitäten 8 angeordnet sind.

In Figur 3 ist ein, gegenüber dem in Figur 1 gezeigten Beispiel, modifiziertes Deckelelement 6 dargestellt. Dieses Deckelelement 6 weist an seiner Oberfläche eine Struktur in Form von plankonvexen Linsen 9, die in Bezug zu jeweils einem stabförmigen Lichtwellenleiter 1 angeordnet und ausgebildet sind, auf.

Auch hier ist dieses Deckelelement 6 als ein Teil und demzufolge auch die plankonvexen Linsen 9 als ein integraler Bestandteil des Deckelelementes 6 ausgebildet.

5

Das in Figur 4 gezeigte Beispiel eines erfindungsgemäßen Deckelelementes 6 weist Lichtwellenleiter 1 auf, die einen trichterförmigen Bereich 10 aufweisen, der in einen stabförmigen Bereich 1' übergeht.

10

Bei dem mit Figur 5 dargestellten Beispiel eines erfindungsgemäßen Deckelelementes 6, weist dieses eine Struktur auf, bei der in Bezug zu den einzelnen Kavitäten 8 und den stabförmigen Lichtwellenleitern 1 konkave Vertiefungen 11 ausgebildet sind. Innerhalb dieser konkaven Vertiefungen 11 sind vis-a-vis zu den Stirnflächen 2, auf denen auch bei diesem Beispiel optisch sensitive Schichten 4 ausgebildet sind, plane Flächen für eine Lichtein- und/oder -auskopplung aus bzw. in die stabförmigen Lichtwellenleiter 1 ausgebildet.

15

20

Bei dem in Figur 6 gezeigten erfindungsgemäßen Deckelelement 6 sind die stabförmigen Lichtwellenleiter 1 gegenüber den bei den vorherigen Beispielen beschriebenen und gezeigten stabförmigen Lichtwellenleiter 1 deutlich kürzer ausgebildet, so dass die auch hier auf den nach unten weisenden Stirnflächen 2 ausgebildeten optischen sensitiven Schichten 4 oberhalb des flüssigen Mediums, innerhalb der Kavitäten 8 zur Bestimmung von sich ändernden Stoffkonzentrationen in einer gasförmigen Atmosphäre, angeordnet.

25

30

Dieser Effekt kann aber auch, wie im allgemeinen Teil der Beschreibung bereits erwähnt, durch entsprechende Abstandshalter, die an einem Deckelelement 6 ausge-

35

bildet oder zusätzlich zwischen Deckelelement 6 und Zellkulturgefäß 5 eingesetzt werden können, erreicht werden.

5 In Figur 7 ist ein Beispiel für eine mögliche Lichtführung zur Beleuchtung einer optisch sensitiven Schicht 4 in schematischer Form gezeigt. Hierbei wird Licht einer nicht dargestellten Lichtquelle über eine Lichtleitfaser 12 auf eine bikonvexe optische Linse  
10 13 gerichtet und mittels dieser optischen Linse 13 in den stabförmigen Lichtwellenleiter 1 eines in Andeutung dargestellten Deckelelementes 6 geführt.

15 Dabei sind die optische Linse 13 und die Lichtleitfaser 12 so ausgewählt und das stabförmige Element 1 so dimensioniert, dass innerhalb des stabförmigen Lichtwellenleiters 1 die Lichtführung unter Einhaltung von Totalreflexionsbedingungen auf die optisch sensitive Schicht 4 erfolgt.

20 In Figur 8 ist in weitestgehend analoger Form wiederum eine Lichtleitfaser 12 dargestellt, hier aber mit etwas größerem Durchmesser, bei der das aus einer Stirnfläche austretende Licht unmittelbar auf eine  
25 plane Oberfläche eines Deckelelementes 6 gerichtet und durch einen Lichtwellenleiter 1 mit einem trichterförmigen Bereich 10 und einem stabförmigen Bereich 1', ebenfalls unter Einhaltung von Totalreflexion an den äußeren Mantelflächen auf eine an der hier unteren Strinfläche 2 ausgebildete sensitive Schicht 4  
30 gerichtet wird.

Mit Figur 9 soll angedeutet werden, wie Lumineszenzlicht von der optisch sensitiven Schicht 4, die dann  
35 entsprechende Eigenschaften aufweist, wiederum durch den stabförmigen Lichtwellenleiter 1 unter Einhaltung

von Totalreflexionsbedingungen über die bikonvexe optische Linse 13 auf die Stirnfläche einer Lichtleitfaser 12, zur Einkopplung in die Lichtleitfaser 12 gerichtet wird. Über diese Lichtleitfaser 12 gelangt  
5 das Lumineszenzlicht auf einen nicht dargestellten optischen Detektor.

In Figur 10 ist ein optischer Aufbau, wie er im Zusammenhang mit den Beispielen gemäß den Figuren 7 bis  
10 9 eingesetzt werden kann, dargestellt.

Dabei wird Licht einer Lichtquelle 21 durch eine bikonvexe optische Linse 20, ein optisches Filter 19, das lediglich Licht im Wellenlängenbereich, das zur  
15 Lumineszenzanregung geeignet ist, durchlässt, auf einen dichroitischen Spiegel 15 und von dort über eine weitere bikonvexe optische Linse 14 und mittels dieser optischen Linse 14 auf eine Stirnfläche der Lichtleitfaser 12 gerichtet. Durch die Lichtleitfaser  
20 12 gelangt dieses Licht dann in einen stabförmigen Lichtwellenleiter 1 (hier nicht dargestellt).

Das in der nicht dargestellten optisch sensitiven Schicht angeregte Lumineszenzlicht kann dann in entgegengesetzter Richtung durch die Lichtleitfaser 12  
25 geführt und über die optische Linse 14, durch den dichroitischen Spiegel 15, das optische Filter 16, über eine weitere bikonvexe optische Linse 17 auf einen optischen Detektor 18 gerichtet werden. Dabei  
30 sperrt das optische Filter 16 Fremd- und Streulicht außerhalb des Wellenlängenbereiches des Lumineszenzlichtes.

In Figur 11 ist ein weiteres Beispiel für einen optischen Aufbau, wie er bei einer Vorrichtung mit erfindungsgemäßem Deckelelement 6 eingesetzt werden kann,  
35

dargestellt. Hierbei wird eine Lichtleitfaser 12 eingesetzt, die in zwei Teile geteilt ist. Möglich ist auch an Stelle einer Lichtleitfaser ein Lichtleitfaserbündel zu verwenden, das in zwei einzelne Bündel aufgeteilt wird. Der in Figur 11 links dargestellte Teil eines optischen Aufbaus verwendet wiederum eine Lichtquelle 29, mit der Licht durch zwei bikonvexe optische Linsen 28 und 26, zwischen denen ein optisches Filter 27 angeordnet ist, in einen Teil der Lichtleitfaser 12 eingekoppelt und über die Lichtleitfaser 12 durch einen hier nicht dargestellten stabförmigen Lichtwellenleiter 1 auf eine ebenfalls nicht dargestellte optisch sensitive Schicht 4 gerichtet wird.

Lumineszenz- und/oder Streulicht von der optisch sensitiven Schicht 4 gelangt dann, nach entsprechender Einkopplung in die Lichtleitfaser 12, über ebenfalls zwei bikonvexe optische Linsen 22 und 24, zwischen denen wiederum ein optisches Filter 23 angeordnet ist, auf einen optischen Detektor 25.

Dabei sind insbesondere die optischen Filter 27 und 23 so ausgewählt, dass das optische Filter 27 lediglich Licht im Wellenlängenbereich, das zur Anregung von Lumineszenzlicht und/oder Lichtstreuung benötigt wird, transmittiert und das optische Filter 23 lediglich für Licht im Wellenlängenbereich des jeweiligen Lumineszenz- und/oder Streulicht durchlässig ist.

Anstelle einer geteilten Lichtleitfaser 12, wie hier dargestellt, können aber auch zwei einzelne Lichtleitfasern, die über einen Y-Koppler miteinander verbunden sind, in analoger Form eingesetzt werden.

In Figur 12 ist in schematischer Form eine beispiel-

hafte Lichtführung von Lumineszenzlicht, in Verbindung mit einer optisch sensitiven Schicht 4, deren Lumineszenz in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffkonzentration innerhalb des flüssigen Mediums veränderbar ist, dargestellt.

Hierbei wird Licht einer nicht dargestellten Lichtquelle über wiederum eine Lichtleitfaser 12, eine bikonvexe optische Linse 13 in einen stabförmigen Lichtwellenleiter 1 eines erfindungsgemäßen Deckelementes 6 eingekoppelt und auf die an der Stirnfläche 2 des stabförmigen Lichtwellenleiters 1 ausgebildete optisch sensitive Schicht 4 gerichtet. Das in der optisch sensitiven Schicht erzeugte Lumineszenzlicht wird nach unten durch den Boden der Kavität 8 hindurch über die bikonvexe optische Linse 30 in eine weitere Lichtleitfaser 31 eingekoppelt und von dort auf einen optischen Detektor, hier nicht dargestellt, gerichtet.

In Figur 13 ist in schematischer Form eine beispielhafte Lichtführung, in Verbindung mit einer optisch sensitiven Schicht 4, deren Lichttransmission bzw. -absorption und/oder Lichtstreuung in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffkonzentration innerhalb des flüssigen Mediums veränderbar ist, dargestellt.

Hierbei wird Licht einer nicht dargestellten Lichtquelle über wiederum eine Lichtleitfaser 12, eine bikonvexe optische Linse 13 in einen stabförmigen Lichtwellenleiter 1 eines erfindungsgemäßen Deckelementes 6 eingekoppelt und auf die an der Stirnfläche 2 des stabförmigen Lichtwellenleiters 1 ausgebildete optisch sensitive Schicht 4 gerichtet. Dabei wird in Abhängigkeit der jeweiligen Stoffkonzentration ein gewisser Anteil an Licht durch die optisch

sensitive Schicht 4 absorbiert oder gestreut, so dass lediglich ein Teil des Lichtes durch die optisch sensitive Schicht 4 gelangen kann und über die bikonvexe optische Linse 30 in eine weitere Lichtleitfaser 31 eingekoppelt und von dort auf einen optischen Detektor, hier nicht dargestellt, gerichtet werden kann.

In den Figuren 7, 8, 9, 12, 13 und 16 sind mögliche Bewegungen für eine Positionierung der verschiedenen Elemente mit Doppelpfeilen angedeutet. Möglich ist es das Zellkulturgefäß 5 mit Deckelelement 6 zu bewegen und die optischen Komponenten 12, 13, 30 und 31 ruhen oder das Zellkulturgefäß 5 mit Deckelelement 6 ruht und die optischen Komponenten 12, 13, 30 und 31 bewegen sich synchron zu einander. Eine Kombinierte Bewegung der genannten Fälle in unterschiedlichen Achsen ist auch möglich.

In Figur 14 sind optische Aufbauten, die an die Lichtleitfaser 12 und die Lichtleitfaser 31, gemäß den Beispielen der Figuren 12 und 13 angeschlossen werden können, dargestellt.

Auch hier wird wiederum eine Lichtquelle 29', deren Licht über bikonvexe optische Linsen 28' und 26', zwischen denen wiederum ein optisches Filter 27' angeordnet ist, in die Lichtleitfaser 12 eingekoppelt und von dort auf das erfindungsgemäße Deckelelement 6 zur Beleuchtung der sensitiven Schicht 4 gerichtet. Das durch die optische sensitive Schicht 4 transmittierte Licht oder das in der optisch sensitiven Schicht 4 angeregte Lumineszenzlicht wird in die Lichtleitfaser 31 eingekoppelte und nach Auskopplung aus dieser Lichtleitfaser 31 ebenfalls über zwei bikonvexe optische Linsen 22' und 24' auf den Detektor 25' gerichtet. Dabei ist auch hier zwischen den bi-

konvexen optischen Linsen 22' und 24' ein optisches Filter 23' angeordnet.

5 In Figur 15 ist ein Beispiel für eine Möglichkeit, bei der mit einem erfindungsgemäßen Deckelelement 6, gleichzeitig Messungen in mehreren Kavitäten 8 eines Zellkulturgefäßes 5 durchgeführt werden können, dargestellt.

