

Optische Überwachung tierischer Zellen in Suspensionskulturen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Alexander Babitzky, M. Sc.

geboren am 11.07.1983 in Lwiw (Ukraine)

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 08.03.2017

Danksagung

Meinen Dank richte ich an Prof. Dr. Thomas Scheper für die Ermöglichung und Betreuung meiner Arbeit am Institut für Technische Chemie. Unter seiner Leitung habe ich gelernt meiner wissenschaftlichen Neugierde den Weg zu bahnen, sie in Energie umzuwandeln und diese Energie gerichtet zum Wohle der Forschung einzusetzen.

Ich danke auch Prof. Dr. Bernd Hitzmann nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern auch für sein Engagement. Er hat mich überzeugt, dass ich als Naturwissenschaftler keine Angst vor Programmzeilen haben muss und als Programmierer etwas ausrichten kann. PD Dr. Ulrich Krings danke ich herzlich für seine Fragen und Antworten, die mich nicht nur während meiner mündlichen Prüfungen, sondern auch im wissenschaftlichen Alltag unterstützt und geprägt haben.

Dr. Patrick Lindner vom Institut für Technische Chemie danke ich für die entwickelten Computerprogramme und seine großartige Beratung und Unterstützung bei dem Ausführen von Programmierarbeiten in C#. Dr. Dörte Solle und Dr. Sascha Beutel vom Institut für Technische Chemie danke ich besonders herzlich für ihre Unterstützung und Betreuung im Projekt SysCompart. Bei Dr. Claas Hacke und Dr. Daniel Landgrebe bedanke ich mich für die übermittelte Erfahrung und ihre praktischen Tipps bei der Kultivierung von tierischen Zellen. Für die großartige Unterstützung zu Beginn meiner Promotion spreche ich meinen Dank an Herrn Tim Höpfner aus.

Die Technik und Mechanik des digitalen Mikroskops würden ohne Herrn Friedberg Gellermann und Herrn Thorsten Stempel, Herrn Thorleif Hentrop und Herrn Burkhard Probst nicht existieren und nicht funktionieren. Ich danke Ihnen herzlich!

Dr. Janis Dreimann, Dr. Patrick Jonczyk und Dr. Rebecca Jonczyk danke ich herzlich für ihre Mühen, die sie in das Korrekturlesen investiert haben. Sie und meine großartigen Kollegen, Dr. Estabraq Dreimann, Dr. Christopher Wagner, Dr. Marco Sandor, Dr. Andreas Prediger, Dr. Arne Bluma und Dr. Antonina Lavrentieva standen mir immer mit gutem Rat und Hilfsbereitschaft zur Seite. Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Technische Chemie, unter anderem Frau Martina Weiß, Herrn Martin Pähler, Dr. Ivo Havlik, Dr. Michael Dors und Frau Cornelia Alic danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung.

Für die interessante und fruchtbare Zusammenarbeit bedanke ich mich bei meinen zahlreichen Kooperationspartnern aus den Projekten SysLogics und SysCompart. Vor allem danke ich Dr. Oscar Platas Barradas, Dr. Uwe Jandt und Dr. Negar Rajabi von der Technischen Universität Hamburg-Harburg.

Viel Dankbarkeit gebührt meiner Familie, meinen Eltern und meinen Schwiegereltern, aber noch mehr meiner Frau Sarah und meinen Kindern, Maya und Max. Ohne ihre Unterstützung wäre kein wissenschaftliches Projekt realisierbar.

Kurzfassung

Mit steigenden Anforderungen an die Qualität von biotechnologischen Erzeugnissen und zunehmendem Aufwand bei der Durchführung von biotechnologischen Forschungs- und Produktionsarbeiten steigt der Bedarf nach innovativen analytischen Instrumenten. Unter anderem sind Instrumente gefragt, die eine zuverlässige und schnelle Bewertung von Zellkultivierungen, nämlich der Zellzahl, Zellgröße, Morphologie und Viabilität der Zellen ermöglichen. Neben vielen Instrumenten sind optisch basierte Zellzähler und Zytometer diejenigen Geräte, die den Anforderung gerecht werden können. Solche Instrumente vereinen die Vorteile von moderner Mikroskopie und leistungsstarker Bildverarbeitung, erkennen Zellen und bewerten sie anhand mikroskopischer Bildaufnahmen. Die Vielfalt dieser Apparate reicht von Standgeräten für die Bestimmung der Zellkonzentration einzelner Proben bis zu In-situ Mikroskopen, welche an Bioreaktoren angebracht werden um das Zellwachstum kontinuierlich überwachen.

Der Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung und Erprobung eines Prototyps eines digitalen Mikroskops für die Überwachung tierischer Zellen in Suspensionskulturen und dessen Einbindung in automatisierte Durchflusssysteme mit Durchflusszellen, Pumpen und Ventilen für autonome Probenahme und Messung. Mit dem Mikroskop werden Kultivierungen von CHO-K1 überwacht, in dem während eines Kultivierungsprozesses Proben der Zellsuspension in regelmäßigen Zeitabständen am Mikroskop in einer Durchflusszelle vorbeigeführt werden. Dabei werden Proben der Zellsuspension mit Konzentrationen um 8×10^5 - 10^7 Zellen/mL untersucht. Mikroskopische Aufnahmen der Zelle werden mit einem optimierten Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet. Die Zellzahl, ihre Größe und Morphologie werden erfasst und zur Bewertung des Kultivierungsverlaufs geordnet. Zusammen mit dem Mikroskop werden auch faseroptische Sensoren für die Bestimmung des pH-Wertes und des gelösten Sauerstoffs eingesetzt. Es entsteht ein optisch basiertes Sensorsystem, mit dem Überwachung von Parallelkultivierungen möglich ist.

Schlagwörter: Digitale Mikroskope, Bildverarbeitung, Zellkultivierung

Abstract

The crucial aspects of the modern industrial and investigative biotechnology are assurance of product quality and accumulation of scientific data. Both, industrial production and laboratory research, often require considerable investments. Especially cell cultivation and its monitoring entails many processing steps. The use of modern innovative analytical instruments can help to make some time-consuming and expensive procedures like sampling and measuring of cell density redundant. Especially instruments consisting of optical components are often used to count cells and determine their size, morphology and viability. Many of them use microscopy and advanced image processing to perform those operations and store cultivation results. The range of such instruments is quite wide and includes standing units like automated cell counters and imaging flow cytometers as well as in-situ microscopes for installations at bioreactors.

This dissertation deals with development and testing of a digital microscope prototype designed for fully automated monitoring of mammalian cell cultivation. The microscope is integrated into a flow system that includes a flow through element, pump and valves and can be used for sample taking. In the test the microscope monitors several cultivations of CHO-K1 analyzing samples of cell suspension. Passing this flow through element the cells come into focus of the microscope, which captures the images of the cells. After the respective image has been processed with a special optimized computer program, the information about each detected cell is stored and can be used to provide an overview of cultivation process. While analyzing samples of cell suspension with concentrations in the range of 8×10^5 - 10^7 cells/ml the microscope is tested and optimized. In the eventual experiment the microscope is used in combination with optical sensors to determine cell count, pH value and oxygen saturation of two cultivations simultaneously.

Keywords: digital microscope, image processing, cell cultivation

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Kurzfassung.....	III
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Anforderungen an das Mikroskop.....	3
2.2 Optik.....	4
2.2.1 Linse und Abbildung.....	4
2.2.2 Mikroskope mit Endlich- und Unendlich-Optik, Abbildungsfehler.....	6
2.2.3 Mikroskopobjektive	8
2.2.4 Übersicht der Mikroskope und Cell Counter	9
2.3 Durchflusssysteme	13
2.3.1 Durchflusszellen und Pumpe	14
2.3.2 Automatisierte Probenahme und Probenbereitstellung	16
2.4 Bildaufzeichnung und Bildverarbeitung.....	18
2.4.1 Digitalkameras und Software.....	18
2.4.2 Steuerungsprogramm In-situ Control	19
2.4.3 Bildverarbeitungsprogramm Graphic Analyzer.....	20
2.4.4 Zusätzliche Bildverarbeitungsoperationen.....	24
2.4.5 FIA-Master	26
2.5 Optische Chemosensoren.....	27
2.6 CHO-Zellen.....	29
3 Mikroskopaufbau und Testung.....	32
3.1 Digitales Mikroskop und sein Aufbau	32
3.2 Beleuchtung und Abbildungsqualität.....	34

3.3	Berechnung der Abbildungsmaßstäbe	35
3.4	Mikroskopobjektive.....	37
3.5	Fazit.....	41
4	Automatisierung der Probenahme und Langzeittests mit den Durchflusszellen.....	43
4.1	Automatisierte Messung in einem Durchflusssystem	43
4.2	Aufbau eines Durchflusssystems mit automatisierter Probenahme.....	45
4.3	Messungen mit der automatisierten Probenahme	47
4.3.1	Test der Messgenauigkeit.....	48
4.3.2	Bestimmung der messbaren Zellkonzentrationen.....	49
4.3.3	Messungen mit den Durchflusszellen verschiedener Tiefen.....	51
4.4	Fazit.....	53
5	Überwachung der Kultivierung in einem Schüttelkolben und Viabilitätsbestimmung.....	55
5.1	Überwachung der Kultivierung mit Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl.....	55
5.2	Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten aus experimentellen Daten	58
5.3	Klassifizierung der Zellen und die Bestimmung der Lebendzellzahl aus der Messung mit dem Mikroskop	62
5.3.1	Klassifizierung der Zellen anhand der Zellgröße und Exzentrizität.....	62
5.3.2	Klassifizierung der Zellen anhand bildbasierter Größen und Kennwerte	66
5.4	Fazit.....	69
6	Parallelkultivierung und Überwachung der CHO-Zellen	72
6.1	Automatische Überwachung von zwei Schüttelkolben.....	72
6.2	Ergebnisse der Parallelkultivierung	73
6.2.1	Ergebnisse manuell durchgeführter Messungen	73
6.2.2	Ergebnisse automatisch durchgeführter Messungen	75
6.3	Beurteilung der Überwachungsdaten	78
6.4	Fazit.....	79
7	Zusammenfassung	82
8	Ausblick.....	85
9	Materialien und Methoden	87
9.1	Mikroskopobjektive.....	87

9.2	Berechnung der Abbildungsmaßstäbe	87
9.3	Mikroskopobjektive.....	88
9.4	Aufbau eines Durchflusssystems mit automatisierter Probenahme.....	89
9.5	Überwachung der Kultivierung in einem Schüttelkolben und Viabilitätsbestimmung..	92
9.6	Parallelkultivierung und Überwachung der CHO-Zellen in Schüttelkolben.....	93
9.6.1	Durchführung	93
9.6.2	Optische Chemosensoren	94
9.7	Zellkultivierung.....	97
9.8	Kultivierungskolben	100
9.9	Bildverarbeitung.....	100
9.10	Datenverarbeitung und Analyse.....	102
9.11	Listen der Chemikalien, Materialien und Geräte	104
10	Literaturverzeichnis.....	107
11	Anhang.....	115
12	Publikationsliste	125
13	Lebenslauf	126

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Beispiele für Bildentstehung in der geometrischen Optik.	4
Abb. 2-2: Bildentstehung im Strahlengang eines Mikroskops.....	6
Abb. 2-3: Counting Slide und Funktionsprinzip eines In-situ Mikroskops.	11
Abb. 2-4: Wichtige Bauelemente von Durchflusssystemen.....	14
Abb. 2-5: Grafische Benutzeroberfläche In-situ Control.....	20
Abb. 2-6: Grafische Benutzeroberfläche FIA-Master.....	27
Abb. 2-7: Beispiele für Messung der CHO-K1 mit dem digitalen Mikroskop im Durchfluss.....	30
Abb. 3-1: Aufbau des digitalen Mikroskops mit Beleuchtung und Chipwechsler- Prototyp.	32
Abb. 3-2: Digitales Mikroskop mit Hilfsvorrichtungen.	33
Abb. 3-3: Digitales Mikroskop mit Reflektor und Auflicht-Beleuchtung.....	34
Abb. 3-4: Mikroskopische Aufnahmen der CHO-K1 mit dem digitalen Mikroskop.....	35
Abb. 3-5: Gegenüberstellung der detektierten Zellen und ihrer Größe bei Messungen mit Mikroskopobjektiven der Abbildungsmaßstäbe 4x und 10x.	38
Abb. 4-1: Darstellung des Ablaufs einer Messung bei der Probenahme aus einem Bioreaktor....	43
Abb. 4-2: Aufbau und Funktion der automatischen Probenahme.	45
Abb. 4-3: Aufbau des Durchflusssystems und der automatischen Probenahme.....	46
Abb. 4-4: Test der Messgenauigkeit mit automatisierter Probenahme.	48
Abb. 4-5: Die Gesamtzellzahl (das Integral) der Zellen einer Probe in Abhängigkeit von Zellkonzentration.	50
Abb. 4-6: Die Gesamtzellzahl (das Integral) der Zellen einer Probe in Abhängigkeit von Zellkonzentration in den Durchflussezellen Ibidi 600 μm und Ibidi 800 μm	52
Abb. 5-1: Durchflusssystem für die Probemessung bei der Überwachung von Kultivierung mit CHO-K1.....	56
Abb. 5-2: Verlauf einer CHO-K1-Kultivierung aus Bestimmung der Gesamtzellkonzentration und Konzentration toter Zellen.	56
Abb. 5-3: Gegenüberstellung von $\mu(t)$ berechnet aus den Daten der Gesamtzellkonzentration und aus Gesamtzellzahl der Bildaufnahmen.	59

Abb. 5-4: Entwicklung der Anzahl von Agglomeraten und von kleinen Zellen im Laufe des Kultivierungsprozesses.....	63
Abb. 5-5: Die Gegenüberstellung von spezifischen Wachstumsraten $\mu(t)$ aus manuellen Bestimmung der Lebendzellkonzentration und mikroskopischer Messung.....	64
Abb. 5-6: Lebendzellzahl aus mikroskopischen Daten und manuellen Messungen.....	68
Abb. 5-7: Gesamtzellkonzentration und Lebendzellkonzentration der CHO-K1-Kultivierung mit Bestimmung der Lebendzellkonzentration.....	69
Abb. 6-1: Apparatur für die Durchführung von Parallelkultivierungen.....	73
Abb. 6-2: Verlauf von Parallelkultivierung aus Messungen manuell entnommener Proben.	74
Abb. 6-3: Verlauf von Parallelkultivierung aus Messungen automatischer Probenahme.	76
Abb. 6-4: Sauerstoffkonzentrationen während der Parallelkultivierung.....	79
Abb. 9-1: Apparativer Aufbau für das Experiment zur Testung des Mikroskops mit verschiedenen Objektiven.....	88
Abb. 9-2: Durchflusssystem und automatische Probengabe.	89
Abb. 9-3: Apparatur für die Durchführung von Parallelkultivierungen.....	93
Abb. 9-4: Übersicht der Durchflusselemente an einem Schüttelkolben.....	99
Abb. 11-1: Funktion und Aufbau eines In-situ Mikroskops.....	115
Abb. 11-2: Digitales Mikroskop und automatisierter Chipwechsler.	115
Abb. 11-3: Graphische Benutzeroberfläche Graphic Analyzer.....	116
Abb. 11-4: Tabelle mit Ergebnissen aus der Bildanalyse und Zellerkennung.	116
Abb. 11-5: Beispiele der Auswertung mit dem Programm Graphic Analyzer.	116
Abb. 11-6: Schematische Darstellung einer Tropfkammer mit integrierten optischen Chemosensoren.	118
Abb. 11-7: Durchschnittswerte der gemessenen Zellgröße (Fläche) im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	119
Abb. 11-8: Durchschnittswerte der gemessenen Kompaktheit im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	119
Abb. 11-9: Durchschnittswerte der gemessenen Exzentrizität im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	120

Abb. 11-10: Durchschnittswerte der gemessenen mittleren Grauwerte im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	120
Abb. 11-11: Durchschnittswerte des Produkts aus vertikalen und horizontalen Position der mittleren Intensitätswerte im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	121
Abb. 11-12: Durchschnittswerte der gemessenen mittleren Entropie im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.....	121
Abb. 11-13: Bilder aus Überwachung einer Zellkultivierung mit dem digitalen Mikroskop.....	122
Abb. 11-14: Morphologische Untersuchung der durchgeführten Parallelkultivierung.....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Übersicht automatischer Zellzähler.....	10
Tabelle 2-2: Vorteile und Nachteile von In-situ und At-line Mikroskopen.....	13
Tabelle 3-1: Technische Daten von Digitalkameras.....	36
Tabelle 3-2: Berechnete Abbildungsmaßstäbe für verschiedene Digitalkameras.....	37
Tabelle 3-3: Anzahl detektierter Zellen bei Verwendung verschiedener Objektive.....	39
Tabelle 4-1: Berechnete Integrale und Peakhöhen im Test der Messgenauigkeit.....	49
Tabelle 4-2: Bestimmung der Zellkonzentration in Durchflusszellen verschiedener Tiefen.....	53
Tabelle 9-1: Teileliste des Mikroskops.....	87
Tabelle 9-2: Verwendete Objektive	89
Tabelle 9-3: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für CHO-K1.....	98
Tabelle 9-4: Einstellungen des Graphic Analyzers.....	101
Tabelle 9-5: Materialien und Geräte.....	104
Tabelle 9-6: Chemikalien- und Hilfsmittelliste.....	106
Tabelle 11-1: Beispiele der Auswertung mit dem Graphic Analyzer.....	117

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
Bit	<i>binary digit</i>
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
C#	Programmiersprache
ca.	circa
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CHO	<i>chinese hamster overy</i>
cm	Zentimeter
C-mount	Spezieller Kameraanschluss
COM-Port	Communication port
d. h.	das heißt
DIN	Deutsche Industrienorm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E</i>	Exzentrizität
fps	<i>frames per second</i>
<i>f</i>	Brennweite
FIA	<i>flow injection analysis</i>
GIMP	GNU Image Manipulation Program
h	Stunde
H	Bildliche Entropie
Hor.	Horizontal
<i>K</i>	Kompaktheit
LED	Leuchtdiode
m	Meter
M_G	Mittlerer Grauwert

Mbit	<i>mega binary digit</i>
min	Minute
Mio.	Million
mL	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µ(t)	zeitabhängige spezifische Wachstumsrate
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
P_H	Position der horizontalen mittleren Intensität
P_V	Position der vertikalen mittleren Intensität
PTFE	Polytetrafluorethylen
Rad	Radian
rpm	rotation per minute
RS232-Schnittstelle	Serielle Schnittstelle
s	Sekunde
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
ß _t	Vergrößerungsfaktor (Objektive)
USB	<i>universal serial bus</i>
V	Abkürzung für Ventil
V_M	Gesamtvergrößerungsfaktor Mikroskop
V_{obj}	Abbildungsmaßstab Objektiv
Vrt.	Vertikal
Wert C	Wert für Bewertung der Zellviabilität
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Nicht ohne Grund verlassen sich Menschen am häufigsten auf die Eindrücke und Informationen die sie mit ihren Augen wahrnehmen. Mit einer guten Sicht und einem sicheren Blick orientieren sich Menschen im Alltag und behalten die wichtigsten Momente ihres Lebens als kunterbunte Bilder in ihren Köpfen und Herzen.

Durch das Sehen, also die visuelle Wahrnehmung, beobachten und bewerten auch Wissenschaftler die experimentellen Ereignisse und leiten daraus Zusammenhänge ab. Kein Wunder, dass die Vielfalt der Instrumente, die das menschliche Auge beim Beobachten und Bewerten unterstützt beachtlich groß ist. Gerade Instrumente, wie zum Beispiel Fernrohre und Mikroskope haben entscheidend zum wissenschaftlichen Erfolg beigetragen und genießen auch heute große Beliebtheit beim experimentellen Arbeiten. Dabei erfahren die Instrumente viele Abwandlungen und Modernisierungen im Zusammenhang mit neuartigen Anforderungen und den gestellten wissenschaftlichen Aufgaben. In der modernen Mikroskopie finden sich Instrumente deren Ausstattung von zeitgemäß gefertigten Linsen und Lichtquellen bis hin zu hochkomplizierten elektronischen und mechanischen Steuerungselementen, Kameras und Lasersystemen reicht. Eine besondere Rolle in der Mikroskopie spielen auch moderne Datenverarbeitungs- und Steuerungsprogramme sowie Rechen- und Bildverarbeitungssysteme. Sie machen die Mikroskope leistungsfähiger und ermöglichen den Wissenschaftlern nicht nur eine oberflächliche Betrachtung von z. B. Zellen, Werkstoffen und Fertigprodukten sondern machen sogar molekulare und submolekulare Ebenen sichtbar.

In der Biotechnologie und der damit verbundenen Forschung kann kaum ein Wissenschaftler auf Mikroskope verzichten. Die Bewertung von Zellstrukturen, ihrer Kompartimente und Aggregate verlangt mindestens ein Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop. Mit diesen Instrumenten werden auch obligatorische Aufgaben im Laufe biotechnologischer Kultivierungsprozesse bewerkstelligt. Unter anderem sind das die Bestimmung der Zahl und der Konzentration lebender Zellen und die Bewertung einer durch Bakterien kontaminierten Zellkultur.

Die vorliegende Arbeit schildert die Entwicklung und Erprobung eines Mikroskop-Prototyps, welches Wissenschaftlern das Ausführen von obligatorischen Aufgaben während der Kultivierung tierischer Zellen in Suspension erheblich erleichtern soll. Die Neuentwicklung ist ein Mikroskop, das in Kombination mit einer Kamera und einem Computer für die Entstehung und Speicherung von Bildsequenzen sorgt. Die Aufnahmen enthalten das Abbild von tierischen Zellen und werden mit einem Bildverarbeitungsprogramm analysiert. Begleitend dazu werden auch Methoden und Techniken entwickelt, die das Mikroskop in die Überwachung tierischer Zellen im laufenden Kultivierungsbetrieb einbinden sollen.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neuartiger Prototyp eines optischen Überwachungsinstruments entworfen werden, mit dem die Beobachtung und Bewertung tierischer Zellen in Suspensionskulturen möglich ist. Hierzu soll ein halbautomatisiertes digitales Lichtmikroskop entwickelt werden, womit tierische Zellen unterschiedlicher Zellkonzentrationen im Durchfluss beobachten werden können. Mit diesem Mikroskop werden Bildsequenzen aufgezeichnet. Im Anschluss soll die Auswertung der Aufnahmen mittels eines optimierten Bildverarbeitungsprogramms erfolgen, das Informationen über die Zellzahl, Zellgröße und Morphologie der Zellen in einer Datei akkumuliert. Mit den Datensätzen soll das Zellwachstum einer Tierzellkultivierung rekonstruiert und bewertet werden. Nach der Entwicklungs- und Konstruktionsphase soll das Mikroskop an einem speziell entwickelten Durchflusssystem mit automatischer Probenahme gekoppelt werden. Es sollen Proben aus laufenden Tierzellkultivierungen mit dem Mikroskop beobachtet werden. Neben dem Mikroskop sollen auch faseroptische Sensoren für die Bestimmung des pH-Werts und der Sauerstoffsättigung in den Proben eingesetzt werden. Für die Realisierung dieser Vorhaben werden verschiedene Automatisierungskonzepte in Betracht gezogen und unterschiedliche Konzepte für die Messung im Durchfluss getestet.

Da die Systeme an den Einsatz in der Tierzellkultur optimiert werden sollen, werden Suspensionskulturen von CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) bei den Messungen eingesetzt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Anforderungen an das Mikroskop

Ob einfache Lichtmikroskope oder ein hochleistungsfähiges STED-Mikroskop (Stimulated Emission Depletion), die Qualität des Einblicks in die Welt von der Größenordnung einiger Mikro- oder Nanometer hat seinen Preis. Dies betrifft nicht nur den finanziellen Betrag, den ein Wissenschaftler in sein Mikroskop zu investieren bereit sein muss, sondern auch die Zeit, die er braucht um mit einem Mikroskop ein gewünschtes Ergebnis zu erzielen. Im Hinblick auf die Überwachung von Bioprozessen kann festgehalten werden, dass es in erster Linie nicht um detaillierte Einblicke in das Innenleben einer Zelle geht. Um das Wachstum tierischer Zellen z. B. in einem Bioreaktor zu begleiten, sollen Daten gewonnen werden, welche im Nachhinein zur Berechnung prozesstechnisch relevanter Größen, wie z. B. der spezifischen Wachstums- und Absterberate [1] verwendet werden können. So ist z. B. die Lebendzellkonzentration derjenige Wert, der bei der Erfassung der Zellen durch das Mikroskop im Vordergrund steht. Auch die Größe und die Morphologie der Zellen und die Bildung von Agglomeraten durch kleine und große Zellen können wichtige Informationen zur Beurteilung des Zellwachstums bieten. Diese Werte sollen dabei von möglichst vielen Zellen bestimmt werden, um eine repräsentative Aussage zu ermöglichen. Die Zellen sollen, im Gegensatz zu den gewöhnlichen präparativen Techniken, nicht unbeweglich auf einem gläsernen Objektträger beobachtet werden, sondern in einem Behälter mit durchsichtigen Wandungen am Objektiv des Mikroskops vorbeiströmen.

Bei der Berücksichtigung der Bedingungen kristallisiert sich heraus, dass die technischen Vorgaben an das neuartige Mikroskop mit der optisch-technischen Leistungsfähigkeit eines gewöhnlichen Licht- oder Fluoreszenzmikroskops vergleichbar sind. Es braucht mindestens ein Objektiv, einen Tubus, eine Halterung und eine Lichtquelle. Auch ein Detektor, in diesem Fall eine Digitalkamera, gehört zu den wichtigen Elementen. Vor allem die Kamera und das Objektiv bestimmen im Wesentlichen die Leistungsfähigkeit des Mikroskops und sind diejenigen Objekte, in die sich hohe Investitionen lohnen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit entsteht ein digitales Mikro-

skop [2], das nur die wichtigsten und grundlegendsten optischen Elemente eines Mikroskops beibehält. Die Abbildungen der Zellen sollen ausschließlich von der Digitalkamera erfasst und durch ein Steuerungsprogramm auf dem Monitor eines Computers visualisiert werden.

2.2 Optik

Zur besseren Beurteilung der Vorzüge und Nachteile eines digitalen Mikroskops ist eine kurze Erläuterung der grundlegenden Begriffe der Mikroskopie, die Entstehung der mikroskopischen Abbildung und der geometrischen Optik notwendig.

2.2.1 Linse und Abbildung

Wenn das Linsenwerk eines Mikroskopobjektivs bei einer groben Betrachtung als eine Sammellinse angesehen wird, so kann die Entstehung eines Bildes in Mikroskopen mit Hilfe geometrischer Optik gut erklärt werden (Abb. 2-1).

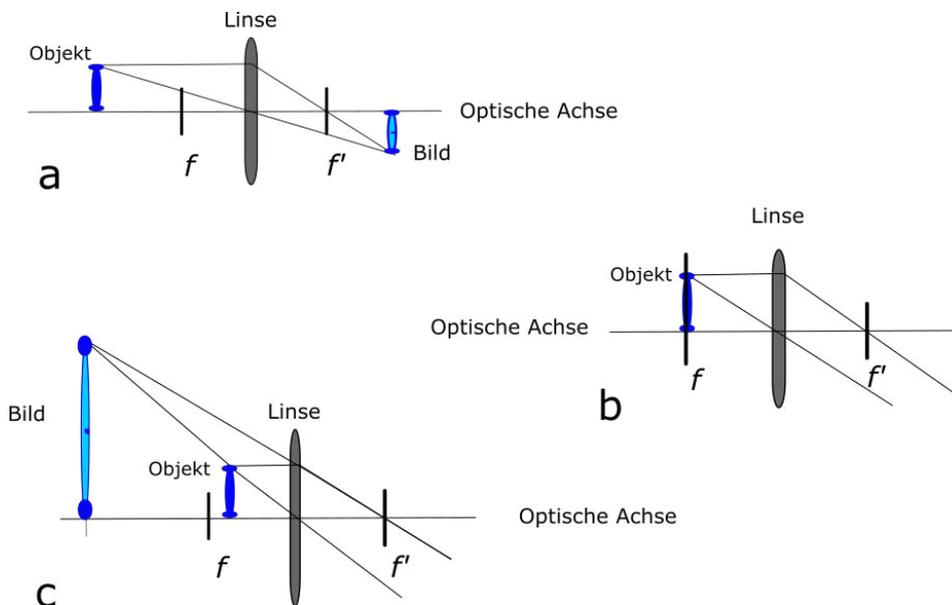


Abb. 2-1: Beispiele für Bildentstehung in der geometrischen Optik.

a) Beispiel für ein reelles, umgekehrtes, vergrößertes Bild analog zur Bildentstehung im Mikroskopobjektiv mit Endlich-Optik. b) Beispiel für ein Bild im Unendlichen analog zur Bildentstehung im Mikroskopobjektiv mit Unendlich-Optik. c) Beispiel für ein virtuelles Bild analog zur Bildentstehung im Okular eines Mikroskops.

In der Graphik werden drei Situationen für die Entstehung eines Bildes bei der Verwendung einer einfachen Sammellinse vorgestellt. Die Linse steht senkrecht zur optischen Achse und teilt den Raum in zwei Bereiche. Das dunkelblaue Objekt links von der Linse erscheint bei einer günstigen Beleuchtung als ein Bild rechts von der Linse (Abb. 2-1a). Auf der optischen Achse sind zwei Brennebenen vorhanden. Diese Brennebenen markieren den Abstand zwischen der Linse und den Brennpunkten. Die Abstände sind die Brennweite f auf der Seite des Objekts und die Brennweite f' auf der Seite des Bildes. Befindet sich das Objekt in der Entfernung von der Linse, die in etwa dem Anderthalbfachen der Brennweite f entspricht, so entsteht ein vergrößertes, umgekehrtes, reelles Bild (Abb. 2-1a). Ist das Objekt genau so weit von der Linse entfernt, wie die Brennebene, entsteht ein Bild im Unendlichen (Abb. 2-1b). Dabei verlaufen alle Strahlen, welche einem gemeinsamen Punkt vom Objekt entstammen auf der Bildseite parallel zueinander [3]. Wenn das Objekt innerhalb der Brennweite f zu finden ist, entsteht ein vergrößertes, virtuelles Bild auf der linken Seite (Abb. 2-1c).

Durch die drei Beispiele der Entstehung optischer Abbildungen kann die Bildentstehung im Strahlengang eines Lichtmikroskops annähernd beschrieben werden. Im Strahlengang eines Mikroskops wird das Bild von einem Objektiv in einem definierten Abstand vor dem Okular erzeugt. Dies geschieht ähnlich, wie im Beispiel mit der Sammellinse und dem Objekt, das außerhalb der einfachen Brennweite der gegebenen Linse anvisiert wird (Abb. 2-1a). Dieses Bild wird vom Okular des Mikroskops als virtuelles Bild nachvergrößert. Die Abbildung eines Gegenstandes kann von einem Objektiv auch ins Unendliche projiziert werden (Abb. 2-1b). Erst durch eine Tubulinse wird der Strahlengang umgelenkt und es entsteht ein reelles Bild, das vom Okular nachvergrößert wird. Diese Konzepte zur Realisierung der Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop stellen zwei technische Lösungen für den Aufbau der Strahlengänge dar, welche in Rahmen der sogenannten Endlich- und Unendlich-Optik beschrieben werden.

2.2.2 Mikroskope mit Endlich- und Unendlich-Optik, Abbildungsfehler

Mikroskope deren Strahlengang mit Endlich-Optik ausgestattet ist, sind meistens preisgünstige Mikroskope oder Forschungsmikroskope aus früheren Baujahren [4]. Dabei wird das erste Bild, das so genannte Zwischenbild, durch das Objektiv im Strahlengang des Mikroskops erzeugt (Abb. 2-2). Das Ergebnis ist ein reelles, umgekehrtes, vergrößertes Zwischenbild, das in eine Ebene vor dem Okular hinein projiziert wird [5]. Das Zwischenbild entsteht innerhalb der einfachen Brennweite des Okulars. So ergibt sich dank des Okulars ein virtuelles, vergrößertes Bild des Zwischenbildes. Im Gegensatz zum Beispiel mit der einfachen Linse wird das virtuelle Bild vom Okular im Unendlichen abgebildet. Die Augen können sich mühelos auf die Betrachtung des Bildes einstellen [6].