10 Hierbei sind mehrere Lichtleitfasern 12 oberhalb des Deckelelementes 6 angeordnet und in Bezug zu den in Kavitäten 8 hineinragende stabförmige Lichtwellenleiter 1 positioniert.

15 Das Deckelelement 6 ist hier mit trichterförmige Bereiche 10 aufweisenden Lichtwellenleitern 1, die in einen stabförmigen Bereich 1' übergehen, ausgebildet.

20 Das aus den Lichtfasern 12 austretende Licht wird durch die Lichtwellenleiter 1 und die optisch sensitiven Schichten 4, die Böden der Kavitäten 8 des Zellkulturgefäßes 5 über eine bikonvexe optische Linse 32 auf einen optischen Detektor 33 gerichtet.

25 Dabei ist die bikonvexe optische Linse 32 so ausgebildet, dass das aus den stabförmigen Lichtwellenleitern 1, durch die optisch sensitiven Schichten 4 austretende Licht, der einzelnen Kavitäten jeweils auf einen bestimmten Flächenbereich des optischen Detektors 33, der als Photoempfindliches Array ausgebildet  
30 ist, gerichtet wird, so dass eine gleichzeitige Auswertung für jede einzelne Kavität 8 erfolgen kann. Die bikonvexe Linse 32 kann auch vorteilhaft als Linsensystem ausgelegt werden um optimale optische Ab-  
35 bildungseigenschaften zu erreichen. Als Photoempfindliches Array eignen sich hier im besonderen CCD-

Arrays.

5 In Figur 16 ist ein Beispiel einer Vorrichtung, bei der ein Deckelelement 6, wie es in Figur 1 gezeigt ist, verwendet wird. Selbstverständlich können auch Deckelelemente 6, gemäß den anderen erläuterten Beispielen in ähnlicher Form eingesetzt werden.

10 Hierbei ist ein Trägerelement 34 oberhalb des Deckelelementes 6 zwischen einer Lichtleitfaser 12 bzw. einer nicht dargestellten Lichtquelle angeordnet.

15 Im Trägerelement 34 sind bei diesem Beispiel bikonvexe optische Linsen 35, als strahlformende optische Elemente in Bezug zu jeweils einem stabförmigen Lichtwellenleiter 1 fixiert gehalten, so dass aus der Lichtleitfaser 12, die durch, wie mit dem Doppelpfeil angedeutete Relativbewegung, in Bezug zu den stabförmigen Lichtwellenleitern 1 positionierbar ist, ausgekoppeltes und/oder wieder in die Lichtleitfaser 12 eingekoppeltes Licht in vorteilhafter Weise mittels der bikonvexen optischen Linsen 35 fokussierbar ist.

25 Bei diesem Beispiel besteht die Möglichkeit, dass durch eine bestimmte Anordnung des Trägerelementes 34 unterschiedliche Anordnungen und insbesondere Abstände einer Lichtquelle oder, wie hier gezeigt, der Stirnfläche der Lichtleitfaser 12 für die Ein- und/oder Auskopplung von Licht in Bezug zur Einkoppel-  
30 pelfläche am Deckelelement 6 für die einzelnen stabförmigen Lichtwellenleiter 1, berücksichtigt werden können. So kann beispielsweise das Trägerelement 34 in vertikaler Richtung, also nach oben bzw. nach unten bewegt und in einer optimalen Position fixiert  
35 werden.

In Figur 17 ist ein Beispiel eines Deckelelementes 6, in mit Lichtleitfasern 12, die innerhalb der Kavitäten 8 in lichtführende Elemente, als stabförmige Lichtwellenleiter übergehen.

5

Die Lichtleitfasern 12 können durch entsprechende Durchbrechungen im Deckelelement 6 geführt sein und in das Innere von Kavitäten 8 eines Zellkulturgefäßes 5 hineinragen. Dabei sind bei dem hier gezeigten Beispiel die in das Innere der Kavitäten hineinragenden Stirnflächen der Lichtleitfasern 12 mit einer optisch sensitiven Schicht 4 versehen.

10

Die einzelnen Lichtleitfasern 12 sollten am Deckelelement 6 so fixiert sein, dass sie mit gleicher Länge in das Innere der Kavitäten 8 hineinragen, so dass eine Messung in jeweils gleichen Abständen vom Boden, der mit gleichen Volumina des flüssigen Mediums befüllten Kavitäten 8, erfolgen kann.

15

20

Figur 18 zeigt den experimentell ermittelten Messsignalverlauf einer optischen Sauerstoffmessung in fünf Kavitäten eines Zellkulturgefäßes 5 mit 96 Kavitäten (96 Well Mikrotiterplatten). Die optisch sensitiven Schichten befinden sich wie in Figur 17 dargestellt an den Stirnflächen von Lichtleitfasern 12. Als optisch sensitive Schicht 4 wurde eine Schicht verwendet, wie sie in DE 198 31 770 A1 beschrieben ist. Gemessen wurde die Phasenverschiebung zwischen den sinusförmigen Anregungslicht und der sinusförmigen Lumineszenzlicht als Maß für die Sauerstoffkonzentration mit einem optischen Aufbau wie in Figur 10 dargestellt. Die optisch sensitive Schicht zur Sauerstoffkonzentrationsbestimmung befand sich 1,5 mm über dem Boden der Kavitäten 8. In den Kavitäten Nr. 1, 3, 4 und 5 die respektive durch die Messkanäle Nr. 1, 3,

25

30

35

4 und 5 erfasst wurden, befanden sich ca.  $2 \cdot 10^4$  Zellen der Zelllinie HL 60. Die Kavität Nr. 2 erfasst durch den Messkanal Nr. 2 war nicht mit Zellen belegt. Alle Kavitäten waren mit 250  $\mu$ l Zellkulturmedium (90% DMEM und 10 % FCS inaktiviert) gefüllt. Das Zellkulturgefäß befand sich während der Messung in einem Brutschrank bei 37 °C, 100 % relativer Feuchte und normalen Atmosphären Druck.

10 Aus den in Figur 18 gezeigten zeitlichen Messsignalverläufen wird deutlich, dass zu Beginn der Messungen eine bestimmte Einschwingphase beachtet werden muss, in der eine präzise Auswertung nicht möglich ist. Dies ist insbesondere dem erforderlichen Temperaturausgleich zwischen Brutschrank und Zellkulturmedium geschuldet, da die Kavitäten 8 mit Zellen und Zellkulturmedium bei Raumtemperatur außerhalb des Brutschranks befüllt wurden. Nach Ablauf dieses Zeitraumes, der für diese Einschwingphase erforderlich ist und der sich üblicherweise über eine Zeit von ca. 40 bis 90 min erstreckt, können die gemessenen Messsignale benutzt werden.

25 Aus den in Figur 18 gezeigten Messsignalverläufen für die insgesamt fünf Messkanäle, der jeweiligen Kavitäten 8 wird deutlich, dass jeweils nahezu zeitgleich Maximalwerte gemessen worden sind. Daraus ergibt sich, insbesondere für den Referenzkanal, hier Messkanal Nr. 2 der die Sauerstoffkonzentration in der Kavität Nr. 2 erfasst, ein sogenannter Referenzwert Brutschrank  $RWB_x$ -Wert, als Maximalsignal in mV bei einer Temperatur von 37 °C, 100% relativer Feuchte und normal Druck der die Zusammensetzung der Gasatmosphäre innerhalb eines Brutschrankes und insbesondere deren Sauerstoffkonzentration berücksichtigt. Nach Erreichen dieses Maximalwertes wird mit Figur 18 deut-

lich, dass alle Messsignale und auch das Messsignal für den Referenzkanal abfallen.

5 Infolge der in den Kavitäten Nr. 1, 3, 4 und 5 enthaltenen stoffwechselaktiven Zellen, die den Messsignalen der Messkanäle Nr. 1, 3 bis 5 entsprechen, reduzieren sich die Messwerte nach ca. 24 h Messzeit deutlich.

10 Um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu verbessern sowie Messfehler zu reduzieren, besteht in einfacher Form die Möglichkeit, eine Messsignalnormierung durchzuführen, wobei entsprechend normierte Messsignalverläufe dem Diagramm der Figur 19 entnommen werden können.

15 Für eine solche Normierung wurde der Zeitpunkt berücksichtigt, bei dem in der Kavität Nr. 2, in dem sich keine Zellen befanden, erfasst durch den Messkanal Nr. 2 in Figur 18 als Referenz bezeichnet, der Maximalwert der Einschwingphase erreicht worden ist.

25 Zu diesem Zeitpunkt wurde die jeweilige Differenz der Messwerte der einzelnen Messkanäle Nr. 1, 3 bis 5 zum  $RWB_x$ -wert für den Referenzkanal Nr. 2, als für jeden Messkanal konstanter Wert ermittelt. Unter Berücksichtigung dieses konstanten Wertes und dessen Vorzeichen wurden alle Messsignale, die über die Zeit erfasst worden sind, für den jeweiligen Messkanal

30 korrigiert, so dass alle Signalverläufe bei  $RWB_x$ -wert den gleichen Anfangspunkt haben und im Anschluß daran die zeitlich später erfassten Messsignale um diesen konstanten Wert korrigiert wurden, die Messsignalverläufe quasi entsprechend dieses konstanten Wertes unter Berücksichtigung seines Vorzeichens verschoben

35 sind.

Des weiteren wurden die Messsignalwerte der einzelnen Messkanäle Nr. 1, 3 bis 5 mittels zeitlich variabler Werte korrigiert. Dabei wurden die einzelnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Messsignalwerte der einzelnen Messkanäle Nr. 1, 3 bis 5 mit dem Wert der Differenz zwischen dem  $RWB_x$ -Wert und dem zu diesem Zeitpunkt gemessenen Messsignalwert des Referenzkanales Nr. 2 korrigiert.

10

Wie aus dem in Figur 19 gezeigten Diagramm weiter hervorgeht, ist auch eine Normierung bezüglich der tatsächlich gemessenen Sauerstoffkonzentration unter Berücksichtigung der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Gasatmosphäre im Brutschrank, in dem die Messungen durchgeführt worden sind und einer Umgebungsluftatmosphäre, bei gleicher Temperatur und Luftfeuchte durchgeführt worden.

15

## Patentansprüche

1. Deckelelement, das auf Zellkulturgefäße mit mindestens einer Kavität (8) aufsetzbar ist, wobei

5

am Deckelelement (6) lichtführende Elemente (1) vorhanden sind;

10

jeweils mindestens ein lichtführendes Element (1) in das Innere einer Kavität (8), des Zellkulturgefäßes (5) in aufgesetzter Position des Deckelelementes (6) auf das Zellkulturgefäß hineinragt; in Kavitäten (8) ein flüssiges Medium und in mindestens einer Kavität (8) auch Zellen

15

enthalten sind;  
und auf einer Stirnfläche (2) und/oder auf der äußeren Mantelfläche (3) der lichtführenden Elemente (1) jeweils mindestens eine optisch sensitive, zur Detektion sich innerhalb der Kavitäten (8) verändernder chemischer Stoffkonzentrationen geeignete Schicht (4) ausgebildet ist.

20

2. Deckelelement nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch sensitive Schicht (2) ihre optischen Eigenschaften bezüglich Lumineszenzintensität und/oder -abklingzeit, Lichttransmission oder Lichtstreuung in Abhängigkeit der jeweiligen sich ändernden chemischen Stoffkonzentration in der Kavität (8) verändert.

25

30

3. Deckelelement nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die lichtführenden Elemente (1), als stabförmige Lichtwellenleiter ausgebildet sind.