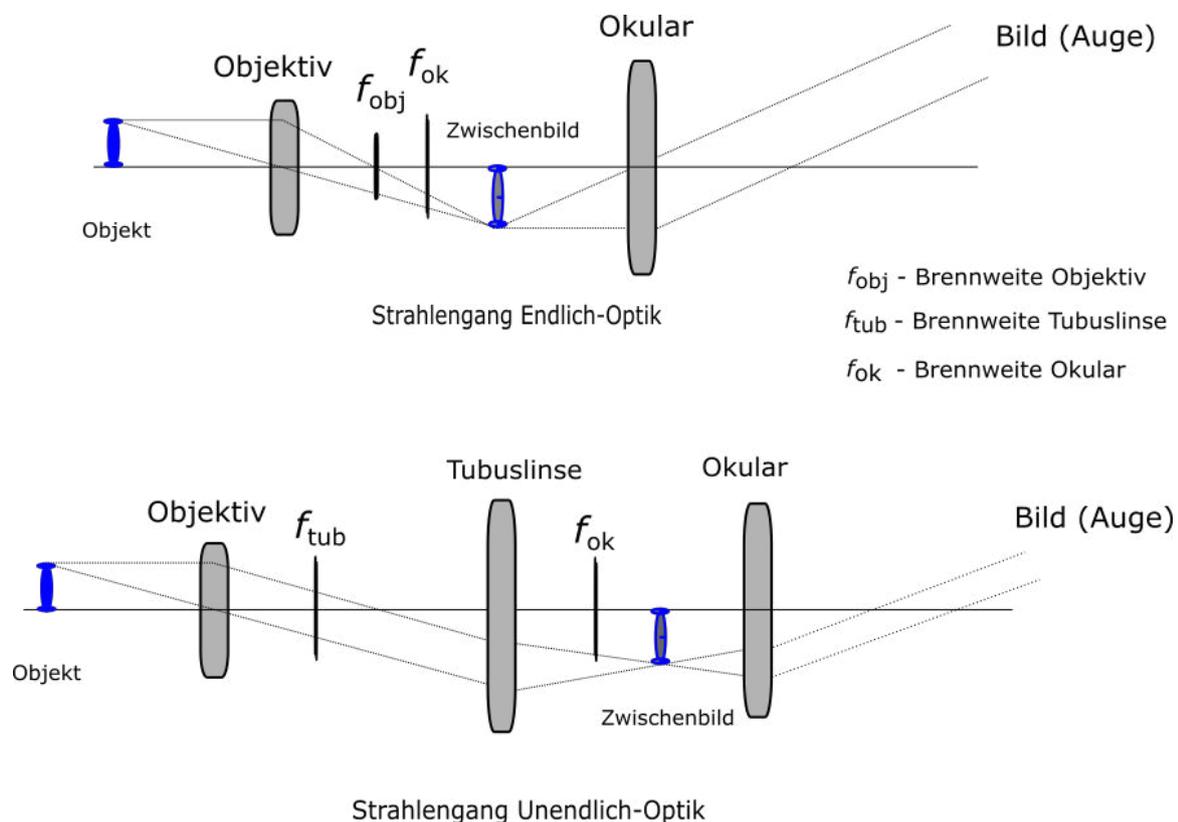


Abb. 2-2: Bildentstehung im Strahlengang eines Mikroskops.

Beispiel für Endlich-Optik (Strahlengang oben) und Unendlich-Optik (Strahlengang unten).

Die Objektive, die auf Unendlich-Optik abgestimmt sind, erzeugen im Gegensatz zu den Endlich-Objektiven kein Zwischenbild innerhalb der einfachen Brennweite des Okulars, sondern projizieren das Bild im Strahlengang des Mikroskops ins Unend-

liche (Abb. 2-1a). Die Strahlen, die einem Bildpunkt entstammen, verlaufen parallel zueinander und nicht zwingend parallel zur optischen Achse [7]. Sie erzeugen ein Bild in einer fokalen Ebene im Unendlichen [8]. Das Objektiv wirkt wie ein Kollimator, das einen parallelen Strahlengang erzeugt [9]. Das Bild für das Okular wird erst durch eine Linse, die Tubuslinse aufgebaut. Eine solche Konstruktion im Strahlengang verleiht dem Mikroskop mehr Flexibilität im Vergleich zu den Systemen mit Endlich-Optik. Der Abstand zwischen dem Objektiv und der Tubuslinse kann in gewissen Maßstäben verändert werden, ohne dass eine nennenswerte Verschlechterung des Bildes eintritt [10]. Dem Strahlengang können ohne aufwendige Umbaumaßnahmen weitere Elemente, wie z. B. Filter und Blenden zugefügt werden [11]. Mit der Unendlich-Optik ist es auch möglich eine Vergrößerung im Maßstab 1:1 zu realisieren [12]. Die Abstimmung der Brennweiten für Linsen, Okulare und die Abgleichlängen der Objektive, sowie die mechanische Tubuslänge sind nicht mehr normiert. Im Allgemeinen weist der optische Aufbau von Mikroskopen mit Unendlich-Optik verschiedener Hersteller stärkere Unterschiede auf, als dies bei Mikroskopen mit der Endlich-Optik der Fall ist [13].

Auf Grund der physikalischen Begebenheiten des Lichtes treten bei allen optischen Systemen Abbildungsfehler, die sogenannten Aberrationen auf [14; 15]. Sie beeinflussen die Qualität der endgültigen mikroskopischen Abbildung in Abhängigkeit von der Gestaltung des Strahlenganges. Die Korrekturen der Abbildungsfehler und die Optimierung der mikroskopischen Abbildung werden bei Mikroskopen auf verschiedenen Ebenen vollzogen. Die Linsen der Objektive werden aus verschiedenen Glasarten hergestellt und müssen mit höher Präzision geformt werden [16; 17]. Die Linsen für Objektive werden kombiniert und so geformt, dass sie z. B. monochromatische, chromatische und sphärische Aberrationen minimieren [18]. Für ein maximales Gesichtsfeld kann eine Feldlinse zwischen dem Objektiv und der Augenlinse des Okulars eingesetzt werden. Mit der Linse lassen sich die Strahlen, die das Zwischenbild generieren vollständig in Richtung des Mikroskopokulars einlenken. So kann mit dem Okular das maximale Potenzial bezüglich des vom Objektiv entworfenen Zwischenbildes erfasst werden [19]. Mit einem Okular können z. B. chromatische Vergrößerungsdifferenzen durch die Wahl spezieller Glassorten als Abbildungsfehler minimiert werden [20]. Bei den Mikroskopen mit der Unendlich-Optik kann dem Auftre-

ten der Abbildungsfehler auch durch Tubuslinse entgegen gewirkt werden [21]. Die Qualität einer mikroskopischen Abbildung hängt auch von der Beleuchtung, der Einstellung von Blenden und der Positionierung weiterer Elemente im Strahlengang des Mikroskops ab. Ein Mikroskop liefert eine hoch qualitative Abbildung deshalb nur dann, wenn alle Elemente im Strahlengang optimal aufeinander abgestimmt sind. Wird der Aufbau eines Mikroskops nur auf die wesentlichen optischen Elemente, wie z. B. Objektive reduziert, so sind Abbildungsfehler zu erwarten.

2.2.3 Mikroskopobjektive

Mit dem Blick auf das digitale Mikroskop wird das Objektiv zum zentralen Element im Aufbau des Messinstruments. Das Objektiv soll ein deutliches Bild von Zellen, nämlich ihrer Silhouetten liefern und eine möglichst große Anzahl von Zellen innerhalb eines Bildes darstellen können. Ein großes, nicht gewölbtes und gleichmäßiges Bild, das im Sichtfeld erscheint, soll mit dem Objektiv erzeugt werden [22]. Die Zellen sollen nicht detailliert abgebildet werden um eine bessere automatische Erkennung zu ermöglichen.

Bei den Anforderungen an die Qualität der mikroskopischen Abbildung sind Objektive zu wählen, die über eine kleine Vergrößerung bzw. einen kleinen Abbildungsmaßstab verfügen. Die Minimierung sphärischer Aberration und ein weitreichendes ebenes Bildfeld sind entscheidend für die Beurteilung der Größe und Form von Zellen. Deshalb sind planachromatische Objektive für die Konstruktion des Mikroskops vorzuziehen. Da die meisten Hersteller ihre gängigen Objektive für Mikroskope mit Unendlich-Optik produzieren, ist es von Vorteil die Objektive zu nutzen, die auf Unendlich abgestimmt sind. Die Objektive sind das Ergebnis moderner Berechnungs- und Herstellungsverfahren und sind an die hochauflösende Hellfeldmikroskopie angepasst. Zum Beispiel besitzt ein hochwertiges Objektiv mit der Bezeichnung Achromat eine gute Korrektur bezüglich chromatischer Aberrationen für zwei Wellenlängen [23]. Die Objektive mit Bezeichnung Plan oder UPL sorgen für ein weites, ebenes Bildfeld [24]. Wird ein digitales Mikroskop konstruiert, so ist es sinnvoll das Mikroskop für konstruktive Änderungen flexibel zu gestalten. Die Tubuslänge, die

den Abstand zwischen der Objektivanlagefläche und dem Detektor ausmacht, kann während der Entwicklungsphase verändert werden [25]. Bei einem Mikroskop, deren mechanische Tubuslänge, nämlich der Abstand zwischen Objektiv- und Okularanlagefläche auf eine Länge von 160 mm abgestimmt ist, sind die Objektive entsprechend angepasst und erzeugen das Zwischenbild 10 mm unterhalb des oberen Tubusrandes [4]. So können bereits bei kleinen Abstandsveränderungen die Abbildungsfehler zu groß werden. Mit einem Objektiv, das auf Unendlich abgestimmt ist, kann ein reelles Bild auch ohne Tubuslinse erzeugt werden. Die Funktion des Objektivs ist mit der Funktion eines Kollimators vergleichbar. Befindet sich das Objekt direkt im Bereich des Arbeitsabstandes vom Objektiv, entsteht ein Bild im Unendlichen (Abb. 2-1b). Vergrößert sich der Abstand zwischen dem Objekt und dem Objektiv, so wird ein Bild ähnlich einem Zwischenbild im Strahlengang eines Mikroskops mit Endlich-Optik entstehen (Abb. 2-1a). Ist die Qualität von mikroskopischen Abbildungen bei dem Objektiv ohne Tubuslinse nicht zufriedenstellend oder steigen die Anforderungen an das Mikroskop, kann gegebenenfalls eine Linse eingebaut werden um die Vorteile der Unendlich-Optik vollständig auszunutzen.

2.2.4 Übersicht der Mikroskope und Cell Counter

Die Entwicklung von optischen Überwachungssystemen, die auf mikroskopischer Technik basieren, hat für die Biotechnologie in den letzten Jahren eine Reihe von Geräten hervorgebracht, die sowohl im Laboralltag als auch in großen industriellen Maßstäben bei der Überwachung von Kultivierungsprozessen eingesetzt werden. Dabei stützen sich die Entwickler auf optisch basierte Zellzählung und bildbasierte Zytometrie [26; 27]. Die Zellen werden auf mikroskopischen Bildern festgehalten und anhand der Bilder bezüglich ihrer Anzahl, Morphologie und Größe analysiert [28]. Werden die Arbeitsvorgänge solcher Zellanalyse automatisiert, unter anderem die Bildverarbeitung und die Bewertung einzelner Zellen, entstehen Instrumente, die innerhalb weniger Sekunden große Mengen von Zellen analysieren. Mit diversen Ausführungen reicht das Spektrum solcher Geräte von automatischen Zellzählern für die Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße bis zu Systemen für fluoreszenz- und bildbasierte Durchflusszytometrie [29; 30; 31; 32].

Besonders zu erwähnen sind automatische Zellzähler, die sogenannten Cell Counter. In der folgenden Tabelle sind einige Modelle solcher Geräte und Daten zur technischen Spezifikation aufgeführt [33; 34; 35; 36; 37].

Tabelle 2-1: Übersicht automatischer Zellzähler.

Automatische Zellzähler	Anbieter	Spezifikation	Detektierbare Objekte, Größe [μm] Detektierbare Zellkonz., [Zellen/mL]
Countess II (FL)	ThermoFisher/ Invitrogen	Messung im Counting Slide, Fluoreszenz verfügbar	(7-60) (10^4 - 10^7)
Luna™ fl	Biozym	Messung im Counting Slide, Fluoreszenz verfügbar	(5-60) (10^4 - 10^7)
TC20™	Biorad	Messung im Counting Slide	(6-50) (5×10^4 - 10^7)
NucleoCounter NC-200™	ChemoMetec USA Inc.	Messung im Counting Slide mit Aufziehpipette, Fluoreszenz verfügbar	(3-60) (5×10^4 - 5×10^6)
CEDEX HiRes Analyzer	Roche	Messung in Durchflusszelle, Probenvolumen 300 μL	(2-40) (5×10^4 - 10^7)

Cell Counter bestimmen die Zellkonzentration in einem definierten Probenvolumen, das in die Kammern spezieller Objektträger, der Counting Slides eingeführt wird [38]. Eine Ausnahme in der oben aufgeführten Übersicht ist das CEDEX HiRes Analyzer, bei dem eine Probe mit einem Volumen von 300 μL durch die eigene und fest verbaute Messzelle geführt wird. Die Objektträger sind meistens aus Kunststoff gefertigt und besitzen zwei Kammern, für flüssige Proben (Abb. 2-3a). Die Tiefe der Kammern reicht je nach Ausführung von 70 bis 100 μm . Das Probenvolumen beträgt in der Regel 10–60 μL . Im Gegensatz zu den gebräuchlichen Hämozytometern und Zählkammern für manuelle Zählung besitzen die Kammern der Counting Slides keine orientierungsgebenden Zählgitter [39]. Befindet sich dieser Objektträger im automatischen Zellzähler, werden in Rahmen einer kurzen Messung digitale Bilder aufgenommen und ausgewertet. Neben der Zellkonzentration, Zellgröße und Morphologie kann die Konzentration lebender und toter Zellen durch Färbung mit Trypanblau ermittelt werden. Die Größe der detektierbaren Objekte bewegt sich im Bereich von 3-60 μm . Die Proben mit Zellkonzentrationen von 10^4 bis 10^7 Zellen/mL sind optimal für die Durchführung einer Messung.

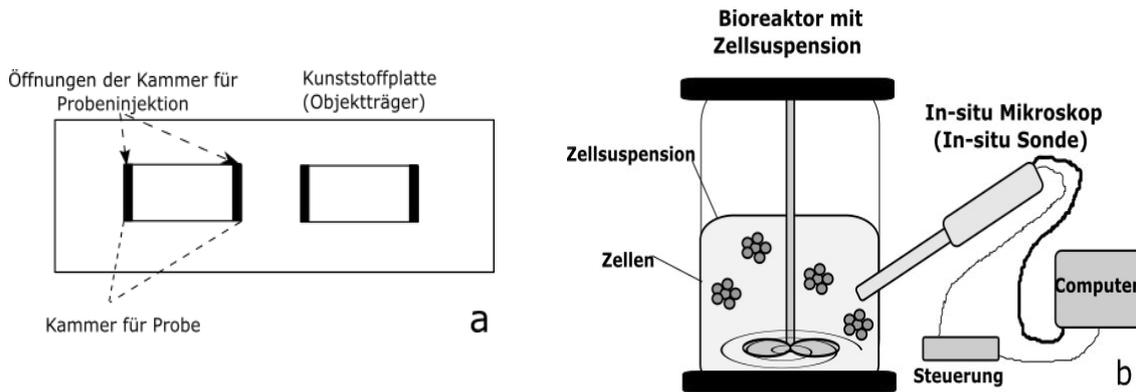


Abb. 2-3: Counting Slide und Funktionsprinzip eines In-situ Mikroskops.

a) Counting Slide für optisch basierte Zellzähler. b) In-situ Mikroskop bei der Überwachung von Zellen in einem Bioreaktor. Das Mikroskop wird über einen Port angeschlossen und erfasst Zellen in gerührter Zellsuspension.

Für den Einsatz in der biotechnologischen Industrie und der kontinuierlichen Überwachung von Bioprocessen wird am Institut für Technische Chemie in Hannover das In-situ Mikroskop stetig weiter entwickelt [40]. Dieses Lichtmikroskop wird als Sonde für die In-situ Beobachtung von Zellen in Bioreaktoren herangezogen (Abb. 2-3b). Verschiedene Prototypen und Modifikationen dieser Mikroskope konnten bislang erfolgreich bei der Überwachung von Bakterien, Hefen, tierischen Zellen und Algen sowie der Kristallbildung von pharmazeutischen Erzeugnissen eingesetzt werden [41; 42; 43; 44; 45; 46]. Die Funktion eines In-situ Mikroskops beruht auf der Anwendung von Durchlichtmikroskopie in einer geschlossenen, autoklavierbaren Ummantelung [47], (Anhang, Abb. 11-1). Das System verfügt über eine verlängerte Objektivfassung, die an einem Ende mit einer Digitalkamera und am anderen Ende mit Linsen ausgestattet ist. Dieses Objektiv wird in zwei metallische Rohre, das Innenrohr und das Außenrohr verpackt. Am Ort der Objektivlinse gibt es im unteren Segment des umgebenden Rohres ein Fenster. Dort bildet es in Kombination mit dem Außenrohr eine Messzone. Die Tiefe dieser Messzone kann durch motorisierte Mechanismen und Steuerung verkleinert oder vergrößert werden. Durch die Rührbewegung in einem Bioreaktor strömt die Zellsuspension in die Messzone ein. Die Zellen werden in Bewegung fotografisch erfasst und anschließend anhand des Bildmaterials analysiert.

Ähnliche Sonden werden auch an anderen Forschungseinrichtungen entwickelt und von kommerziellen Dienstleistern angeboten [48]. Ein Beispiel ist das In-situ Video

Microscope der Sequip S+E GmbH, das unter anderem für die Überwachung von Kristallisationsprozessen eingesetzt werden kann [49]. Eine Sonde zur Partikelmessung entwickelte auch die SOPAT GmbH [50]. Beide Systeme sind robuste optische Geräte für die Identifizierung und Bewertung kleiner Objekte in Suspensionen. Sie verfügen über fortgeschrittene Bildverarbeitungsprogramme, teils mit Echtzeitanalyse.