4. Deckelelement nach Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des  
Deckelelementes (6) im Bereich der lichtführen-  
den Elemente (1) eine Struktur bildet.
- 5 5. Deckelelement nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Struktur in  
Form konvexer Erhebungen (9) oder konkaver Ver-  
tiefungen ausgebildet ist.
- 10 6. Deckelelement nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass die konvexen Erhe-  
bungen (9) plankonvexe optische Linsen oder die  
konkaven Vertiefungen konkave optische Linsen  
bilden.
- 15 7. Deckelelement nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass eine in Form von  
Vertiefungen (11) ausgebildete Struktur trich-  
terförmig ausgebildet ist und innerhalb des  
trichterförmigen Bereiches eine planare Fläche  
zur Ein- und/oder Auskopplung von Licht an den  
20 lichtführenden Elementen (1) ausgebildet ist.
- 25 8. Deckelelement nach mindestens einem der vorher-  
gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass  
die lichtführenden Elemente (1) einen in Trich-  
ter-, Kegelstumpf- oder Pyramidenstumpfform aus-  
gebildeten Bereich (10), der in einen stabförmig-  
en Bereich (1') übergeht, aufweisen.
- 30 9. Deckelelement nach mindestens einem der vorher-  
gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass  
die optisch sensitive Schicht (4) aus einem zur  
Lumineszenzanregung geeigneten Stoff besteht  
oder einen solchen Stoff enthält.
10. Deckelelement nach mindestens einem der vorher-

gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die lichtführenden Elemente (1) einen kreisförmigen, ovalen, drei- oder mehreckigen Querschnitt aufweisen.

- 5            11. Deckelelement nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass am Deckelelement (6) Abstandshalter oder Öffnungen vorhanden sind.
- 10           12. Deckelelement nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Öffnungen mit gaspermeablen Membranen verschlossen sind.
- 15           13. Deckelelement nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche des Deckelelementes (6) bis auf Bereiche für die Ein- und/oder Auskopplung von Licht in die/aus den lichtführenden Element(en) (1) mit einer Licht reflektierenden oder absorbierenden Schicht versehen ist.
- 20           14. Vorrichtung mit einem Deckelelement nach einem der Ansprüche 1 bis 13, zur optischen Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen, die in Kavitäten (8) von Zellkulturgefäßen (5) in einem flüssigen Medium enthalten sind, dadurch gekennzeichnet, dass Licht mindestens einer Lichtquelle (21, 29, 29') durch am Deckelelement (6) vorhandene lichtführende Elemente (1) auf oder durch an lichtführende Elemente (1) ausgebildete optische sensitive Schichten (4) gerichtet und zur Messung von angeregtem Lumineszenzlicht in der optischen sensitiven Schicht (4) und/oder durch die optische sensitive Schicht (4) transmittiertem Licht und/oder durch die optische sensitive Schicht (4) gestreutes Licht, minde-
- 25
- 30

stens ein optischer Detektor (18, 25, 25', 33) vorhanden ist.

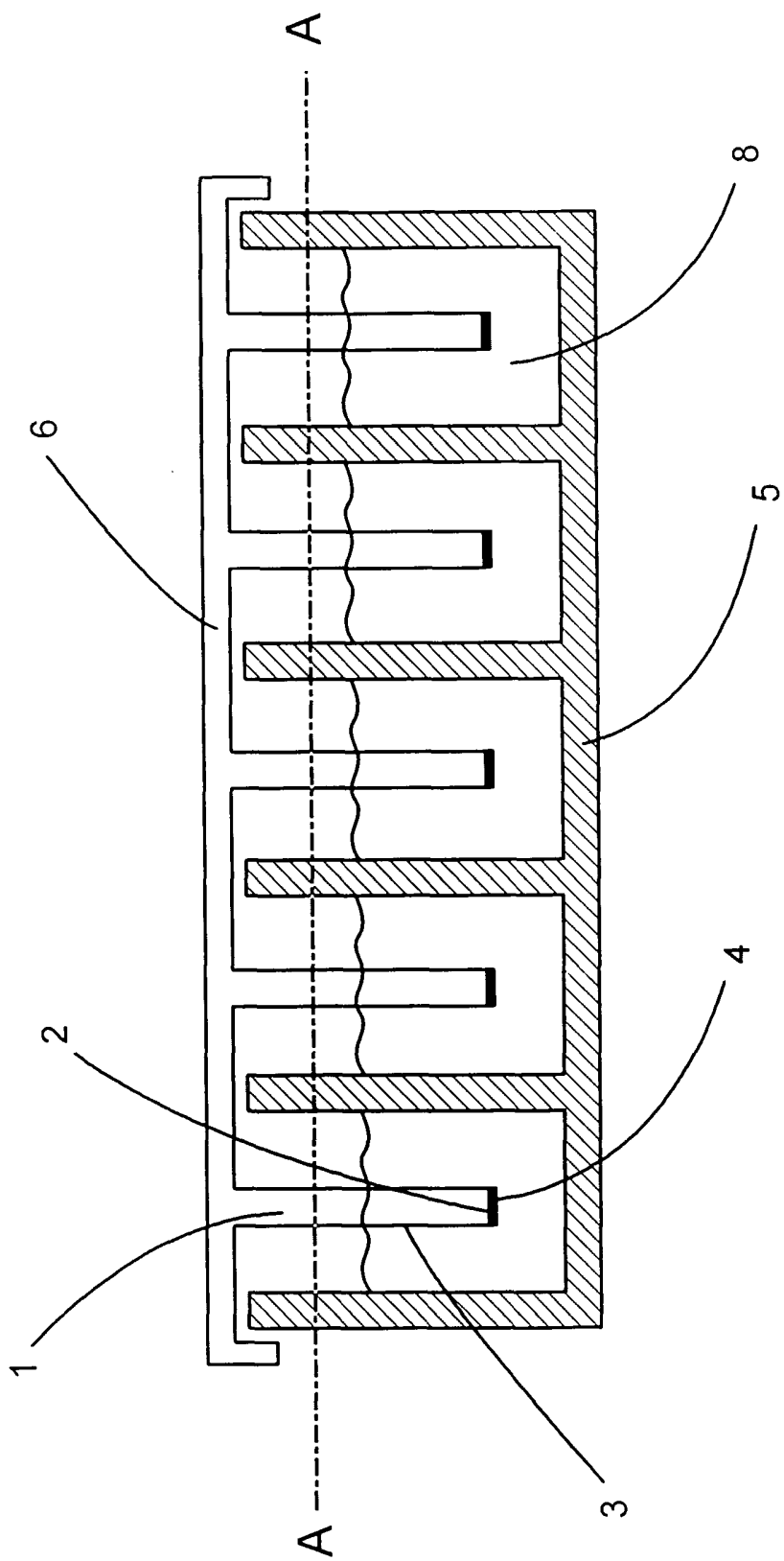
- 5 15. Vorrichtung nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtführung  
zur und/oder von der optisch sensitiven Schicht  
(4) über mindestens eine Lichtleitfaser (12, 31)  
erfolgt.
- 10 16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass Zellkulturgefäß (5)  
und Lichtquelle (21, 29, 29') oder Stirnflächen  
der Lichtleitfasern (12) für die Lichtaus-  
und/oder -einkopplung relativ zueinander beweg-  
bar und in Bezug zu einem lichtführenden Element  
(1) des Deckelelementes (6) auf dem Zellkultur-  
15 gefäß (5) positionierbar sind.
- 20 17. Vorrichtung nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich minde-  
stens ein optischer Detektor (18, 25, 25') rela-  
tiv zu lichtführenden Elementen (1) des Deckele-  
elementes (6) auf dem Zellkulturgefäß (5) beweg-  
bar und positionierbar ist.
- 25 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle  
(21, 29, 29') oder die Stirnfläche zur Lichtaus-  
kopplung von Lichtleitfasern (12) und/oder der  
mindestens eine optische Detektor (18, 25, 25')  
oberhalb vom Deckelelement (6) und Öffnungen der  
Kavitäten (8) des Zellkulturgefäßes (5) angeord-  
net sind.
- 30 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine  
optische Detektor (25', 33) unterhalb des Bodens  
von Kavitäten (8) eines Zellkulturgefäßes (5)

angeordnet ist.

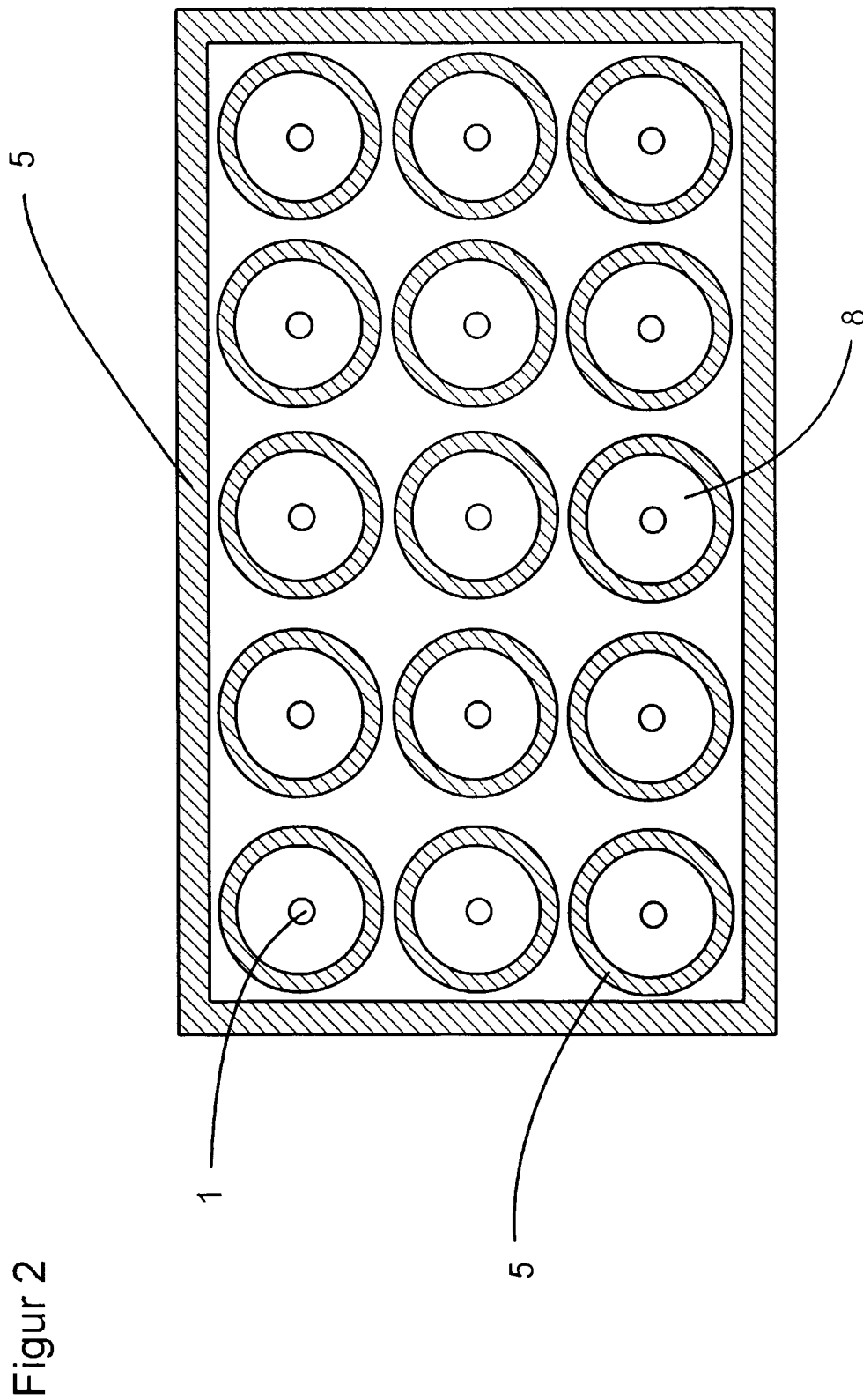
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellkulturgefäß (5) eine Mikrotiterplatte ist.
- 5 21. Verfahren zur optischen Bestimmung der Stoffwechselaktivitäten von Zellen unter Verwendung eines Deckelelementes nach einem der Ansprüche 1 bis 13 und einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 20,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass mit mindestens einem optischen Detektor (18, 25, 25', 33) mindestens eine sich infolge der Stoffwechselaktivität der Zellen verändernde Stoffkonzentration innerhalb von Kavitäten (8) eines Zellkulturgefäßes (5) unter Ausnutzung von sich in Abhängigkeit der sich ändernden Stoffkonzentration verändernden optischen Eigenschaften von optisch sensitiven Schichten (4) detektiert wird.
- 15 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des auf den mindestens einen optischen Detektor (18, 25, 25', 33) auftreffenden Lichtes gemessen wird.
- 20 23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität von in der optisch sensitiven Schicht (4) angeregten Lumineszenzlicht detektiert wird.
- 25 24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das zeitliche Abklingverhalten oder die Phasenverschiebung von in der optisch sensitiven Schicht (4) angeregten Lumineszenzlicht bestimmt wird.
- 30

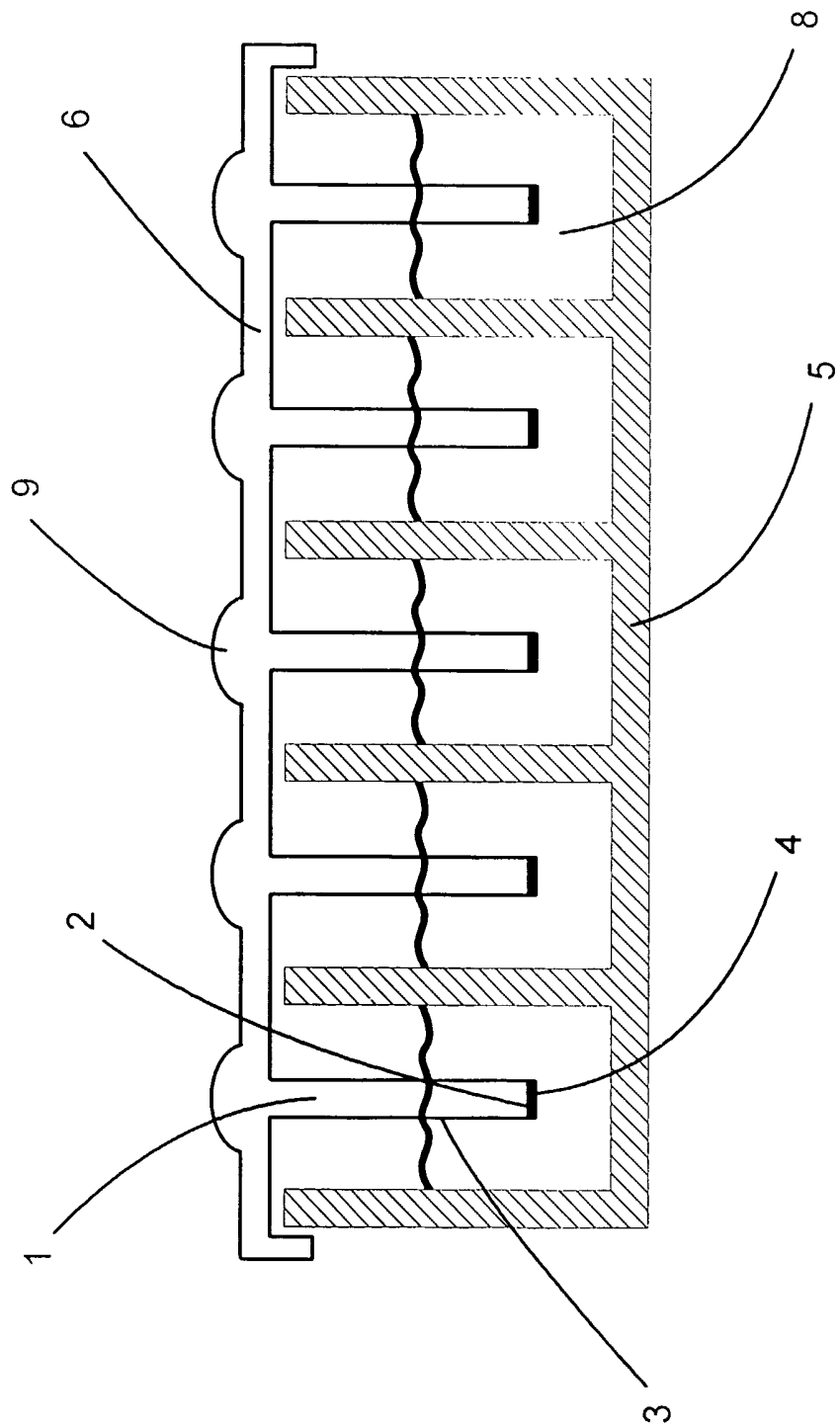
- 5 25. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität von durch die optisch sensitive Schicht (4) transmittiertem und/ oder gestreutem Licht gemessen wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Messungen in vorgebbaren Zeitabständen für jeweils eine Kavität (8) wiederholend durchgeführt werden.
- 10 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration und/oder die Veränderung der Konzentration von  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H^+$ ,  $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $NH^{4+}$  und/ oder der pH-Wert bestimmt wird.
- 15 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration und/oder die Veränderung der Konzentration von Enzym Substraten, erzeugt durch die Stoffwechselaktivität der Zellen, durch Enzym Sensoren als optisch sensitive Schicht (4) bestimmt wird.
- 20 29. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, das Glucose und/oder Lactat mit Enzym Sensoren als optisch sensitive Schicht (4) bestimmt wird / werden.
- 25 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Kavität (8) eines Zellkulturgefäßes (5) mit Deckelement (6) nicht mit Zellen belegt ist und als Referenz zur Stoffkonzentrationsbestimmung und deren Änderung mit optisch sensitiven Schichten
- 30 (4) verwendet wird.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung innerhalb der Kavitäten (8) oberhalb des flüssigen Mediums bestimmt wird.