Mit In-situ Mikroskopen können Zellen, ihre Anzahl, Größe und Morphologie in einem Bioreaktor direkt beobachtet werden. Die Messung findet statt, wenn das Mikroskop in einen Reaktor eingeführt und Zellsuspension durch die rotierende Bewegung eines Reaktorührwerks am Objektiv vorbeigeführt wird. Auf diese Art und Weise kann die Beobachtung und Analyse von Zellen kontinuierlich durchgeführt werden. Mit dem in Rahmen dieser Arbeit entwickelten digitalen Mikroskop wird eine At-line Messung durchgeführt, die sich in ihrer Ausführungsweise an die manuelle Probenahme anlehnt [51]. Dabei wird eine Probe über technische Hilfsmittel und -einrichtungen, wie Schläuche und Probenkammern, dem Bioreaktor entnommen und zum analytischen Instrument geführt. Bei At-line Messungen werden die Proben eines definierten Volumens überwiegend automatisch aber auch manuell dem analytischen Instrument zugeführt. Für das digitale Mikroskop werden die Proben über ein Durchflusssystem zum Ort der Messung geführt [52]. Die Zellen in der Zellsuspension werden somit diskontinuierlich beobachtet.

Die Vorteile eines In-situ Mikroskops überwiegen, wenn ein Bioreaktor mit entsprechenden Anschlussmöglichkeiten und einer technischen Vorrichtung für Thermostatisierung ausgestattet ist. Ein großes Volumen an Zellsuspension und die Druckverhältnisse, die bei einer Kultivierung in großem Maßstab vorliegen, sprechen auch für den Einsatz einer robusten und autoklavierbaren In-Situ Sonde. Die Vorteile eines At-line Mikroskops ergeben sich aus seiner hohen konstruktiven Flexibilität. Es kann leicht von Ort zu Ort überführt und als Modul in einem mehrstufigen analytischen Instruments eingesetzt werden. Die Wartung und Optimierung von At-line Mikroskopen ist einfacher zu bewerkstelligen. Beide Mikroskope detektieren Objekte und erfassen optische Beschaffenheit, wie die Form und das Erscheinungsbild des vorgegebenen Objekts. Ändern sich diese Beschaffenheit mit fortschreitendem Verlauf der

Kultivierung, können die Änderungen den Wachstumsphase von Zellen zugeordnet werden. Mit solchen Informationen können z. B. die Viabilität und das Absterben der Zellen registriert werden. Die folgende Tabelle gewährt eine Übersicht über einige technische Vorteile und Nachteile beider Überwachungssysteme (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Vorteile und Nachteile von In-situ und At-line Mikroskopen.

In-situ Mikroskop (Vorteile)	Digitales Mikroskop, At-line Messung (Vorteile)
Kontinuierliche Überwachung der Zellen	Diskontinuierliche Überwachung der Zellen
Robuste Konstruktion, sterilisierbar	Flexibilität bei konstruktiver Auslegung, Verwendung gewöhnlicher kommerzieller Mikroskope ist möglich
Viel Bildmaterial und große Datenmengen verfügbar, sehr genaue Auswertung möglich	Viel Bildmaterial und große Datenmengen aus Analyse einzelner Proben verfügbar
	Reinigung und Wartung im Prozess möglich
	Einsatz von Farbstoffen möglich
	Mikroskop-Einsatz ist unabhängig von der Bauart des Reaktors
In-situ Mikroskopie (Nachteile)	Digitales Mikroskop, At-line Messung (Nachteile)
Spezieller Anschluss (Port) am Bioreaktor erforderlich	Durchfluss- und Probenahmesystem erforderlich
Stark wärmeleitend durch die Begebenheit der Konstruktion (Edelstahl)	Synchronisierung der Analytik mit der Probenahme, präzise Steuerung notwendig
Wartung und Reinigung im Prozess nur eingeschränkt möglich	Führt zur Reduktion des Volumens von Zellsuspension in Bioreaktor durch ständige Probenahme

2.3 Durchflusssysteme

Eine große Herausforderung im Projekt ist nicht nur der Mikroskopaufbau, sondern auch die Wahl eines passenden Durchflusselements bzw. einer Durchflusszelle, die das Mikroskopieren im Durchfluss ermöglicht und eine beträchtliche Menge an Zellsuspension durchsetzen kann. Die Wahl der Pumpen, Ventile und Verbindungen und eine technische Lösung für die Probenahme können großen Einfluss auf das Ergebnis der automatischen Zellzählung während einer laufenden Kultivierung haben.

2.3.1 Durchflusssysteme und Pumpe

Die Durchflusssysteme für die Unterstützung der bildgebenden Überwachung und Probenahme basieren auf zwei Kernkomponenten:

- Durchflussszelle μ Slide Ibidi (Abb. 2-4a)
- Piezoelektrische Pumpen Bartels (Abb. 2-4b)

Dies sind kompakte Bauelemente mit mikroskopischen Räumen und Durchflusskanälen, die den Aufbau kompakter Durchflusssysteme ermöglichen. Sie bieten Anschlüsse für Schläuche, Ventile, Sterilitäts- und Mischkammer und können in Rahmen eines Durchflusssystems beliebig miteinander kombiniert werden.

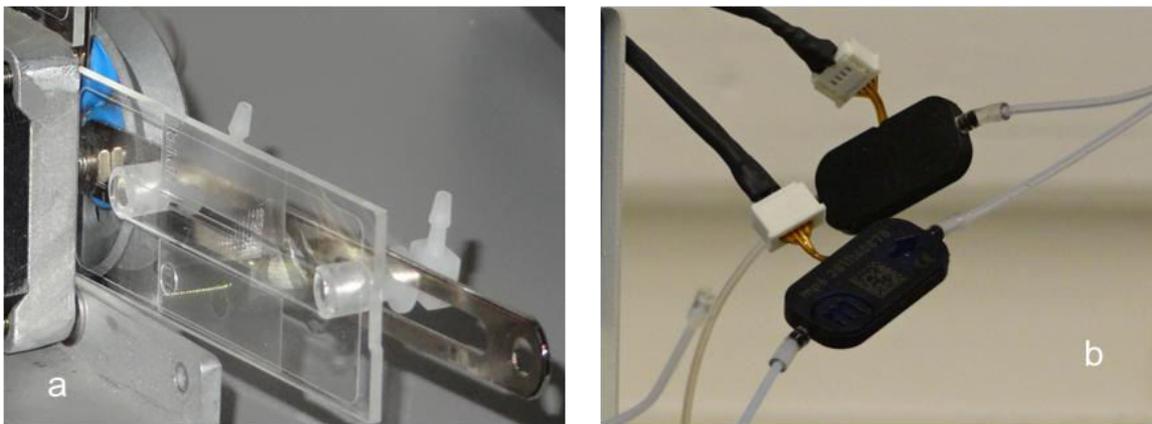


Abb. 2-4: Wichtige Bauelemente von Durchflusssystemen.

a) Durchflussszelle Ibidi μ Slide. b) Piezoelektrische Pumpen (Bartels GmbH).

Die Durchflussszellen μ Slide I Luer der Ibidi GmbH sind mikroskopische Träger in deren Mitte sich ein Kanal befindet [53]. Der Kanal besitzt einen rechteckigen Querschnitt und Abmessungen von 50x5 mm. Seine Tiefe beträgt in den Standardausführungen 100 μ m, 200 μ m, 400 μ m, 600 μ m oder 800 μ m [54]. Auf beiden Seiten sind bei dem Kanal runde Anschlüsse zu finden. Ursprünglich sind die Kammern für die Kultivierung von Zellen im Kleinvolumen und unter Einwirkung von Strömungskräften entwickelt worden. Die Kammern bestehen aus einem Polyethylen-Derivat, das für Beobachtung und Beurteilung von Zellen mit Licht- und Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist. Wird eine Flüssigkeit durch den Kanal gepumpt, bildet sich laminare Strömung aus [55]. Bei dem Übergang von den runden Anschlüssen zum rechteckigen Kanal findet eine wesentliche Änderung statt. Die Strömung wird aus einem

runden und breiten Anschluss in einen rechteckigen Kanal mit einem kleinen hydraulischen Durchmesser von 0,196 mm gepumpt [56]. Es baut sich ein Widerstand auf, der bei geringen Volumenströmen noch zu keiner nennenswerten Belastung der Apparatur führt [57]. Er hat eine positive Auswirkung auf die Verteilung der Zellen im rechteckigen Kanal. Wird die Zellsuspension aus einem dünnen Schlauch in den Kanal gepumpt, verteilen sich die Zellen im Kanalansatz gleichmäßig und werden so über die gesamte Kanalbreite geführt. Dies ist sehr wichtig, denn das sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen vor dem Objektiv des Mikroskops.

Die Pumpe mp6 von Bartels GmbH pumpt Flüssigkeiten dank zweier integrierter piezoelektrischer Elemente, die in einem Gehäuse mit den Abmessungen 30x15 mm untergebracht sind [58]. Die piezoelektrischen Elemente befinden sich in separaten Kammern welche durch Klappen voneinander getrennt sind. Die Klappen fungieren als Ventile. Sie versperren und öffnen den Strömungsweg. Beim Anlegen elektrischer Spannung werden die piezoelektrischen Elemente angeregt und die anliegenden Membranen führen Pumpbewegungen im Gegenteil aus. Durch die Klappen, die sich in Abhängigkeit von der Schubrichtung abwechselnd verschließen und öffnen, wird der Weg für die Flüssigkeit in eine Richtung vorgegeben. Die Pumpe wird an eine Steuerungseinheit angeschlossen. Sie ist ein Funktionsgenerator und Verstärker, mit dem an den elektrischen Anschlüssen der Pumpe Spannung angelegt wird. Mit periodischen Signalen aus dem Funktionsgenerator wird eine Pumpbewegung hervorgerufen. Im Einklang mit dem Signal können die Pumpgeschwindigkeit und die Art des Anschlages für die Membranen reguliert werden. Der Generator verfügt über RS 232-Schnittstelle und kann mit einem externen Programm angesteuert werden. Da die Pumpe mit dem Generator durch ein Kabel verbunden ist, kann sie vom Generator räumlich getrennt werden. Dabei kann die Länge des Kabels theoretisch beliebig groß sein. Dies ist vorteilhaft, wenn der Generator aus Platzgründen oder aufgrund von Umgebungsbedingungen, wie z. B. hoher Temperatur oder Luftfeuchtigkeit, nicht in einem Raum mit der Pumpe funktionieren kann. Nachteilig ist der direkte Kontakt der Pumpenmembranen und der Klappen mit den Zellen in Suspension. So kann die Sterilität der Probe nicht gewahrt werden. Durch die Bewegung der Membranen wird die Zellsuspension durch enge Räume zwischen den Kammern gepresst. Dabei entstehen große Reibungs- und Scherkräfte, welche die Zellen beschädigen können. Die

Pumpe ist auch nur bedingt resistent gegen den ansteigenden hydrostatischen Druck, was dazu führen kann, dass die Flüssigkeit frei austropft [59].

Neben den oben aufgeführten Elementen werden im Aufbau auch Quetschventile eingesetzt [60]. Sie eignen sich für das Absperrn von Leitungen, welche sterile Flüssigkeiten durchleiten. Mit industriegerechten pneumatischen und mechanischen Quetschventilen ist das Absperrn von Leitungen aus festen und flexiblen Materialein möglich. Solche Ventile besitzen ein Gehäuse in dem flexible Manschetten untergebracht sind. Durch Luftdruck oder Quetschmechanik werden die Manschetten verformt und versperren die Leitung [61]. Ist der Querschnitt einer Leitung klein und ist der Schlauch aus elastischem Material gefertigt, kann er durch leichte mechanische Einwirkung zweier Platten abgeklemmt werden. Die Sterilität der Zellsuspension bleibt innerhalb des Schlauches gewahrt [62].

Zur Einbindung einzelner Elemente in ein Durchflusssystem werden Schläuche aus autoklavierbaren Materialien eingesetzt. Um das Totvolumen der Durchflusssysteme und das Probenvolumen gering zu halten, werden Schläuche mit kleinem Durchmesser verwendet. Da die Durchflusszellen und Pumpen sowie auch die Ventile nur kleines bzw. kein Totvolumen in Durchflusssystemen erzeugen, reicht bereits ein kleines Probenvolumen aus, um die Zellen in Suspension zu bewerten. Somit können kleine Kultivierungen tierischer Zellen in Schüttelkolben ohne große Beeinträchtigung und den Verlust von Zellsuspension überwacht werden. Es bieten sich auch wenige Räume innerhalb der Durchflusssysteme an, wo sich die Zellen nach dem Durchfluss der Zellsuspension absetzen können. Der Aufwand für Reinigung der Durchflusssysteme sinkt.

2.3.2 Automatisierte Probenahme und Probenbereitstellung

Für automatisierte Überwachung tierischer Zellen, die über mehrere Tage in einem Bioreaktor oder Schüttelkolben wachsen, kann eine automatisierte Probenahme oder ein Gerät für die Probenbereitstellung große Vorteile mit sich bringen. Verfügt das digitale Mikroskop über einen Sampler, der Proben in großen Mengen bereitstellen kann, wird die Effektivität der Messungen in der Erprobungsphase des digitalen

Mikroskops erheblich gesteigert. Einige moderne Zellzähler sind mit Samplern ausgestattet [63]. Auch das Durchflusssystem mit dem digitalen Mikroskop wird durch einen Sampler erweitert, um manuell entnommene Proben auf dem Sampler bereit zu stellen und dann in einem geschlossenen Messvorgang mit dem Mikroskop zu analysieren.

Bei der Probenahme aus einem laufenden Kultivierungsprozess, z. B. aus einem Schüttelkolben, ist es entscheidend, die Sterilität zu garantieren. Gelangen Keime aus der Leitung des Probenflusses in das Kultivierungsmedium, breiten sie sich im Kolben aus und nehmen Einfluss auf die Kultivierung oder schädigen die Zellen. Klassische sterile Probenahme, bei der Zwischenkammern mit Filtern, Ventilen und Pumpen eingesetzt werden, ist manuell relativ leicht zu bewältigen [64]. Soll dieser Prozess jedoch automatisiert werden, ist der Aufwand relativ groß. Insbesondere bei kleinen Kultivierungsansätzen zahlt sich die Technik nicht aus. Eine Lösung für das Problem kann die Unterbrechung des Flüssigkeitsstandes in den Probenschläuchen durch eine luftgefüllte Kammer sein. Dafür wird in der Leitung zwischen einem Schüttelkolben oder Bioreaktor und der Durchflusszelle eine Tropfkammer eingebaut. Sie ist luftgefüllt und von der äußeren Umgebung isoliert. Zieht die Pumpe Flüssigkeit in die Durchflusszelle, wird die Zellsuspension aus dem Kultivierungsmedium nachgezogen. In der Kammer tropft sie von oben nach unten der Strömungsrichtung nach und überwindet so den luftleeren Raum. Die Flüssigkeit am unteren Ende der Tropfkammer ist somit vom Kultivierungsmedium getrennt und die Zellsuspension im Durchflusssystem oberhalb der Tropfkammer bleibt steril. Wird zwischen der Durchflusszelle und der Tropfkammer noch ein Quetschventil eingebaut, kann der Rückfluss in die Tropfkammer vollkommen ausgeschlossen werden. So ist ein sicheres Kultivieren auch ohne eine Zugabe von Antibiotika möglich. Ähnliche Kammern werden vor allem in der Medizin eingesetzt um Infusionen ohne Luftblasen zu verabreichen [65].

2.4 Bildaufzeichnung und Bildverarbeitung

Die Kamera und die Software zur Steuerung der Bildaufzeichnung sowie der Bildverarbeitung sind mit Sicherheit das Herzstück des digitalen Mikroskops. Sie machen die Zellen in einer Probe sichtbar für das Auge und generieren Datensätze mit denen die Eigenschaften tausender Zellen auswertbar werden.