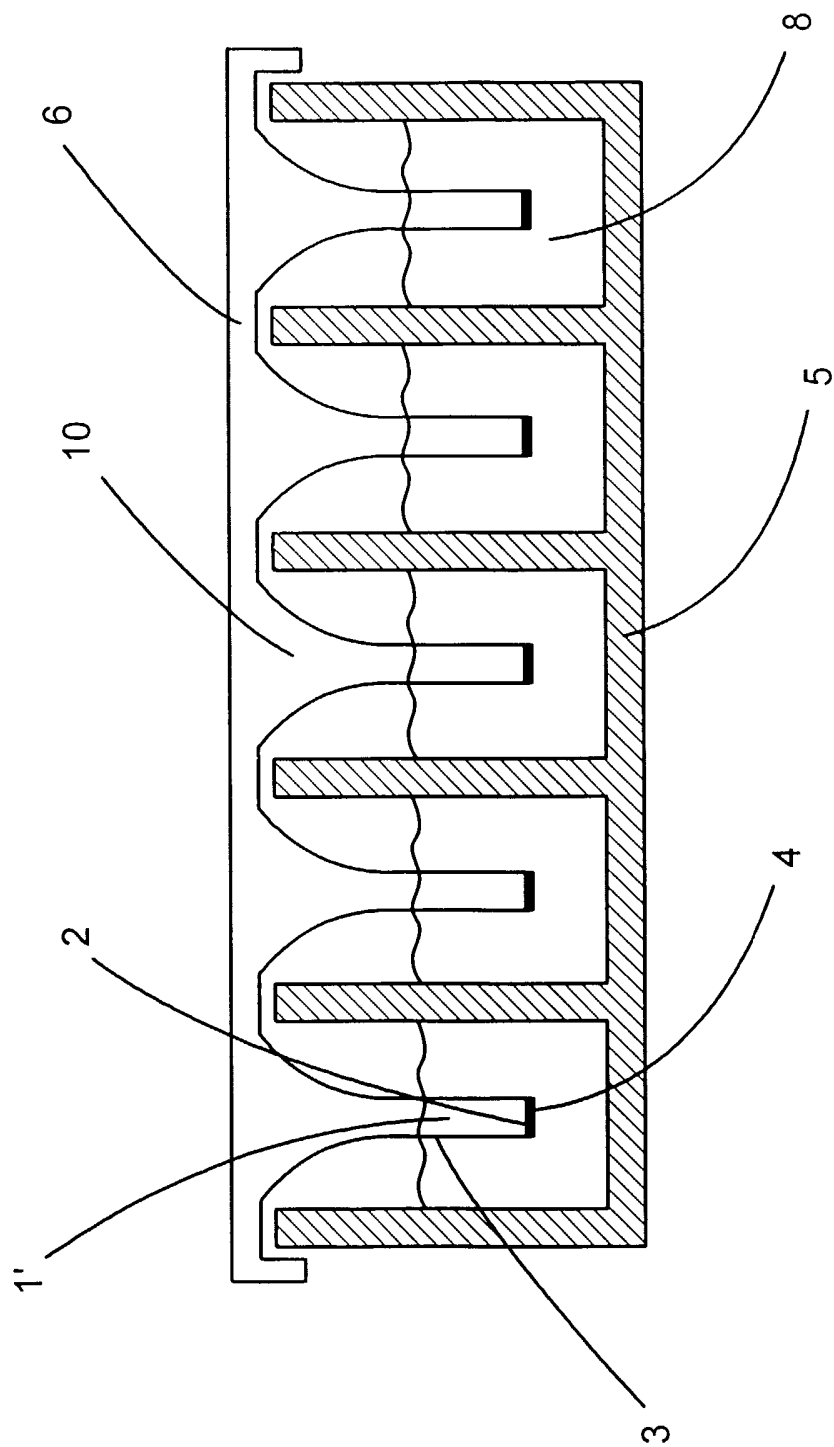


Figur 1

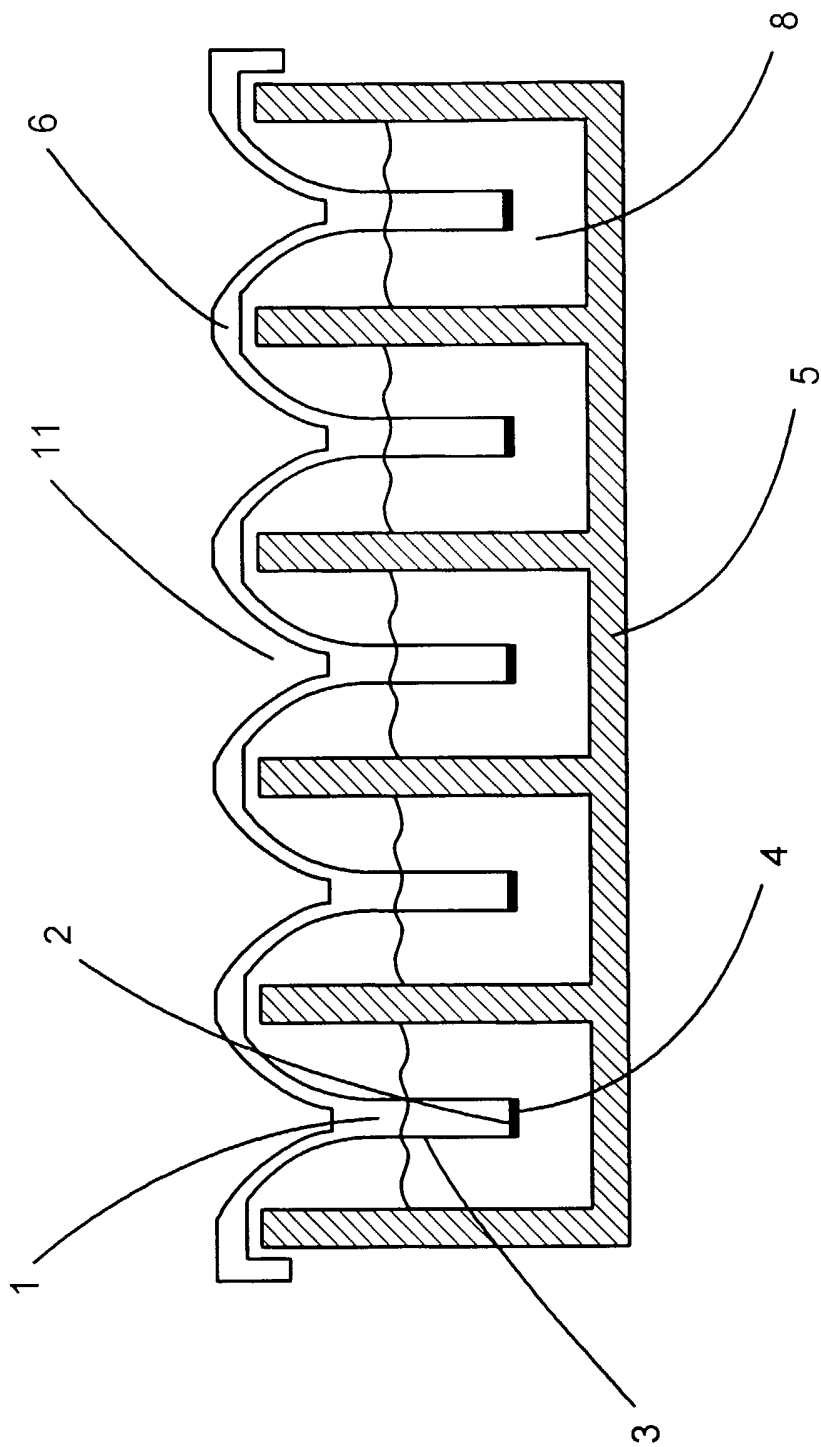




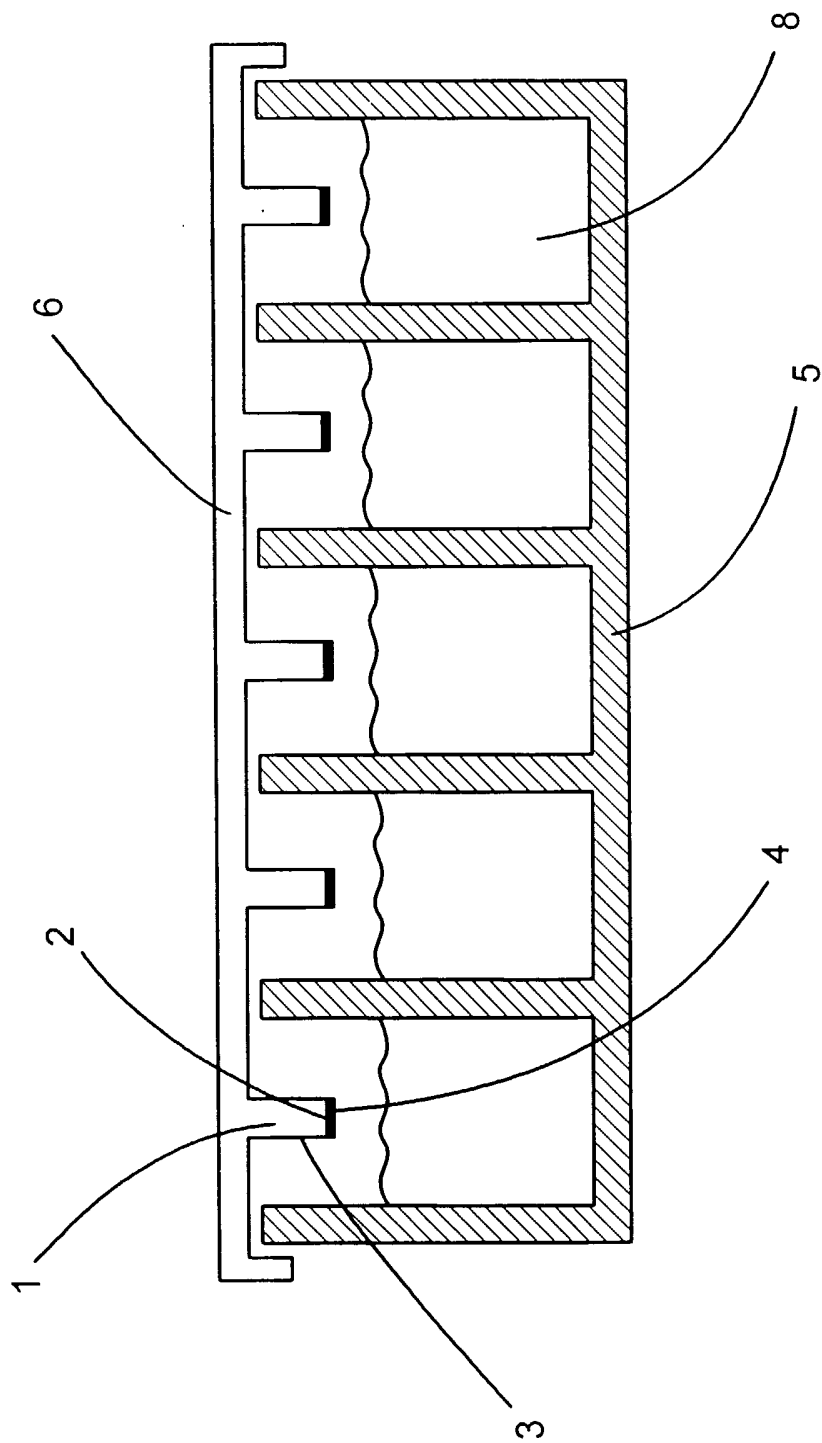
Figur 3



Figur 4

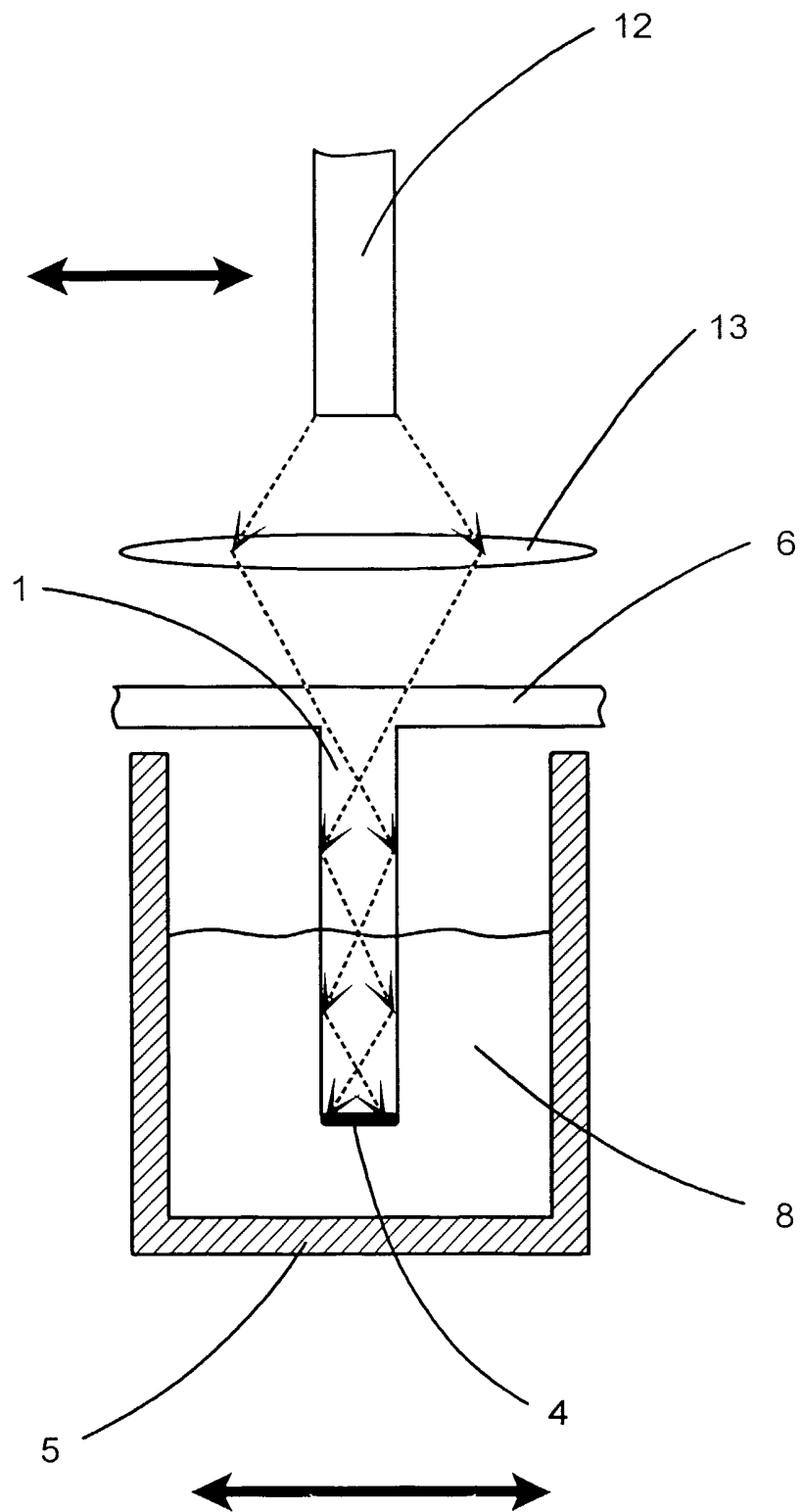


Figur 5

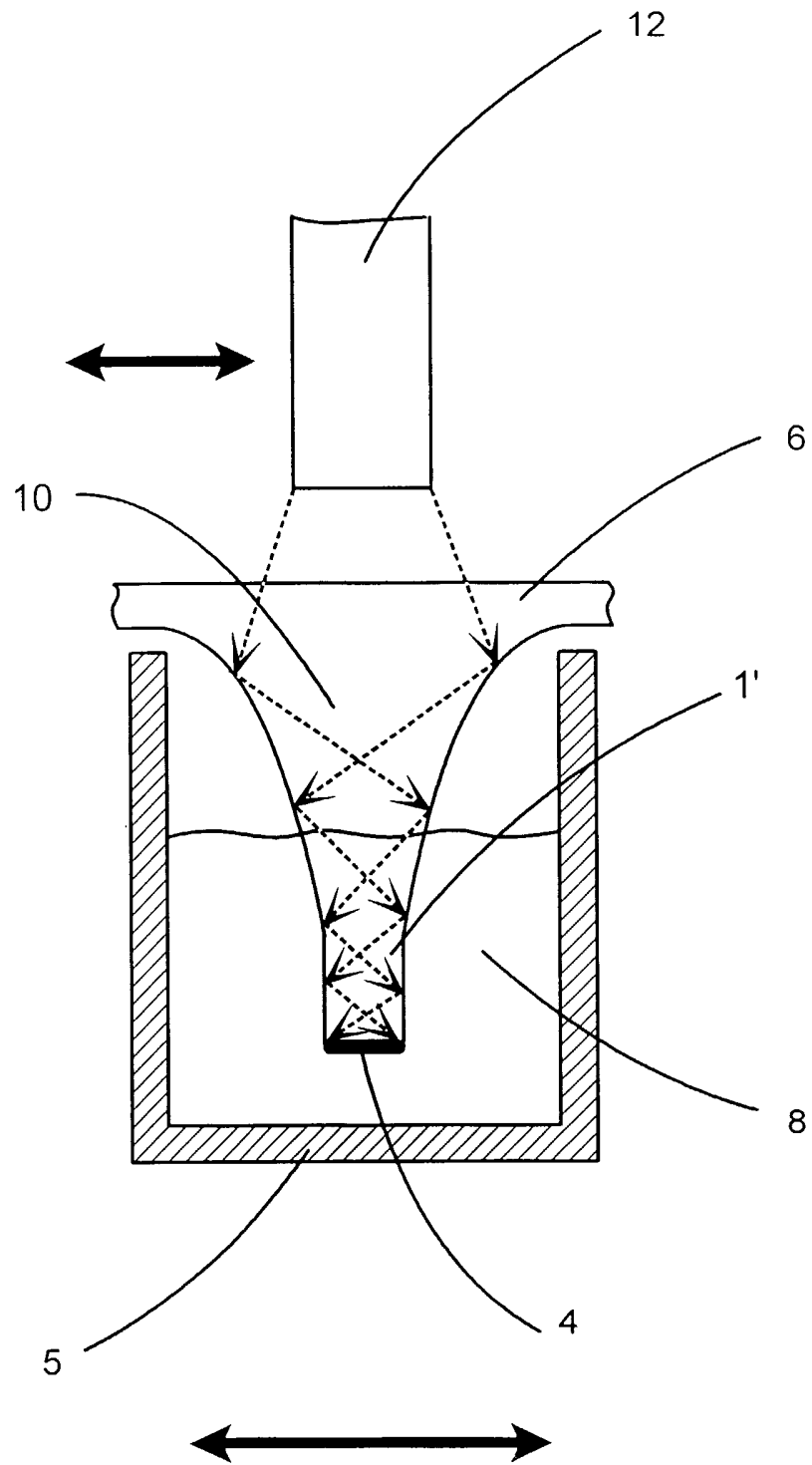


Figur 6

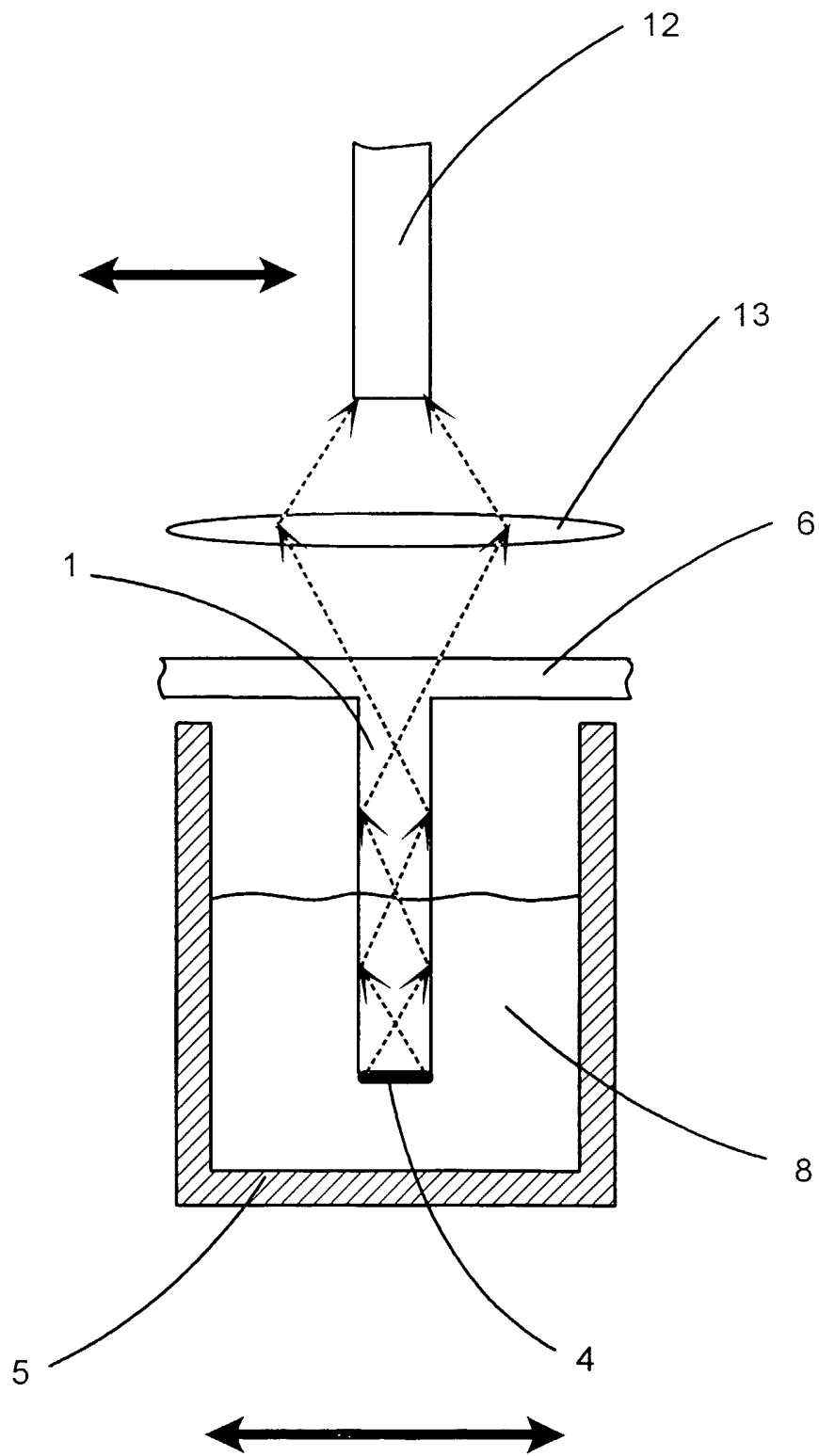