2.4.1 Digitalkameras und Software

Moderne Digitalkameras sind allgegenwärtig. Sie sind für die Dokumentierung und Erzeugung von digitalen Bildern in verschiedensten Bereichen der Industrie, Medizin und Forschung unverzichtbar geworden [66]. Auf dem Markt sind sie in verschiedensten Ausführungen verfügbar. Deswegen müssen relativ einfache Kriterien herausgearbeitet werden, um die richtige Kamera für das digitale Mikroskop auszuwählen. Ein wichtiges Kriterium ist eine kompakte Bauart der Kamera. Sind die Abmessungen der Kamera klein, kann damit ein eleganter und kompakter Aufbau des Mikroskops gelingen. Der optische Anschluss der Kamera sollte einem Standard folgen, welcher die Kamera ohne großen Aufwand mit einem Standardadapter an ein gewöhnliches Lichtmikroskop anschließen lässt. Solch ein Anschluss ist der Standard C-mount. Es sollte auch die Eignung der Kamera für den Einsatz unter erschwerten Umgebungsbedingungen berücksichtigt werden. Bei einigen Experimenten herrschen Umgebungstemperaturen von bis zu 37°C, hohe Luftfeuchtigkeit und ein hoher Gehalt an Kohlenstoffdioxid in der Luft. Gelöst in Flüssigkeit, z. B. im Kondenswasser, kann Kohlenstoffdioxid Säure bilden. Deswegen sollte die Kamera robust und geschlossen gebaut und der CCD-Chip der Kamera gut geschützt sein. Da für die Auswertung viele Bilder in einem Zeitabstand von etwa 0,3-0,5 Sekunden generiert werden, sollte die Kamera beim Auslesen des CCD-Chips in voller Auflösung und Übertragung der Daten an den Rechner entsprechend schnell sein. Mit etwa 7,3 fps und einer Schnittstelle USB 2.0 mit einer Übertragungsrates von 480 Mbit/s ist so ein Vorhaben realisierbar [67]. Ein weiteres Kriterium für die Eignung einer Kamera ist auch, dass geeignete Bibliotheken mit Funktionen für die gewünschte Programmiersprache und Beispiele für die einzelnen Funktionen dieser Bibliotheken vorhanden sind. So kann

eine ausgereifte Software für die Ansteuerung der Kamera und Bildaufnahme entwickelt werden.

Für die Bewältigung der Steuerungsaufgaben sowie für die Aufnahme und Analyse von Bildsequenzen werden drei Programme verwendet, die am Institut für Technische Chemie entwickelt worden sind. Die Kontrolle über Digitalkameras ermöglicht das Steuerungsprogramm In-situ Control. Die Bildsequenzen, die mit dem Programm aufgenommen worden sind, werden zur Analyse einem Bildverarbeitungsprogramm, dem Graphic Analyzer zugeführt und ausgewertet. Mit dem Programm FIA-Master kann die Arbeit von Pumpen und Ventilen in einem Durchflusssystem kontrolliert werden. Über das Programm kann auch auf einige Funktionen von In-situ Control zugegriffen werden (Kap. 2.4.2).

2.4.2 Steuerungsprogramm In-situ Control

Das Steuerungsprogramm In-situ Control (Version 1.0.1 modified) ermöglicht den Zugriff auf die Digitalkamera via USB-Schnittstelle. Zusätzlich bietet das Programm eine Regelung für die Beleuchtungsintensität einer Lampe oder einer LED an. Diese Funktionen sind im Steuerungsuntermenü über Regler zugänglich, die mit einem minimalen und einem maximalen Wert nach unten und nach oben begrenzt sind und nicht weiter verschoben werden können (Abb. 2-5). Die Kamera und die Beleuchtungseinheit müssen nicht unbedingt gleichzeitig angeschlossen sein. Das Programm toleriert das Fehlen eines der beiden Geräte. Über das Befehlsmenü wird die Kamera mit dem Programm verbunden um ein Bild in Echtzeit von der Kamera zu übertragen. Im Sequenz-Untermenü können Einstellungen für die Aufzeichnung der Aufnahme-sequenz, die Gesamtanzahl der Aufnahmen, die Anzahl der Aufnahmezyklen und der zeitliche Abstand zwischen ihnen eingegeben werden. Zusätzlich wird ein Pfad für den Zielordner eingegeben, in dem alle Bilder mit Unterordnern abgespeichert werden.

Nach funktionaler Optimierung im Projekt besitzt das Programm In-situ Control eine Erweiterung, die den Aufbau einer Kommunikationsbrücke zwischen dem Programm und einer übergeordneten Steuerungssoftware ermöglicht. Über einen virtuellen

COM-Port können Befehle an In-situ Control gesendet werden um die Funktionen wie Start, Stop und Pause in der Aufnahmesequenz zu betätigen. Auch der Wechsel zu einem neuen Unterordner für die Abspeicherung der Bilder ist möglich. Auf diese Art und Weise kann dem Programm eine Befehlskette übermittelt werden, welche die obengenannten Funktionen zum beliebigen Zeitpunkt auslöst. Dadurch wird das In-situ Control in seiner Funktion mit den Ventilen und Pumpen eines Durchflusssystems synchronisiert.



Abb. 2-5: Grafische Benutzeroberfläche In-situ Control.

2.4.3 Bildverarbeitungsprogramm Graphic Analyzer

Mit dem Programm Graphic Analyzer (Version 3.0.3 modified) können die Bildsequenzen, die mit In-situ Control generiert worden sind, ausgewertet werden. Es ist ein Bildverarbeitungsprogramm, mit dessen Hilfe einzelne Zellen und Agglomerate in einem Bild identifiziert werden können. Den erkannten Zellobjekten können durch bildtechnische Verarbeitung Daten entnommen werden, welche zur Bestimmung der Anzahl von Zellen, ihrer Größe und Morphologie sowie der Viabilität genutzt werden. Das Programm kann wahlweise für die Analyse einzelner Aufnahmen oder großer Bilddatensätze eingesetzt werden. Die Basis für die Auswertung der Graustufenbilder bildet der Algorithmus *Life And Death* [68].

Bei diesem Algorithmus wird zunächst eine Kontrastverbesserung der Bilder durchgeführt [69; 70]. Die Verteilung der Grauwerte im Histogramm eines Bildes wird verändert um die Kanten von Zellen hervorzuheben. Diese Operation gehört nicht zum festen Baustein des Algorithmus und kann im Menü des Programms ein- und ausgeschaltet werden.

In einem zweiten Schritt werden die Kanten der Zellen erkannt. Dabei werden die Bildpixel auf Helligkeitsunterschiede geprüft. Sind die benachbarten Pixel unterschiedlich hell und lassen sich diese Unterschiede entlang einer zusammenhängenden Pixelreihe nachweisen, entspricht das dem Ort im Bild, wo eine Kante zu finden sein könnte. Mit dem *Canny*-Detektor werden solche Strukturen in Bildern identifiziert [71]. Um die fehlerhafte Detektion in stark verrauschten Bildern zu vermeiden, passiert das Bild zunächst einen Glättungsfilter mit Gauss'schem Kern. Der Kern ist eine Matrix, deren Werte sich von der Gauss'schen Dichtefunktion ableiten lassen [72]. Die Matrix wird auf das Bild angewendet um neue Grauwerte einzelner Bildpixel zu berechnen. Wie groß oder klein die Werte ausfallen, hängt von den Grauwerten der benachbarten Pixel und der Werten der Matrix ab. Da sich die Matrix aus Gauss'schem Kern zusammensetzt, nimmt die Größe der gewählten Standardabweichung Einfluss auf die Helligkeit der Bildpixel. Je größer die Standardabweichung ist, umso stärker ist der Glättungseffekt.

Das geglättete Bild wird im zweiten Schritt mit einer Faltungsmatrix für Kantendetektion bearbeitet. Eine Kante wird durch Gradienten kenntlich gemacht und setzt sich aus Punkten zusammen, die in Richtung des Gradienten das größte Gefälle markieren. Es entsteht ein Bild mit Kanten. Sie werden mittels Linienverfolgung und Hysterese geprüft um die Kanten zu unterdrücken, die durch Rauschen im Bild noch bestehen könnten. Kanten, bei denen mindestens ein Pixelwert einen vorgegebenen oberen Schwellenwert übersteigt, werden aufgebaut. Die Hysterese setzt an und sichert das Bestehen der Kanten, wenn deren Pixelwerte einen bestimmten unteren Schwellenwert überstiegen [73].

Das Bild mit Kanten wird binärisiert. Dabei werden die Kanten weiß abgebildet und der Hintergrund wird schwarz. Diejenigen Kanten, die eine geschlossene Form bilden, werden einer Zelle zugewiesen und als der Zelle zugehörig festgehalten. Die Kanten,

die keine vollständig geschlossene Umrissse von Zellen zeigen, werden in Zellobjekte zusammenhängend geschossen. Um geschlossene Umrissse von Zellen zu produzieren, werden die Lücken zwischen einzelnen Kanten im Binärbild durch die Anwendung morphologischer Filter geschlossen. Die Methode *Closing* vereint in sich zwei Operationen, *Dilatation* und *Erosion* [74]. Sie werden nacheinander auf das Binärbild angewendet. Durch *Dilatation* werden ausgehend von einer Kante mit einem vordefinierten Strukturelement Pixel von schwarz zu weiß gesetzt. Die Kante wird aufgebaut. Da sie sich aber in verschiedene Richtungen ausbreitet, entstehen auch überflüssige Pixel an den Umrissen der Zelle. Mit der Operation *Erosion* werden die überflüssigen Pixel wieder gelöscht. Die geschlossenen Umrissse im Bild markieren Flächen, welche Zellen zugeordnet werden. Entsprechen die eingegrenzten Flächen in ihrer Größe und Form den festgelegten Maßen im Graphic Analyzer, werden sie vom Programm abgespeichert. Die übrigen Objekte werden vom Programm verworfen.

Das Programm verfügt über Regler zur Eingabe und Anpassung von Parametern, welche für die Ausführung von oben erwähnten Operationen notwendig sind (Anhang, Abb. 11-3). Über die Regler erfolgt die Einstellung von Grenzwerten und des Sigma-Wertes für den *Canny*-Kantendetektor. Zusätzlich können die Grenzwerte für die maximale und minimale Größe der zu detektierenden Zellen eingegeben werden. Weitere Regler beeinflussen die Schwellenwerte der Filter, welche über den mittleren Grauwert, die Exzentrizität und die Entropie die Erkennung unerwünschter Objekte einschränken.

Als Ergebnis der Bildsequenzanalyse erhält der Nutzer ein Datenblatt mit erkannten Zellen, die dem jeweiligen Bild zugeordnet sind. Jeder Zelle sind Information über ihre Fläche in Bildpixel und ihre Morphologie mit Werten der Exzentrizität und Kompaktheit zugeordnet. Weitere Angaben betreffen die Grauwert-Eigenschaften von abgebildeten Zellen. Das sind die mittleren Grauwerte, die positionsabhängige Mittelwerte der horizontalen und der vertikalen Intensität sowie die Entropie. Im Folgenden werden die einzelnen Zahlenwerte der Tabellenausgabe von Graphic Analyzer erläutert (siehe Anhang, Abb. 11-5).

- Die Anzahl von detektierten Zellen ergibt sich aus der Menge der einzelnen Objekte, die im Datenblatt einem Bild zugeordnet werden können.
- Die Größe der Zellobjekte lässt sich aus der Fläche berechnen, die vom jeweiligen Zellobjekt im Bild umschlossen wird. Sind die Vergrößerung oder Abbildungsmaßstäbe bekannt, kann die Größe von Objekten in Mikrometern berechnet werden.
- Die Kompaktheit K stellt ein Maß für die Rundheit der Zellobjekte dar.

$$K = \frac{U^2}{4\pi A} \quad (1)$$

U ist der Umfang des Objekts und A ist der Flächeninhalt. Ein ideal rundes Objekt hat eine Kompaktheit von 1. Die Kompaktheit steigt, wenn die Form eines Objektes von der Form eines Kreises abweicht [75].

- Die Exzentrizität E wird für die Beurteilung der Form erkannter Zellobjekte eingesetzt. Sie ist der Quotient aus dem maximalen polaren Abstand $polMax$ und dem minimalen polaren Abstand $polMin$. Die polaren Abstände eines Objekts sind die euklidischen Distanzen zwischen dem Mittelpunkt des Objekts und allen Randpixeln.

$$E = \frac{polMax}{polMin} \quad (2)$$

Hohe Exzentrizität weist auf eine ovale Form des Zellobjekts hin. Ein rundes Objekt hat eine Exzentrizität von 1 [76].

- Der mittlere Grauwert M_G kennzeichnet die Position im Histogramm eines Bildes, die dem mittleren Helligkeitswert aller im Bild vorkommenden Grautöne entspricht. Anhand des Wertes kann die Helligkeit einzelner Zellobjekte bestimmt werden. Auf dieser Grundlage kann die Unterscheidung von hellen und dunklen Objekten stattfinden. Der Wert kann bei der Schätzung der Zellviabilität, z. B. bei Färbung mit Trypanblau oder Methylblau eingesetzt werden [77].
- Die richtungsabhängigen Mittelwerte der Intensität, und zwar der Wert der vertikalen Intensität P_V und der Wert der horizontalen Intensität P_H repräsentieren

tieren die Position vom jeweiligen Mittelwert im Intensitätsprofil des gegebenen Objektes [78]. Die Profile beschreiben Intensitätsverläufe in einem Graustufenbild in Abhängigkeit von der Position der Pixel und werden entlang der horizontalen und vertikalen Achsen des Bildes erstellt. Ist z. B. ein rundes Objekt dunkel am Rand und hell im Inneren, wird ein Wert angezeigt, der dem Radius dieses Objekts entspricht. Diese Kennwerte können zur Identifizierung der Ausrichtung von Zellobjekten herangezogen werden.

- Die Entropie H ist ein Maß für den Informationsgehalt eines Bildes und hängt von der relativen Häufigkeit der Grautöne ab, die im Bild zu finden sind. Ein monotonen Bild besitzt niedrige Entropie. Die Entropie steigt wenn das Spektrum der Grautöne größer wird [79]. Mit einem Entropie-Filter können Zellobjekte nach Graustufen unterschieden werden. Diese Filterung kann z. B. zur Unterdrückung unerwünschter Objekte, z. B. der Verunreinigungen im Bild, eingesetzt werden.

2.4.4 Zusätzliche Bildverarbeitungsoperationen

Vor der Durchführung der Zelldetektion mit dem Graphic Analyzer ist es in manchen Fällen notwendig die Bilder für die Auswertung vorzubereiten. Dabei können unter anderem die Stärken anderer Bildverarbeitungsprogramme, wie z. B. ImageJ oder GIMP in Anspruch ausgenutzt werden [80; 81]. Mit den Programmen werden die Bilder einheitlich verändert um unerwünschte Effekte bei der Objekterkennung zu minimieren oder zu vermeiden. Dabei ist nicht immer vorauszusetzen, dass die optische Ästhetik und Qualität der Bilder zunimmt.

Einen Ansatzpunkt für die Optimierung der Objekterkennung bieten die Helligkeit- und Kontrasteinstellungen, die Kontrastspreizung und Normalisierung. Durch die Erhöhung der Helligkeit und die Herabsetzung des Kontrastes können unerwünschte Objekte, z. B. lysierte Zellen in einem Bild unterdrückt werden. Bei der Erhöhung der Helligkeit wird der Hintergrund im Bild verstärkt. Mit dieser Operation werden die Kanten von unerwünschten Objekten unterdrückt. Die lebenden Zellen, die eine kontrastreiche Kantenlinie besitzen, bleiben erkennbar und können detektiert wer-

den. Eine weitere Möglichkeit zur Eliminierung unerwünschter Objekterkennung bietet das Weichzeichnen [82]. Über diese Operation im Graphic Analyzer findet eine Glättung der Bilder statt. Innerhalb eines definierten Fensterabstandes werden alle Pixel in ihren Grauwerten mit Hilfe einer vordefinierten Matrize an den festgesetzten Pixelwert angeglichen. Auf diese Art und Weise werden extreme Grauwerte eliminiert. Dadurch können zwei nebeneinander stehende Zellen als geschlossenes Zellobjekt erkannt und vorteilhafter beurteilt werden. Das Weichzeichnen kann auch anders genutzt werden, z. B. bei der Analyse der Aufnahmen mit sehr hohen Zellkonzentrationen. In solchen Bildern sind mehrere Zellobjekte vorhanden, deren äußere Kanten miteinander in enger Verbindung stehen und somit beim gewöhnlichen Auswerten durch die Kantenerkennung als geschlossene Objekte wiedergegeben werden. Das Weichzeichnen ermöglicht die Herabsetzung der äußeren Kanten der Zellen und die Verschiebung der Kantenerkennung in das Innere des Zellobjektes. Dadurch können Zellagglomerate gut aufgelöst und die tatsächliche Anzahl der Zellobjekte im Bild kann bestimmt werden. Eine besondere Form des Glättens ist die anisotrope Diffusion [83]. Dieses Verfahren ermöglicht ein gewichtetes Glätten der Grauwerte ohne eine wesentliche Unterdrückung von Kanten. Dabei wird das Bild in mehreren Schritten in Richtung der Kanten und nicht senkrecht zu ihnen geglättet [84]. Aufgrund seiner Struktur ist das Verfahren zeitaufwendig, liefert aber ein Ergebnis mit reduziertem Rauschen und hervorgehobenen Kanten. Das Bild dient als Vorlage für die Kantenerkennung.

Ein weiteres Verfahren zur Verbesserung der Analysepräzision stellt die Erzeugung eines normierten Hintergrundes dar, der für die ganze Bildsequenz einheitlich erzeugt wird [85]. Dabei wird eine Bildaufnahme, welche den reinen Hintergrund der Messzone mit den eventuell vorhandenen Verunreinigungen repräsentiert, als Schablone für den Hintergrund genutzt. Der Hintergrund wird vollständig von den anderen Bildern abgezogen. Es verbleibt ein Bild mit Zellobjekten, die in der Schablone nicht vorhanden gewesen sind. Der Hintergrund des Bildes wird auf einen konstanten Grauwert normiert. Durch diese Technik können Zellen selbst bei starken, systematisch vorkommenden Verunreinigungen in der Durchflusszelle erkannt werden.

Ein Aspekt bei der Zelldetektion ist die Beurteilung von Agglomeraten. Die Agglomerate können zwei oder mehr Zellen enthalten, die unterschiedlich groß sein können. Sie können auch innerhalb des Agglomerats auf diverse Art und Weise angeordnet sein. Sie treten meistens dann in signifikanten Mengen auf, wenn ein Kultivierungsprozess weit fortgeschritten ist und sich große Zellmengen im Kultivierungsmedium befinden. Ähnliche Verhältnisse können auch bei der Überwachung spezieller Kultivierungsprozesse vorkommen, wie z. B. bei Kultivierung synchronisierter Zellen [86]. Die Agglomerate können ihrerseits innerhalb eines Bildes unterschiedlich ausgerichtet sein. Bei der Auswertung werden solche Agglomerate als ein einziges Zellobjekt gewertet. Durch die Gegenüberstellung der Größe und der Form erkannter Agglomerate kann die Anzahl einzelner Zellen im Agglomerat geschätzt werden. Die Methode setzt allerdings das Wissen über die Größe und die Form der Zellagglomerate voraus.

2.4.5 FIA-Master

FIA-Master ist ein Steuerungsprogramm, mit dem sich Pumpen, Ventile und das digitale Mikroskop ansteuern lassen (Abb. 2-6). Der Benutzeroberfläche können mehrere Spalten hinzugefügt werden. Jede Spalte repräsentiert eine zeitabhängige Befehlsabfolge für ein Gerät, z B. eine Pumpe oder ein Ventil. So lassen sich mehrere Geräte gleichzeitig ansteuern und aufeinander abstimmen. Die Befehle werden über aktive COM-Ports der RS232-Schnittstelle an die Geräte geleitet. Bei der Eingabe der Zeit wird der Startpunkt durch eine Null festgelegt und davon fortschreitend der nächste Zeitpunkt in Sekunden eingetragen. Punkt für Punkt ergibt sich eine Zeitachse. Jedem einzelnen Punkt kann ein Befehl zugeordnet werden. Wird auf der Schaltfläche der Startknopf betätigt, startet eine Stoppuhr und die Befehle werden fortschreitend von Befehlszeile zu Befehlszeile geschaltet. Es können auch leere Zeilen, nämlich Zeitpunkte ohne Befehle erzeugt werden.



Abb. 2-6: Grafische Benutzeroberfläche FIA-Master.

In die leeren Zeilen können Befehle nachträglich eingegeben werden. Das macht das Programm zugänglich für Änderungen, die bei der Anpassung eines Arbeitsprotokolls auftreten können. Ist das Ende des Protokolls erreicht, kann es automatisch wiederholend abgespielt werden. Die Anzahl der Wiederholungen kann nach Bedarf vor dem Start eingestellt werden.

2.5 Optische Chemosensoren

Die Überwachung von Kultivierungsprozessen erfordert neben der Bestimmung der Zellkonzentration auch Messungen der pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung. Für diesen Zweck sind verschiedene Messgeräte auf dem Markt verfügbar, die sich in Funktionsart und nach ihrem Messprinzip voneinander unterscheiden [87; 88; 89]. Bei der Arbeit mit dem Mikroskop und der Durchflusssystemen fällt die Wahl auf die optischen Chemosensoren der PreSens GmbH [90]. Die Sensoren arbeiten mit Lumineszenzfarbstoffen, welche in einem Trägermaterial immobilisiert sind. Das Trägermaterial mit den Farbstoffen wird meistens zu kleinen runden Plättchen geformt, den sogenannten Spots. Werden die Spots mit Licht bestrahlt, so kann mit einem Photo-

detektor ein Signal gemessen werden, das auf Reflektion der Spots und Photolumineszenz der Farbstoffe zurückzuführen ist. Ändert sich die Konzentration des Analyten, ändern sich auch die optischen Eigenschaften der Farbstoffe. Dies verursacht eine Phasenverschiebung bzw. eine Änderung der Abklingzeit, die vom Messgerät erfasst und in Messsignal umgewandelt wird.

Das Messgerät, der sogenannte Transmitter, ist mit einer Lichtquelle ausgestattet, welche die Spots in regelmäßigen Zeitabständen über eine optische Faser bestrahlt. Da die Spots klein und dünn geformt sind, ist deren Verbau in kleinen Durchflusselementen möglich. Der Transmitter und die Spots lassen sich räumlich voneinander trennen. Das Messgerät kann in der Regel mehrere Meter vom Messort entfernt positioniert werden [91]. Optische Chemosensoren sind weitgehend unempfindlich gegenüber diversen Ionen und der Strömungsgeschwindigkeit der Kultivierungsmedien. Der Nachteil der Sensoren liegt in der relativ kurzen Lebensdauer der Farbstoffe. Sie werden bei langen Messungen durch Bleaching zerstört. Dabei findet eine Verschiebung des Messsignals statt, der sogenannter Drift. Ein weiterer erheblicher Nachteil ist die geringe Resistenz der Spots gegenüber stark sauren oder basischen Lösungen sowie organischen Lösemitteln. Darüber hinaus ist die mäßige Stabilität bei der Hitzesterilisation ein Hindernis, da hierdurch die Sterilität des gesamten Systems beeinträchtigt sein kann [92].

Bei den Kultivierungsexperimenten werden die Spots der optischen Chemosensoren in Kontakt mit den vorbeifließenden Proben gebracht. Sie werden innerhalb einer kleinen Tropfkammer positioniert, so dass die vorbeigeführte Zellsuspension nicht permanent an den Spots haftet. Sie benetzt die Spots und tropft in die Flussrichtung ab. Der luftgefühlte Raum zwischen den Spots und der Zellsuspension vermindert die Kontaminationsrisiken im Durchflusssystem, an den Spots und in Kultivierungsbehältern.

2.6 CHO-Zellen

Chinese hamster ovary-Zellen, die CHO-Zellen gehören einer Zelllinie an, die ursprünglich aus den Ovarien chinesischer Hamster (*cricetulus griseus*) gewonnen und immortalisiert worden ist. Die Zellen werden bei der Herstellung von pharmazeutischen Erzeugnissen und wichtigen rekombinanten Proteinen eingesetzt [93]. Sie können als adhärenzte Zellen vermehrt werden. Aber für großmaßstäbige industrielle Produktion werden die Zellen oft in Suspensionskulturen gezüchtet [94; 95]. Dies ermöglicht nicht nur eine günstigere Verwendung der Zellen in verschiedenen Herstellungsprozessen, sondern eröffnet auch neue Möglichkeiten zur Überwachung der Zellen in großen und kleinen Bioreaktoren. Als Probe in Suspension können diese Zellen problemlos einer laufenden Kultivierung entnommen werden, um z. B. ihre Viabilität zu bestimmen. Als Zellobjekte verfügen die Zellen in Suspension über runde Formen, was ihre morphologischen Besonderheiten oft auf die Kennwerte eines Kreises reduziert. Die Zellen vermehren sich schnell und erreichen in der Regel hohe Zellkonzentrationen von mehr als 1×10^7 Zellen/mL [96]. Für bildbasierte Analyse sind solche Eigenschaften der Zellen sehr vorteilhaft um ein Überwachungssystem mit dem digitalen Mikroskop zu testen.

Das Mikroskop, das Proben aus einem Bioreaktor analysiert, fotografiert Zellen und gibt sie für die Analyse in einem Bild zurück. Steigt die Zellkonzentration in der Probe, steigt die Zahl der detektierten Zellen in einem Bild. Wird eine Bildsequenz aufgenommen, kann die Zellzahl von den aufgenommenen Bildern in Abhängigkeit von der fortschreitenden Bildnummer dargestellt werden. Die Zellzahl formt einen Peak entlang der Zeitachse (Abb. 2-7). Es sind die Ergebnisse aus der Zusammenstellung zweier verschiedener Bildsequenzen zu sehen (Abb. 2-7). Die blaue Linie und Punkte repräsentieren eine Probe, deren Zellkonzentration um etwa das Vierfache die Zellkonzentration der Bildsequenz mit grauen Punkten übersteigt. Die Gesamtzellzahl der Messung kann in diesem Zusammenhang entweder durch die Peakhöhe oder durch die Fläche des Peaks zum Ausdruck gebracht werden. Die Größe der einzelnen Zellen kann erfasst werden, wenn ein Histogramm über die Zellgrößen aufgestellt wird (Abb. 3-5).

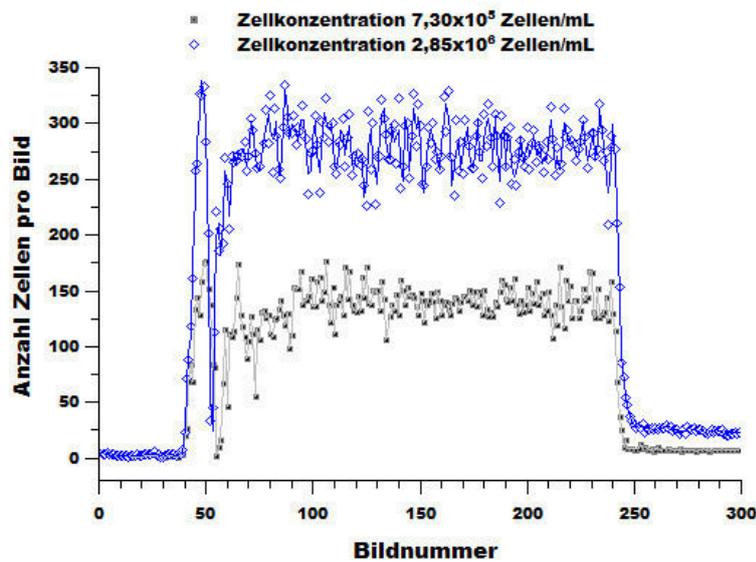


Abb. 2-7: Beispiele für Messung der CHO-K1 mit dem digitalen Mikroskop im Durchfluss.

Die Summe der Zellen in einem Bild wird gegen die Bildnummer aufgetragen. Innerhalb der Bildsequenz wird ein Peak gebildet, deren Fläche (das Integral) die Gesamtzellzahl repräsentiert. Es sind Peaks von zwei Proben zu sehen, deren Zellkonzentrationen sich unterscheiden.

Es kommen auch Daten hinzu, mit welchen die Zellen in Bezug auf ihre farblichen Eigenschaften, so wie sie in einem Bild auftreten, untersucht werden können.

Für den technischen Aufbau eines analytischen Systems bedeutet das, dass die Zellen innerhalb der Messzone nicht verwirbelt oder durchmischst werden dürfen. Sie müssen sich im Fluss innerhalb einer laminaren Strömung befinden, die vollkommen ausschließt, dass Zellen innerhalb einer Durchflusszelle ungleichmäßig verteilt werden. Die Zellen müssen unbeschadet die Messzone passieren, so dass der Einfluss von Scherkräften berücksichtigt werden müssen. Vor dem Kameraobjektiv müssen sie auch in eine Ebene gezwungen werden, damit für jede Zelle eine gleichwertige Auswertung durchgeführt werden kann. Das Bild muss eine genügende Weite des Sichtfeldes abgreifen, um eine ausreichende Anzahl von Zellen repräsentativ vorzustellen. Ein zu großer Vergrößerungsfaktor und ein kleines Sichtfeld würden nur einen geringen Anteil an Informationen über die Zellen liefern. In der Regel wachsen die Zellen über mehrere Tage und stellen hiermit eine große Anforderung an das Durchflusssystem und die damit verbundene Analytik dar. Das System aus Durchflusselementen und Mikroskop soll über mehrere Tage autonom funktionsfähig sein und wenig Aufwand für Reparaturen und Reinigung erfordern. Die beste

Möglichkeit hierfür bietet ein automatisiertes Durchflusssystem, das im Fluss alle Aufgaben in Bezug auf die Probenahme, Vermessung und Reinigung erfüllen kann. Trotz ihrer Robustheit sind die Zellen empfindlich gegenüber Schwankungen, welche durch äußere Umwelteinflüsse verursacht werden können. Aus diesem Grund soll das System aus dem Mikroskop und den Durchflusselementen die Temperaturstabilität der Kultivierungsanlage wahren und wenig Wärme abgeben. In vieler Hinsicht wird bei dem Aufbau darauf gesetzt, dass möglichst viel von den Elementen seine Wiederverwendung in zahlreichen Experimenten finden kann.

3 Mikroskopaufbau und Testung

3.1 Digitales Mikroskop und sein Aufbau

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Gerät ist eine portable Ausführung eines digitalen Mikroskops (Abb. 3-1). Es besteht aus einem Messingrohr, das an beiden Enden mit Gewinden für Objektive und Strahlteiler-Adapter ausgestattet ist. Die Länge dieses Tubus beträgt 147 mm. Der Tubus hat einen Innendurchmesser von 25 mm und ist im Inneren mit schwarzem Samtpapier ausgekleidet. Die schwarz getönte Oberfläche hilft Reflektionen beim Beleuchten im Tubus zu vermeiden und die Qualität der Aufnahmen zu verbessern. Die Kamera und das Objektiv werden über zusätzliche Adapter am Mikroskop befestigt. Der Tubus ist über Halterungselemente an einem Positionierungsschlitten befestigt. Der Schlitten wird mit einem hochpräzisen Mechanismus aus Mikrometerschraube und Schrittmotor in Bewegung gesetzt. So kann das Mikroskop in axiale Richtung vor und zurück bewegt werden.

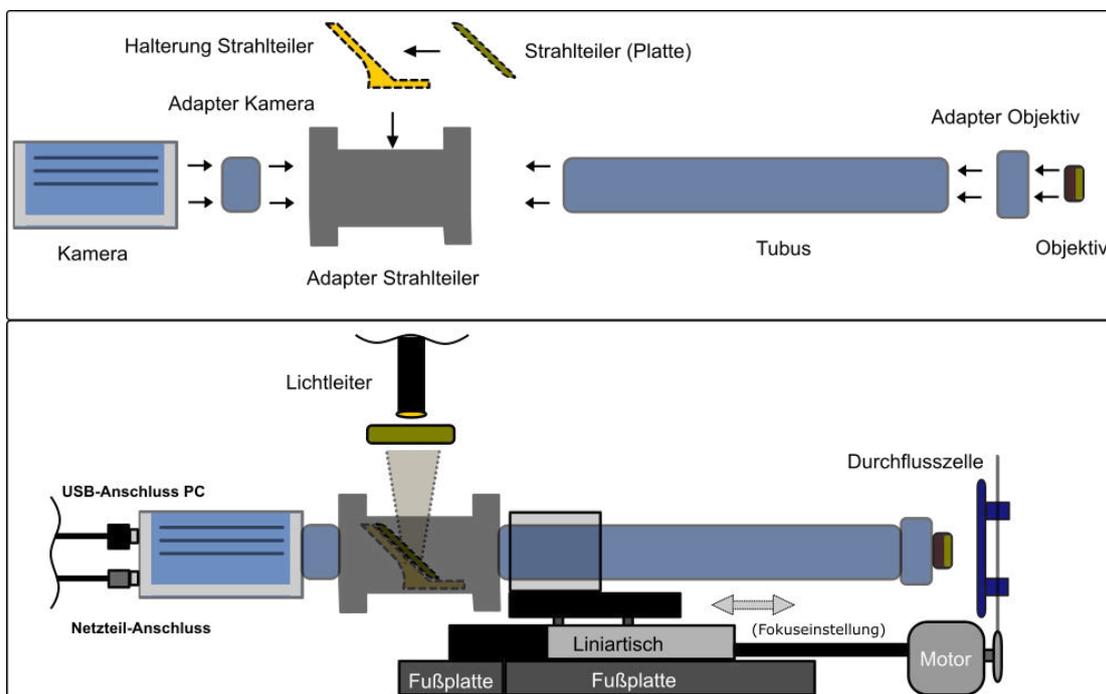


Abb. 3-1: Aufbau des digitalen Mikroskops mit Beleuchtung und Chipwechsler-Prototyp.