Figur 7



Figur 8



Figur 9



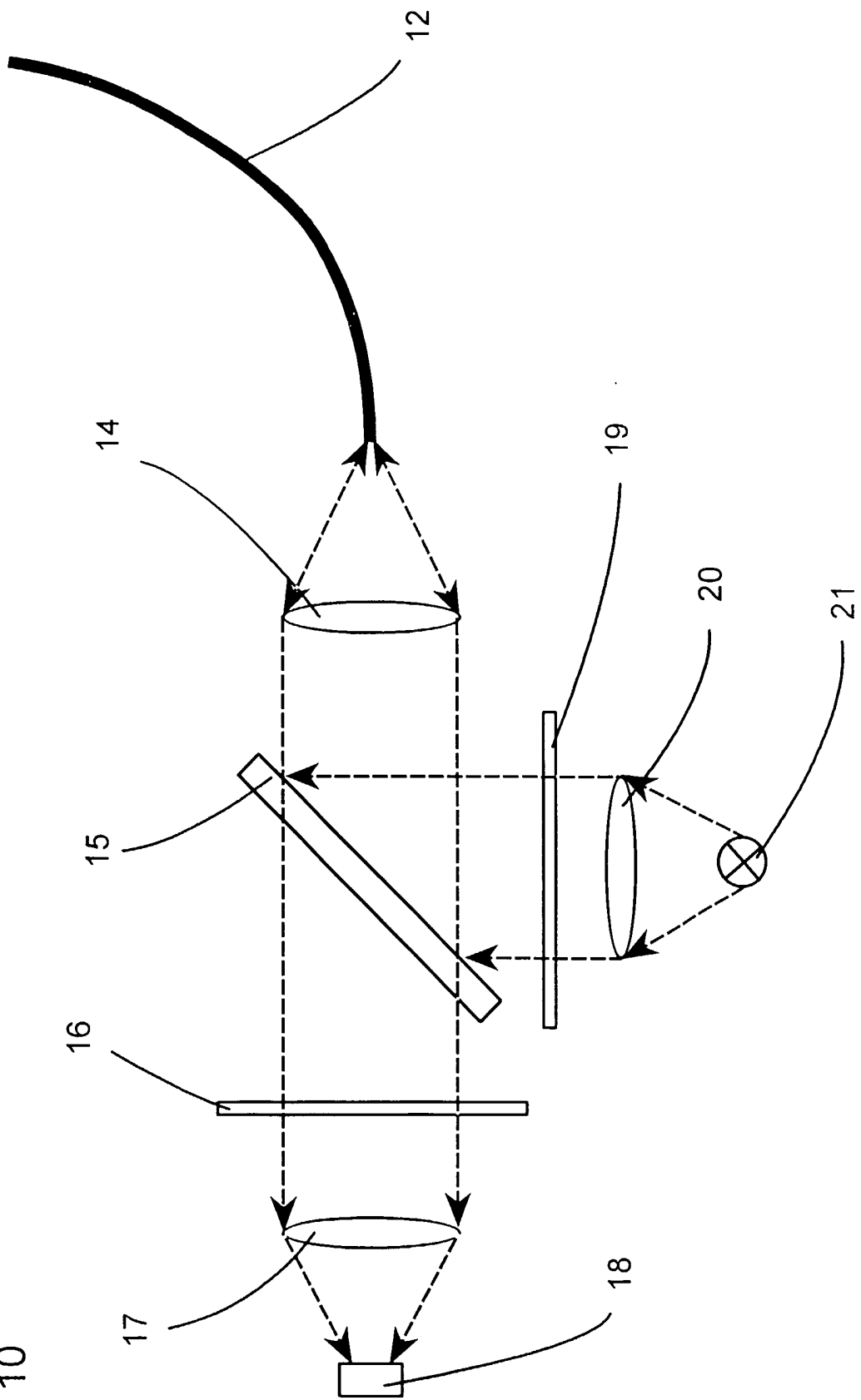
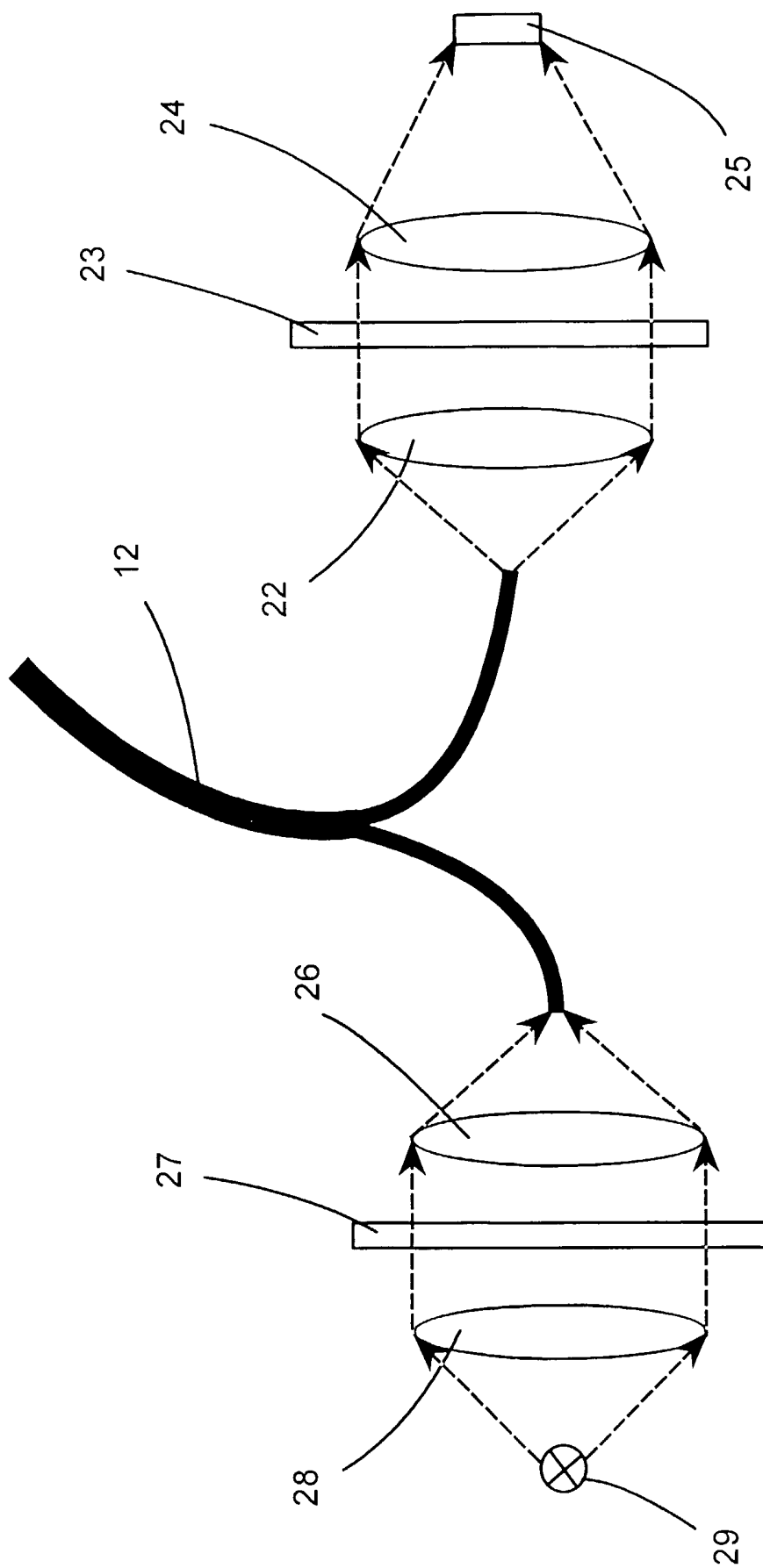
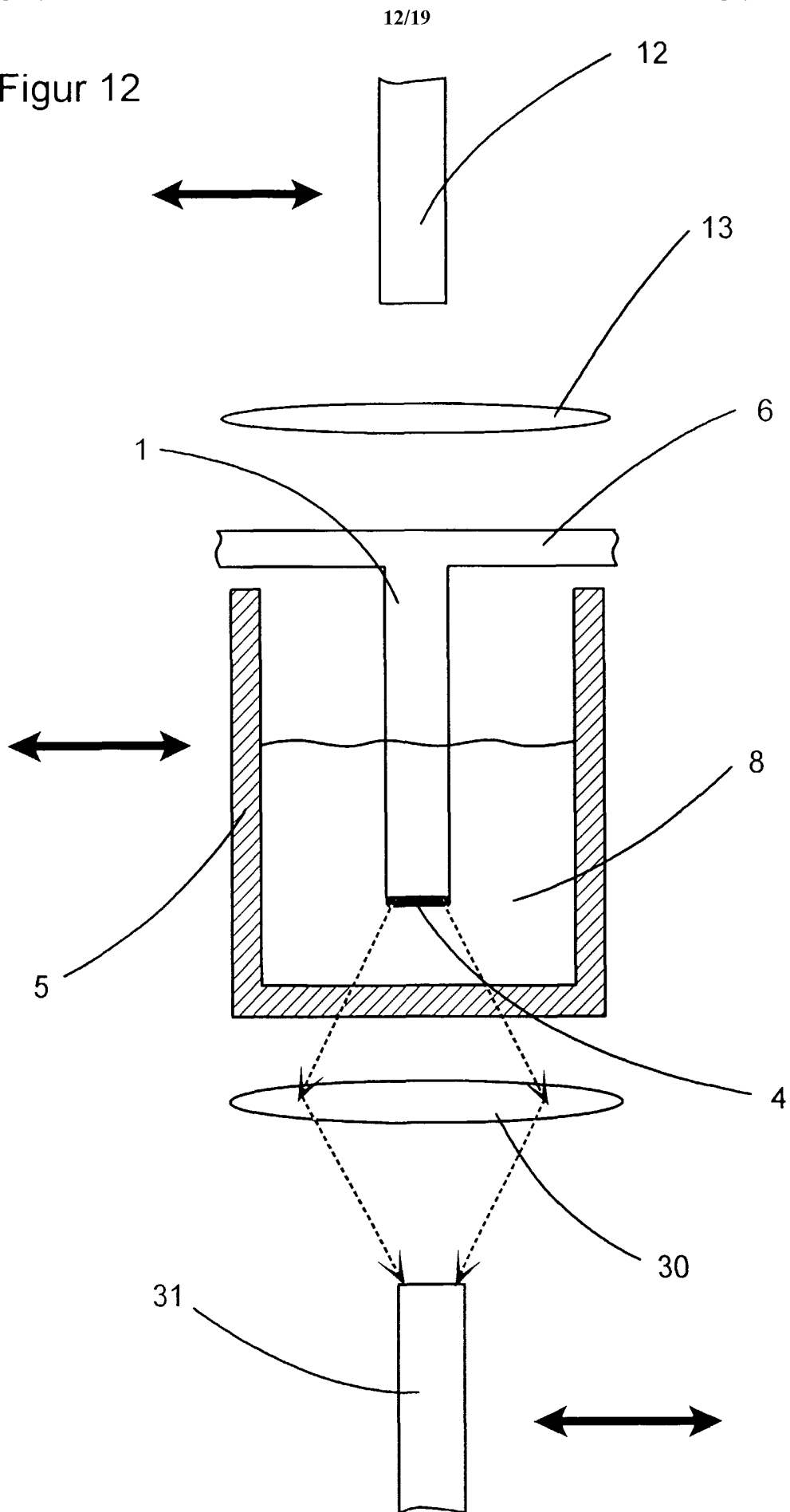