Wenn das Mikroskop mit Auflicht-Beleuchtung betrieben wird, benötigt es einen Strahlteiler. Der Strahlteiler wird im Strahlteiler-Adapter untergebracht, der an einer Seite geöffnet ist. Durch die Öffnung kann die Halterung mit der Strahlteilerplatte eingesetzt und im Strahlengang ausgerichtet werden. Über einen Lichtleiter, der direkt am Strahlteiler-Adapter befestigt wird, erreicht das Licht aus einer externen Lichtquelle das Mikroskop und die Auflicht-Beleuchtung wird erzeugt (Abb. 3-2b).

Die Durchflusszellen werden an einer Revolvervorrichtung befestigt (Abb. 3-2c/d). Die Revolvervorrichtung wird an der Fußplatten des Mikroskops mit zwei Schrauben befestigt und kann maximal zwei Durchflusszellen abwechselnd vor dem Objektiv schwenken (Anhang, Abb. 11-2). Eine Halterung für die Durchflusszellen kann auch direkt am Tubus montiert werden (Abb. 3-2a). Eine solche Halterung ist besonders vorteilhaft, wenn das Mikroskop in einem engen Raum, z. B. in einem Brutschrank, platziert wird. Damit kann am Mikroskop auch eine LED für die Durchlicht-Beleuchtung präzise angebracht werden.

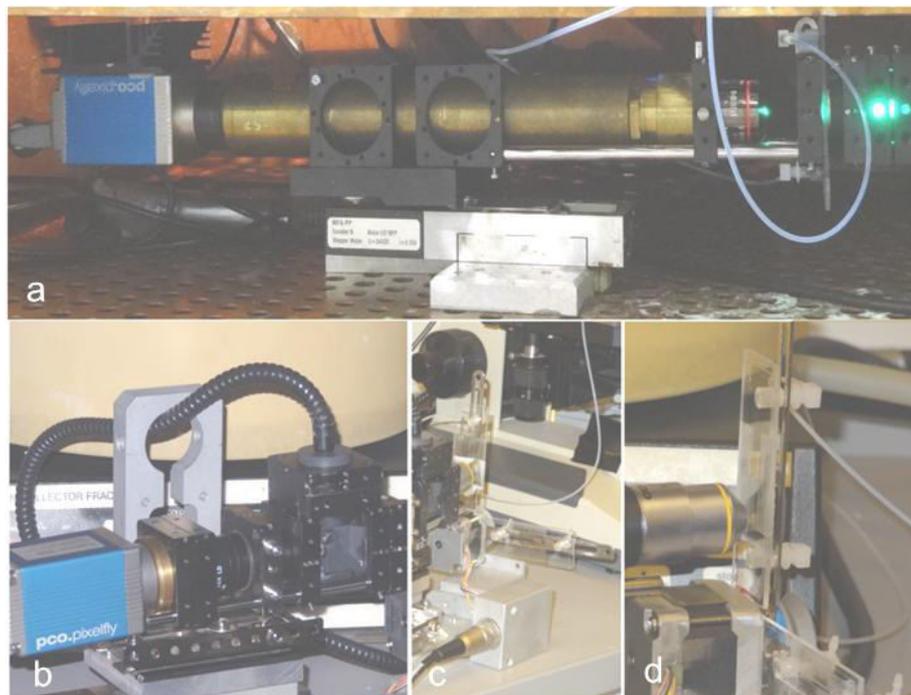


Abb. 3-2: Digitales Mikroskop mit Hilfsvorrichtungen.

- a) Das Mikroskop mit Durchlicht-Beleuchtung (Aufbau aus Experiment im Kapitel 3.5);
- b) Aufbau der Auflicht-Beleuchtung und der Strahlteiler (Prototypentwicklung);
- c) Prototyp eines Chipwechslers nach dem Revolver-Prinzip.
- d) Zwei Durchflusszellen Ibidi 200 μm sind an dem Chipwechsler befestigt. Eine Durchflusszelle ist direkt vor dem Objektiv positioniert.

3.2 Beleuchtung und Abbildungsqualität

Die Qualität der Abbildungen im Durchlicht wird im Wesentlichen durch die verwendete Beleuchtung bestimmt. Im Experiment wird eine grüne Leuchtdiode mit dem Ausstrahlwinkel von 100° eingesetzt. Die Leuchtdiode hat einen flachen Leuchtkopf und erzeugt eine gleichmäßige Beleuchtung ohne merkliche und starke Helligkeitsschwankungen.

Um die Zellen mit der Aufsicht-Beleuchtung beobachten zu können, wird ein Spiegel auf die Rückseite der Durchflusszelle angebracht (Abb. 3-3). Der Spiegel reflektiert das vom Objektiv kommende Licht und die Zellen werden sichtbar.

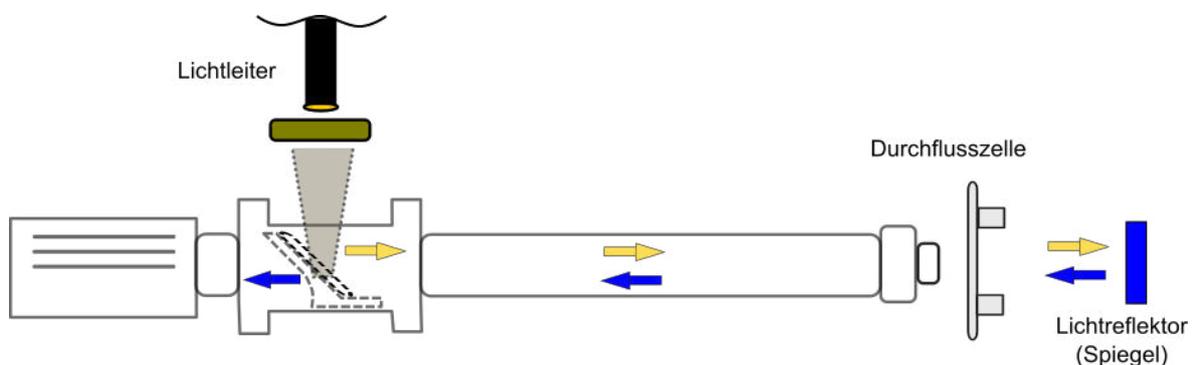


Abb. 3-3: Digitales Mikroskop mit Reflektor und Aufsicht-Beleuchtung.
Ein Spiegel reflektiert das einfallende Licht in Richtung des Mikroskops.

In der Abbildung (Abb. 3-4) sind CHO-K1-Zellen zu sehen, die von dem Mikroskop mit Aufsicht-Beleuchtung detektiert werden. Die Zellen beugen und streuen das Licht, so dass der Schatten der Zellen in die vom Objektiv entgegengesetzte Richtung fällt. Die Zellen heben sich nur leicht aufgrund der Beugung und Reflektion vom Hintergrund ab (Abb. 3-4a). Die Qualität der Aufnahme ist schlecht und die Zellen können nicht gut analysiert werden. Wird ein Reflektor auf der Rückseite der Durchflusszelle eingesetzt, wird das vom Mikroskop ausgehende Licht wieder reflektiert. Die Zellen erzeugen Schattenbereiche auf dem CCD-Chip der Kamera und heben sich gut vom Hintergrund ab (Abb. 3-4b).

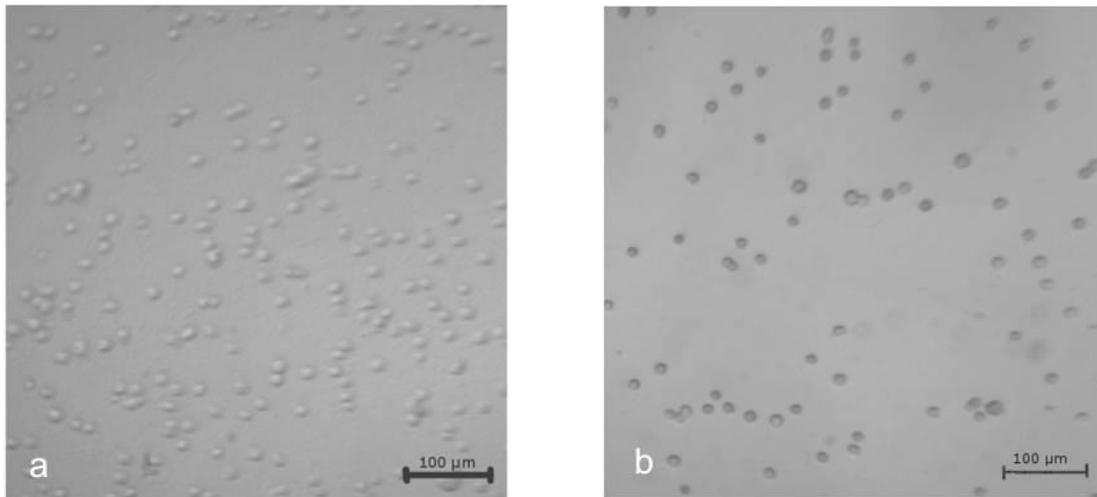


Abb. 3-4: Mikroskopische Aufnahmen der CHO-K1 mit dem digitalen Mikroskop.

a) Das digitale Mikroskop mit Auflicht-Beleuchtung ohne Reflektor und b) mit Reflektor.

Da beim digitalen Mikroskop, abgesehen vom Objektiv, keine Hilfslinsen verwendet werden, ist die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen schlechter als bei herkömmlichen Mikroskopen. Es können keine Zelldetails erkannt werden. Daraus ergibt sich allerdings ein Vorteil. Für die Analyse der Zellen wird ein Programm eingesetzt, deren Algorithmus auf Kantenerkennung basiert. Die optische Vereinfachung einer Zelle zu einem Zellobjekt ohne besonders stark ausgeprägte Kantenmuster im Zellinneren verschafft eine bessere und präzisere Analyse bei der Auswertung. Das Sichtfeld, welches die hochwertigen Objektive bieten, wird bei dem digitalen Mikroskop nicht vollständig auf dem CCD-Chip abgebildet. Da keine Feldlinse im Strahlengang vorhanden ist, verbleibt ein Teil der Projektion außerhalb des Detektors. Das Fehlen der Feldlinse ermöglicht aber die Sicht auf den zentralen Teil der Abbildung gerade mit der Vergrößerung, die für die Zellzählung und die bildbasierte Zytometrie akzeptabel ist.

3.3 Berechnung der Abbildungsmaßstäbe

In den Experimenten kommen bei dem Mikroskop zwei robuste Kameras mit kleinen Abmessungen, die PCO PixelFly und Sony XCD-X700 zum Einsatz. Die Tabelle 3-1 gewährt eine Übersicht über die relevanten technischen Eigenschaften der Kameras.

Tabelle 3-1: Technische Daten von Digitalkameras.

	Auflösung [Pixel]	Pixelgröße [µm · µm]	Bildrate bei voller Auflösung [fps]	Abmessungen [mm]	Kommunikation
Sony XCD- X700	1024 · 768	6,25 · 6,25	7.5	44 x 33 x 116	EEE-1394 Digital Serial Bus (400 Mbit/s)
PCOPixelFly	1392·1024	6,45 · 6,45	7.3	72 x 39 x 47	USB 2.0 (480 Mbit/s)

Das digitale Mikroskop unterscheidet sich durch seine Bauart und den Strahlengang von den gewöhnlichen Mikroskopen. Das Ergebnis der Nutzung von Objektiven in einem baufremden System kann nicht genau vorhergesagt werden. Daher muss die optische Leistung vom Mikroskop experimentell bestimmt werden. Für die Berechnung der Abbildungsmaßstäbe und der Größe des Sichtfeldes wird das Mikrometeregitter einer Zählkammer benutzt. Wird sie unter dem Objektiv positioniert, kann anhand der Aufnahme berechnet werden wie groß die Fläche ist, die auf dem CCD-Chip der Kamera abgebildet wird. Die Kantenlängen, die ein Bildpixel der Abbildung hat, können aus den Kantenlängen des Hilfsgitters in der Abbildung und der Anzahl der Bildpixel in horizontale (Hor) und vertikale (Vrt) Richtungen bestimmt werden:

$$Kantenlänge_{Bildpixel} = \frac{Kantenlänge\ Gitter\ (Hor\ oder\ Vrt)}{Anzahl\ Bildpixel_{(Hor\ oder\ Vrt)}} \quad (3)$$

Mit den Kantenlängen kann die Fläche der Abbildung berechnet werden, die auf einem Bildpixel abgebildet wird:

$$Fläche_{Bildpixel} = Kantenlänge_{Bildpixel}\ (Hor) * Kantenlänge_{Bildpixel}\ (Vrt) \quad (4)$$

Mit dem Ergebnis der Formel (4) kann die Bildfläche des Sichtfeldes, d. h. die Fläche des auf dem CCD-Chip der Kamera abgebildeten Bildausschnitts berechnet werden:

$$Fläche_{Bild/CCD-Chip} = Fläche_{Bildpixel} * Anzahl\ Pixel_{CCD-Chip} \quad (5)$$

Die berechneten Daten sind in der Tabelle 3-2 zusammengefasst:

Tabelle 3-2: Berechnete Abbildungsmaßstäbe für verschiedene Digitalkameras.

	Kantenlänge je Bildpixel [μm] (Hor) · (Vrt)	Bildfläche je Pixel [μm^2]	Kantenlänge Abbildung [μm] (Hor) · (Vrt)	Bildfläche CCD-Chip [μm^2]	Abbildungs- maßstab V_M
Sony XCD-X700	0,97 · 0,97	0,94	993·745	739785	6,4x
PCO Pi- xelFly	0,96 · 0,96	0,92	1336 · 983	1313288	6,7x

Der Abbildungsmaßstab V_M ist der Gesamtvergrößerungsfaktor für das Mikroskop. Aus dem Abbildungsmaßstab des Objektivs V_{obj} und dem Abbildungsmaßstab V_M kann der Faktor β_t berechnet werden:

$$\beta_t = \frac{V_M}{V_{obj}} \quad (6)$$

Der Faktor β_t beträgt laut Berechnung 1,6x-1,7x und kann bei Verwendung anderer vergleichbarer oder baugleicher Objektive eingesetzt werden um den Abbildungsmaßstab abzuschätzen.

3.4 Mikroskopobjektive

Nach der Fertigstellung von Kernelementen zum Aufbau des digitalen Mikroskops ist noch die Wahl eines passenden Objektivs die letzte Hürde auf dem Weg zur erfolgreichen Messung einer Zellprobe. Das Objektiv ist das einzige Linsenelement im Strahlengang des Mikroskops und bestimmt im Zusammenspiel mit dem Abstand zur Kamera die Vergrößerung und das Sichtfeld des Mikroskops. Im Rahmen dieser Arbeit werden mit dem digitalen Mikroskop tierische Zellen in Suspensionskulturen beobachtet, deren Durchmesser 10-20 μm beträgt [97]. Die Zellen bilden auch Agglomerate, deren Größe entlang der Diagonale oder der längsten Kante auf

60-70 μm geschätzt werden kann. Für die Genauigkeit einer Messung, z. B. der Zellgröße sollten auch möglichst viele Zellen von der Kamera erfasst werden.

Unter gegebenen Voraussetzungen können die gebräuchlichen Standardobjektive mit dem Abbildungsmaßstab 4x und 10x eingesetzt werden. Diese Objektive ergeben im direkten Vergleich folgendes Bild (Abb. 3-5, Graphen):

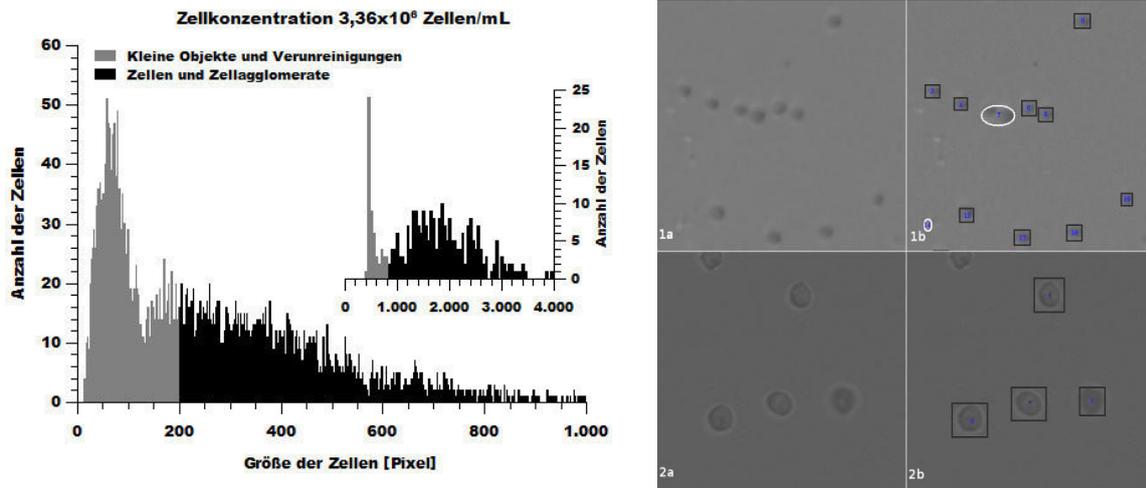


Abb. 3-5: Gegenüberstellung der detektierten Zellen und ihrer Größe bei Messungen mit Mikroskopobjektiven der Abbildungsmaßstäbe 4x und 10x.