Figure 10

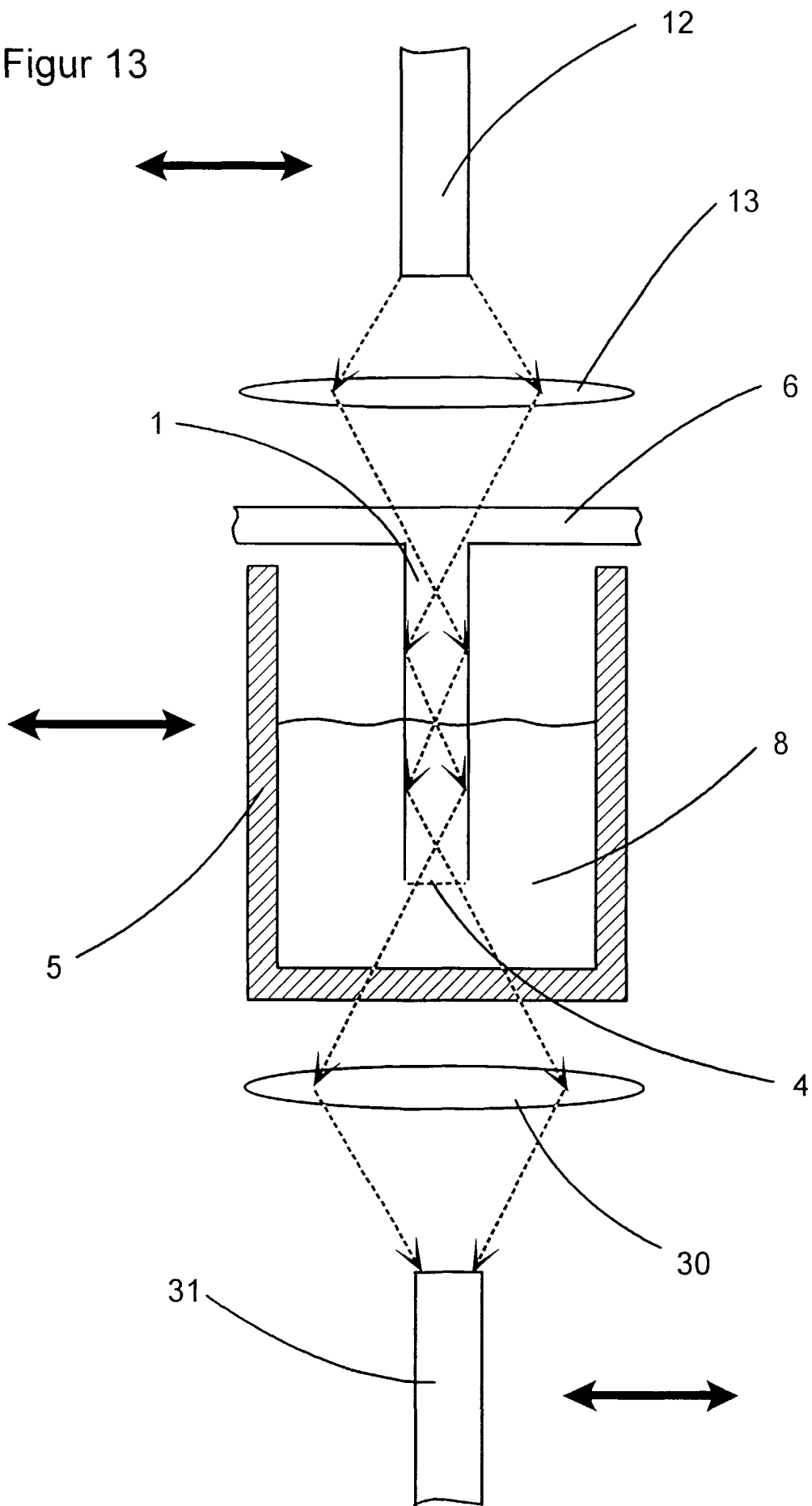


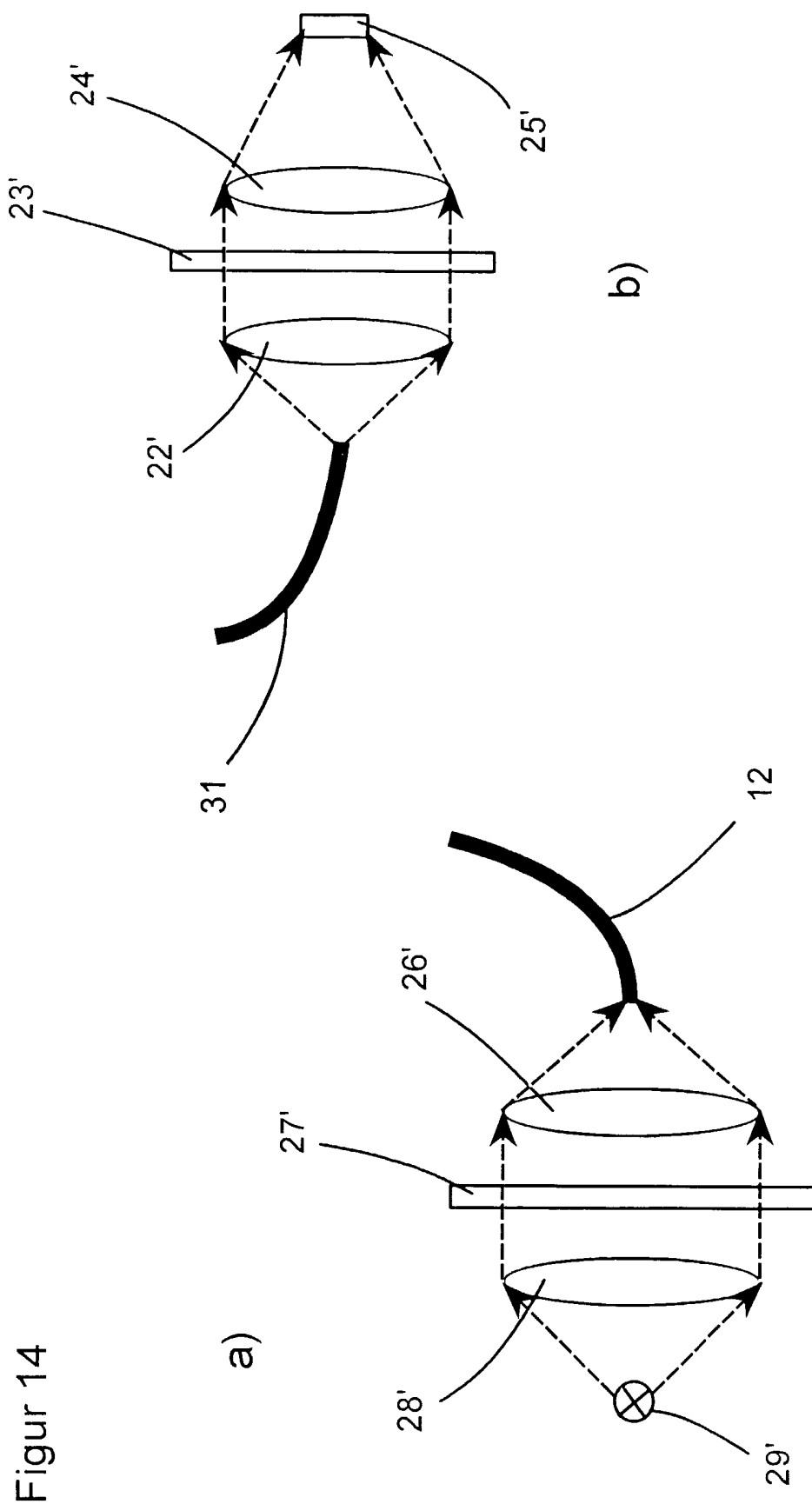
Figur 11

Figur 12



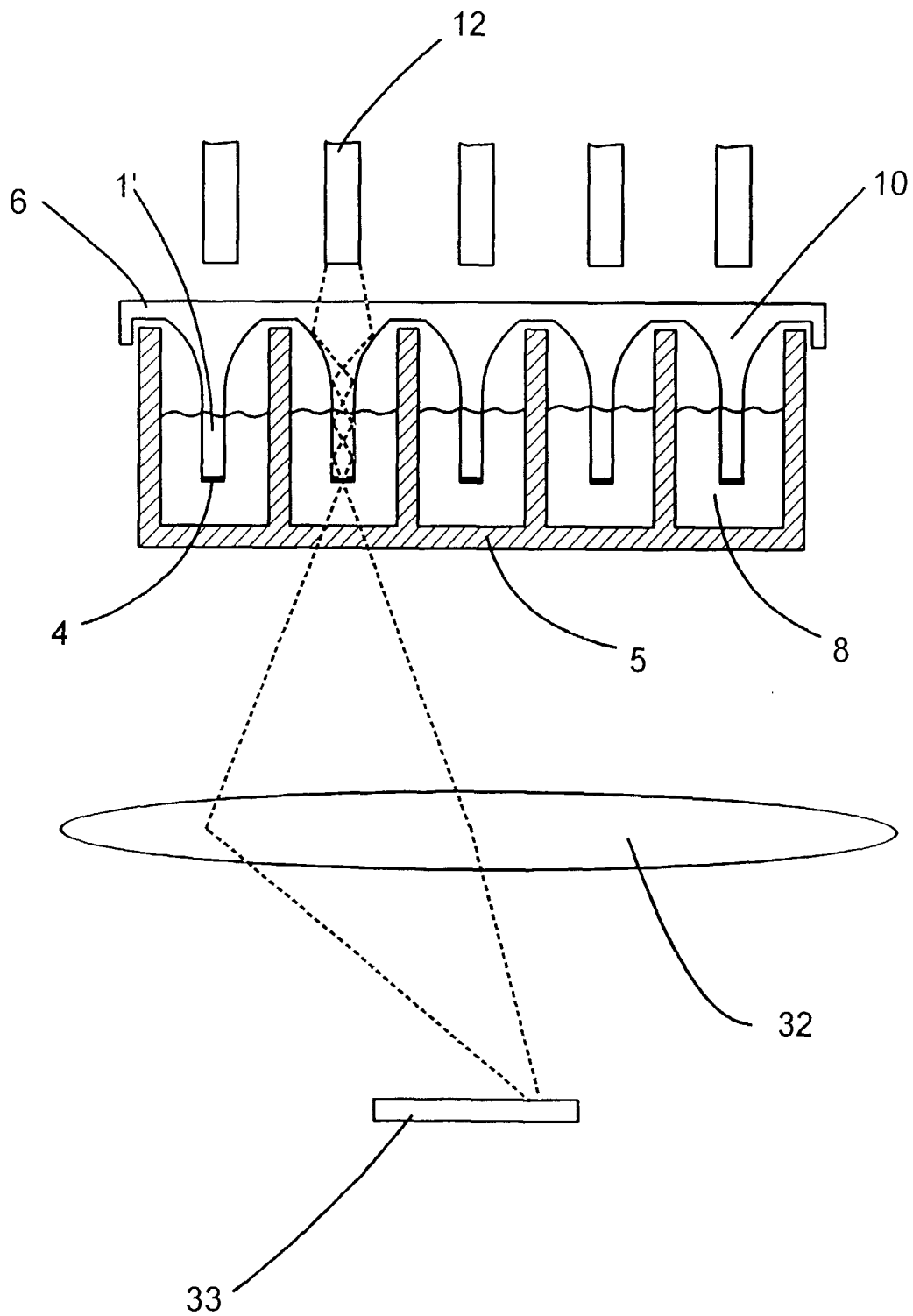
Figur 13



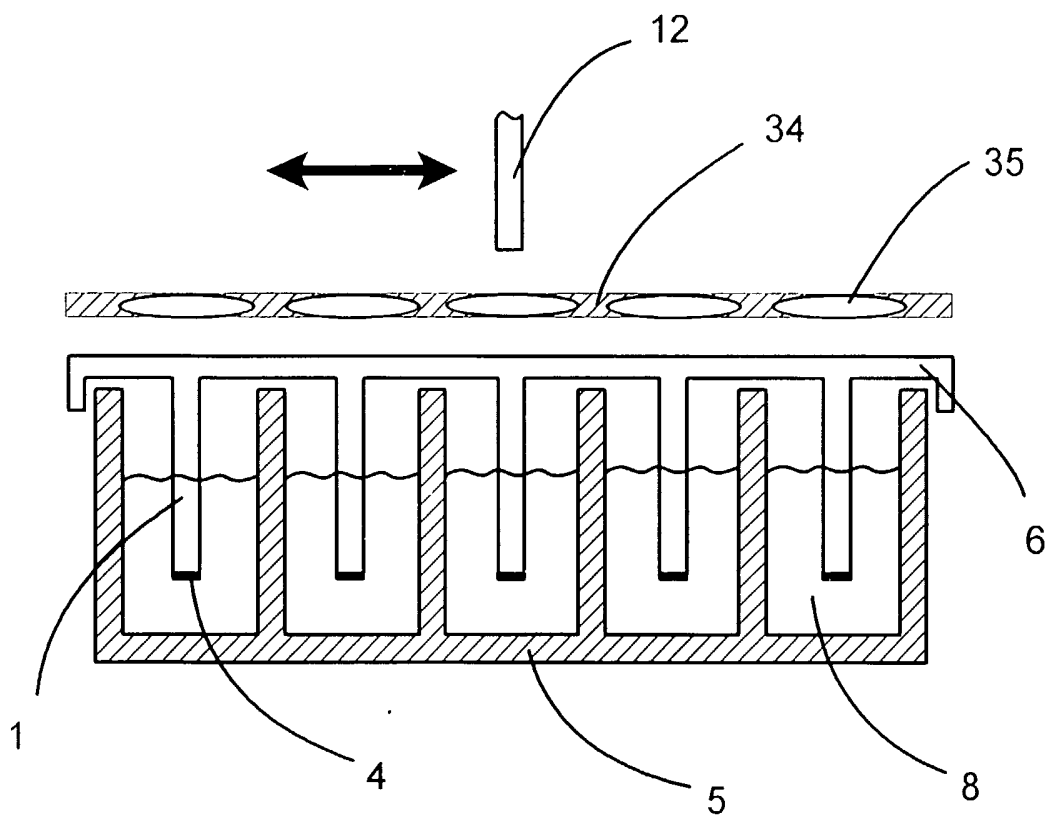


Figur 14

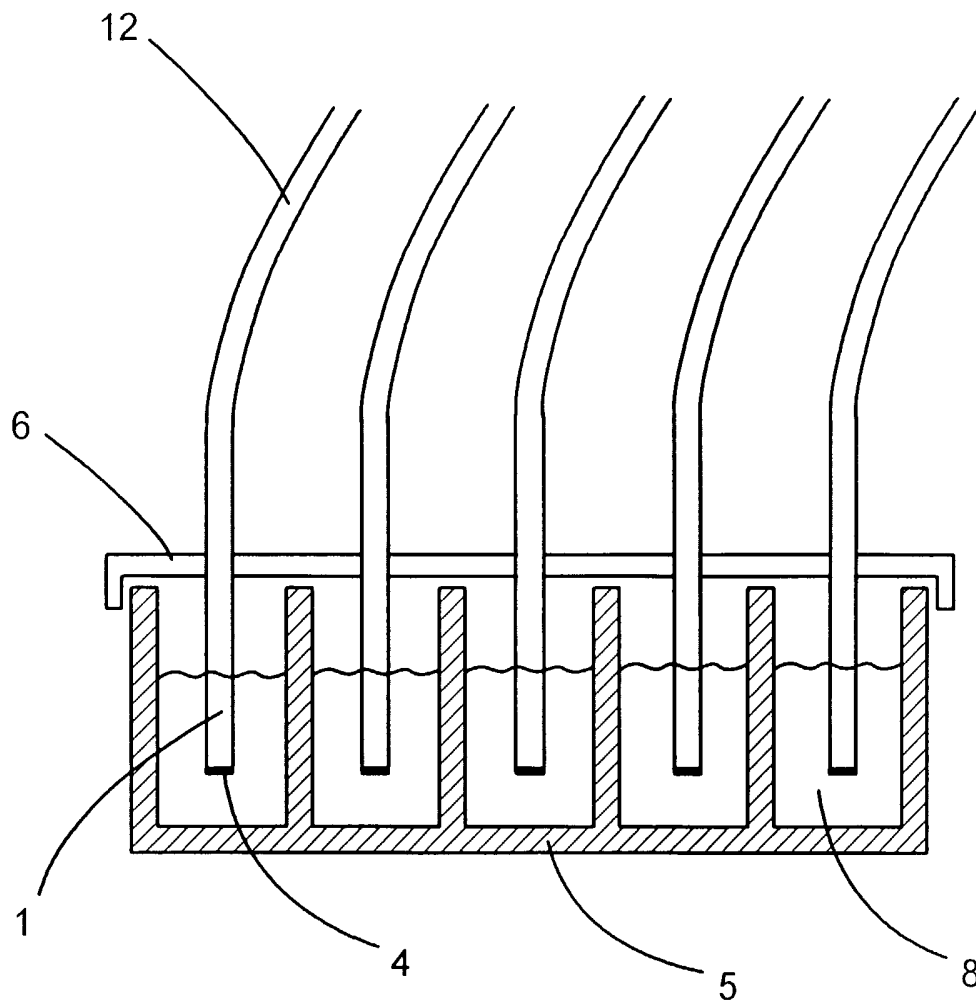
Figur 15



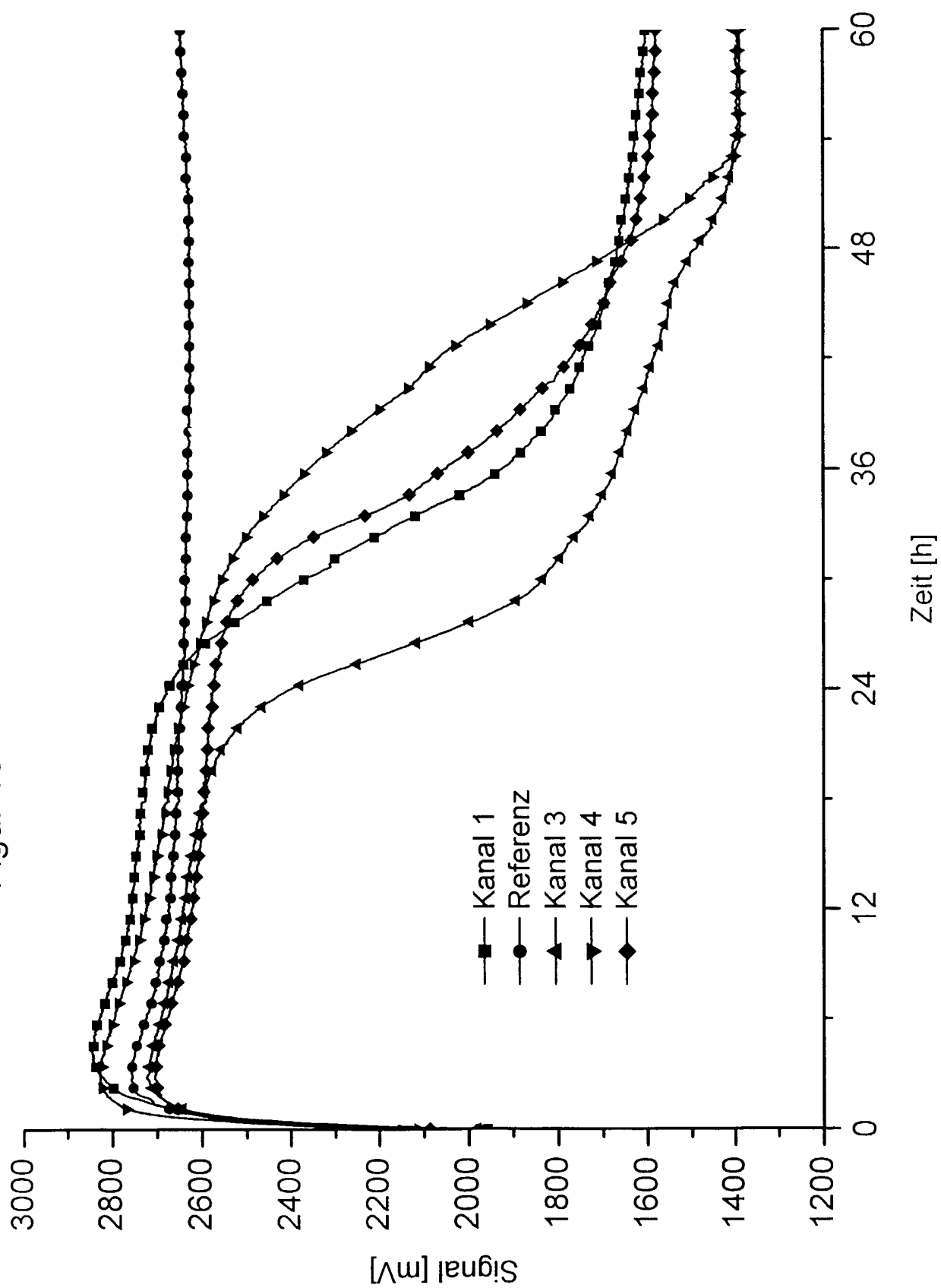
Figur 16



Figur 17



Figur 18



Figur 19