Im Graph unten links: Histogramm der Zellzahl gegen Zellgröße gemessen mit Objektiv 4x. Im Graph oben rechts: Histogramm der Zellzahl gegen Zellgröße mit Objektiv 10x. Die Ausschnitte aus Originalaufnahmen zeigen die Zellen im Durchfluss bei den Messungen mit dem Objektiv 4x (Aufnahmen der Serie 1) und mit dem Objektiv 10x (Aufnahmen der Serie 2) und die Detektion mit Graphic Analyzer (Aufnahmen 1b und 2b). Die Zellkonzentration gemessener Probe betrug $3,36 \times 10^6$ Zellen/mL.

Um die Benennung der Objektive zu vereinfachen, wird im weiteren Verlauf der Arbeit das Objektiv mit der vierfachen Vergrößerung als Objektiv I und das Objektiv mit der zehnfachen Vergrößerung als Objektiv II bezeichnet.

Die Darstellung der detektierten Zellzahl in Abhängigkeit von der Zellgröße in den beiden Histogrammen gewährt den Einblick in die Messungen einer Probe mit der Zellkonzentration $3,36 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 3-5, Graphen). Bei der Auswertung der Aufnahmen konnten mit dem Graphic Analyzer insgesamt 3682 intakte Zellen mit dem Objektiv I und 241 Zellen mit dem Objektiv II erfasst werden (Tabelle 3-3). Die Angaben gelten für die Bereiche, die in den Histogrammen schwarz markiert sind. Die grauen Bereiche kennzeichnen Objekte, die kleiner sind als eine einzelne intakte

CHO-Zelle. Meistens sind das kleine Verunreinigungen und Bruchstücke der Zellen. Den grauen Bereichen der Histogramme sind auch die Zellen zuzuordnen, von denen nur ein geringer bildlicher Ausschnitt als Zellobjekt erkannt worden ist. Die Mehrheit der detektierten Zellen ist bei der Verwendung des Objektivs I im Bereich von 200-400 Pixel zu finden. Mit dem Objektiv II werden die Zellen im Größenbereich zwischen 1200 Pixeln und 2600 Pixeln erfasst. Die Zellen müssen durch mehr als zwei Pixel getrennt sein, um vom Graphic Analyzer als zwei getrennte Zellen detektiert zu werden. Deshalb sind für das Objektiv I im Histogramm oberhalb von 400 Pixeln auch Zellagglomerate zu finden. Bei dem Objektiv II sind die Agglomerate im zugehörigen Histogramm ab etwa 2600 Pixel zu finden. Vereinzelt sind auch darunter Verunreinigungen zu finden, welche als Agglomerate von Zellbestandteilen identifiziert werden konnten. Solche Objekte kommen aber sehr selten vor.

Tabelle 3-3: Anzahl detektierter Zellen bei Verwendung verschiedener Objektive.

Objektive	4x (I)	10x (II)
Anzahl der Aufnahmen	400	400
Anzahl der Objekte	7414	293
Anzahl der Zellen	3682	241

Ausgehend von der Größe der Fläche, welche die Zellen bei der Verwendung beider Objektive auf dem Chip der Kamera als Abbildungen beanspruchen, decken beide Objektive ein akzeptables Spektrum der Zellgrößen ab (Abb. 3-5, 1a und 1b). Mit dem Objektiv I können einzelne tierische Zellen in Suspension gut detektiert werden. Das Objektiv ermöglicht eine bessere Erkennung von größeren Objekten. Die geschätzte Detektionsgrenze im unteren Größenbereich setzen die Objekte, deren Größe ca. 10 μm beträgt. Eine ergebnisorientierte Beobachtung von z. B. Hefezellen konnte mit dem Objektiv in einem Experiment nicht durchgeführt werden. Der Detektion von großen Zellen und deren Agglomerate sind mit dem Objektiv I keine Grenzen gesetzt.

Das Objektiv II ermöglicht einen detaillierten Blick auf die Zellen. Die Zellen erscheinen im Kamerabild dunkel- bis hellgrau (Abb. 3-5, 2a und 2b). Die Form der Zellen,

z. B. die Abweichung von der idealen Kreisform bei einigen Zellen, ist gut zu erkennen. Die Fläche, welche die Zellen in der Abbildung einnehmen, ermöglicht eine deutliche Trennung der einzelnen Zellen und der Agglomerate aus zwei oder drei Zellen bei der Darstellung im Histogramm. Mit dem Auge können oft morphologische Gegebenheiten identifiziert werden, wie z. B. kleine Vesikel und Unebenheiten auf der Zelloberfläche. Sie weisen auf beschädigte oder tote Zellen hin. Diese Gegebenheiten der Zelloberfläche können aber nicht vom Graphic Analyzer für die Beurteilung der Zellstruktur verwertet werden.

Bei der Gegenüberstellung der Objektive in einem Experiment wird bei der Zellkonzentration unter $3,36 \times 10^6$ Zellen/mL nur eine geringe Zellzahl auf einem Bild erfasst. Manche Bilder beinhalten nur 2-3 Zellen. Da bei der Kultivierung der Suspensionskulturen auch kleinere Zellkonzentrationen auftreten können, sollte das Objektiv I gewählt werden. Objektiv I bietet ein größeres Sichtfeld und kann bei kleinen Zellkonzentrationen mehr Zellen erfassen. Die Abstufung zwischen den einzelnen Konzentrationen ist bei dem Objektiv II kleiner als bei dem Objektiv I. Steht die Zählung der Zellen im Mittelpunkt der Experimente, sollte das Objektiv I für eine bessere Trennung der Konzentrationsunterschiede bevorzugt werden.

In der Abbildung (Abb. 3-5, 2a) ist eine Zelle gut zu erkennen, die im Gegensatz zu den anderen Zellen nicht in der Fokusebene des Objektivs liegt. Im Bild erscheint sie dunkler als die anderen Zellen. Solche Unterschiede sind durch die Tiefenlage der einzelnen Zellen bedingt. Da das Objektiv II über eine geringe Tiefenschärfe verfügt, werden die Zellen in verschiedenen Tiefenlagen innerhalb der Durchflusszelle erfasst. Werden solche Zellen detektiert, ergibt sich bei der Detektion eine geringe Abweichung bei der Bewertung der Zellgröße. Die Bewertung bezüglich der Graustufenverteilung wird auch verfälscht und ist mit anderen Zellen nicht vergleichbar.

Angesichts der oben genannten Faktoren ist das Objektiv mit der vierfachen Vergrößerung für die Messungen vorzuziehen.

3.5 Fazit

Im Laufe der experimentellen Arbeit konnte ein Mikroskop gebaut werden, das die Aufgaben der automatischen Überwachung gut erfüllt. Das Endgerät besitzt eine robuste Konstruktion und kann im automatischen Betrieb CHO-K1-Zellen im Durchfluss überwachen. Das Endgerät konnte gut charakterisiert werden. Die Abbildungsmaßstäbe konnten unter Zuhilfenahme von zwei Kameras berechnet werden. Bei dem Test der Objektive konnte das Objektiv I mit der Vergrößerung 4x für optimal befunden werden. Das Objektiv I bringt bessere Voraussetzungen für die Bestimmung der Zellzahl und der Zellgröße mit. Die Zellen verbleiben weitgehend in der Fokusebene des Objektivs und sind im Bild vergleichsweise einheitlich grau gefärbt. Das Spektrum der Objekte, die mit dem Programm Graphic Analyzer detektiert werden, reicht von kleinen Verunreinigungen und einzelnen Zellen bis zu großen Zellagglomeraten. Die Agglomerate werden vom Graphic Analyzer als geschlossene Zellobjekte gewertet. Eine gerichtete Differenzierung von Zellen innerhalb solcher Agglomerate ist nur eingeschränkt möglich und wird anhand der Größe und Form der Agglomerate geschätzt.

Um die Vielfalt der Objekte bei der Erkennung einzuschränken und die Erfassung nur auf Zellen zu fokussieren, müssen die Filter-Optionen im Graphic Analyzer geschickt gewählt werden. Dies betrifft die Einstellungen für die Filter bezüglich der Objektgröße, Entropie und der Exzentrizität (Anhang, Abb. 11-3). Die Anforderungen an die Qualität der Probe, die Reinheit des Kultivierungsmediums und der Durchflusselemente sind hoch. Die Zellen sollen möglichst schnell nach der Probenahme vom Mikroskop photographiert werden um die Bildung von großen Agglomeraten zu vermeiden. Feste Komponenten im Kultivierungsmedium oder Schaum können die Qualität der Zelldetektion durch das Graphic Analyzer beeinflussen. Sie können für die Entstehung von detektierbaren Objekten oder unerwünschten Mustern im Sichtfeld des Mikroskops sorgen, die keine Zellen sind.

Dank seiner kompakten Bauart und den Durchflusszellen kann das Mikroskop an eine Probenahmeverrichtung angeschlossen werden, um eine schnelle und reproduzierbare Bewertung von Zellen in Suspension zu ermöglichen. Die Bereitstellung einer Probenahmeverrichtung findet auf Basis eines Samplers statt. In Verbindung mit dem

Sampler soll das Mikroskop bei Langzeitmessungen im automatischen Betrieb getestet werden. Die Methoden und Techniken für die Durchführung von automatischen Messungen werden erarbeitet und optimiert. Die Automatisierung der Anlage wird getestet.

4 Automatisierung der Probenahme und Langzeittests mit den Durchflusszellen

Nach der Entwicklungsphase soll das Mikroskop in Kombination mit den automatisierten Durchflusssystemen eingesetzt werden, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen zu überprüfen und um die Funktionsweise und die Zuverlässigkeit der Steuerungssoftware FIA-Master, der Quetschventile und Pumpen zu testen.

4.1 Automatisierte Messung in einem Durchflusssystem

Eine wichtige Rolle bei den Tests spielt die möglichst getreue Wiedergabe einer Probenmessung aus laufender Tierzellkultivierung. Dieser Vorgang wird in folgendem Schema in formale Abschnitte, die Probenahme aus einem Reaktor, die Messung der Probe mit dem Mikroskop sowie die Entsorgung und Reinigung, unterteilt. Die zeitliche Abfolge dieser Abschnitte wird anhand der Auswertung einer imaginären Bildsequenz verdeutlicht (Abb. 4-1).

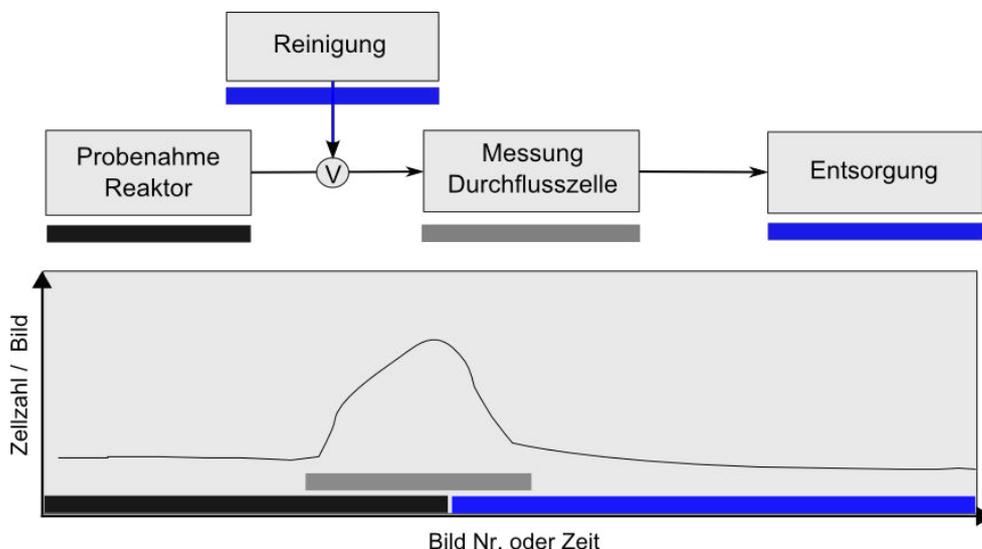


Abb. 4-1: Darstellung des Ablaufs einer Messung bei der Probenahme aus einem Bioreaktor.

Das Ereignis der Messung ist in drei Abschnitte unterteilt: Die Probenahme, Messung und Entsorgung inklusive Reinigung. Die Abschnitte sind im Schema gemäß ihrer tatsächlichen Position in einem möglichen Aufbau eines Durchflusssystems angeordnet. Die zeitliche Abfolge der Abschnitte wird anhand einer imaginären Bildsequenzauswertung dargestellt.

Fließt eine Probe aus dem Bioreaktor in das Durchflusssystem, so passiert sie die Durchflusszelle und wird vom digitalen Mikroskop erfasst. Im Abschnitt „Messung“ entstehen die Aufnahmen der Zellen, welche bei der Analyse einen Peak ergeben (Abb. 4-1, Abschnitt grau). Die Probenahme aus dem Reaktor erfolgt so lange, bis der Strom der Spüllösung in das Durchflusssystem eingebunden wird. Ist die Umschaltung auf die Reinigung erfolgt, fließt nur die Spüllösung durch die Durchflusszelle und die Zellen werden aus dem System gespült. Die Zellzahl in der Aufnahmesequenz sinkt bis zu einer Basislinie oder fällt gegen Null (Abb. 4-1, blauer Abschnitt).

Wird ein Probenahme- und Durchflusssystem nach dem oben beschriebenen Schema aufgebaut und werden die Proben mit einem Sampler gereicht, so ergeben sich für die Auswertung der Aufnahmen keinerlei Änderungen. Ähnlich der Probe aus einem Bioreaktor bildet sich ein Peak mit Informationen über die Zellzahl auch wenn eine kleine Probe aus einem Probengefäß gereicht wird. Bei so einem System muss allerdings die Flüssigkeit nachgereicht werden, welche die Funktion der Reinigungslösung übernimmt und einen ununterbrochenen Fluss im System aufrechterhält.

Die Genauigkeit solcher Messungen wird durch die kontinuierlich anhaltende Pumpenleistung und durch den zeitlich kontrollierten Abbruch des Probenflusses aus dem Bioreaktor bestimmt. Bleibt bei der Probenahme die Pumpenleistung und der Zeitabstand zwischen zwei aufgenommenen Bildern unverändert, können die Messergebnisse zweier Proben miteinander verglichen werden. Das Volumen der Probe, das die Durchflusszelle passiert, bleibt dank konstanter Pumpenleistung gleich. Für mehr Sicherheit bei der Probendosierung kann eine Probenschleife eingesetzt werden. Dies führt aber zu einem höheren apparativen Aufwand und zum Verlust von wertvollen Probenvolumen.

Erfolgt die Probenahme aus einem Bioreaktor, müssen ebenfalls die Zellen in der Probenahme berücksichtigt werden, die in der Leitung und auf der Strecke zwischen dem Bioreaktor und dem Verbindungsstück V zu finden sind. Nach der ersten Betätigung der Probenahme verbleibt in der Leitung zellhaltige Suspension. Die darauf folgende Probe wird dementsprechend noch die Zellen enthalten, welche sich im Leitungsabschnitt angesammelt haben. Je länger dieser Leitungsabschnitt ist, umso mehr Zellen werden die Probenmessung beeinflussen.

Werden solche Anforderungen auf die Messungen von Proben übertragen, die in kleinen Volumina von z. B. 500 μL in Probengefäßen vorgelegt werden, so ist für das Durchflusssystem eine präzise Steuerung erforderlich. Um den Flüssigkeitsstrom im System aufrecht erhalten zu können und die Bildung von Luftblasen zu unterbinden, muss nach der Probe eine Spüllösung automatisch in das System eingeführt werden.

4.2 Aufbau eines Durchflusssystems mit automatisierter Probenahme

Mit der Implementierung der automatisierten Probenahme erfolgt ein weiterer Schritt im Aufbau eines Durchflusssystems, mit dem Proben aus einem Schüttelkolben oder Bioreaktor für die Messung mit dem Mikroskop bereitgestellt werden können. Die Probenahme soll eine getreue Nachahmung des Probenflusses liefern, der bei einem an das System angeschlossenen Schüttelkolben oder Bioreaktor entsteht. Außerdem soll diese Plattform auch eine Basis für die Testung des Steuerungsprogramms FIA-Master werden. Die Präzision des Programms bei der Ansteuerung von Pumpen und Ventilen ist entscheidend für die Überwachung von Tierzellkultivierungen über mehrere Tage.

Als Basis für die Probenahme dient ein Mikroreaktionsgefäß, das auf einem Sampler platziert wird. An der Probennadel des Samplers sind zwei Schläuche befestigt, welche mit der Nadelspitze in das Gefäß mit der Probe eingeführt werden (Abb. 4-2).

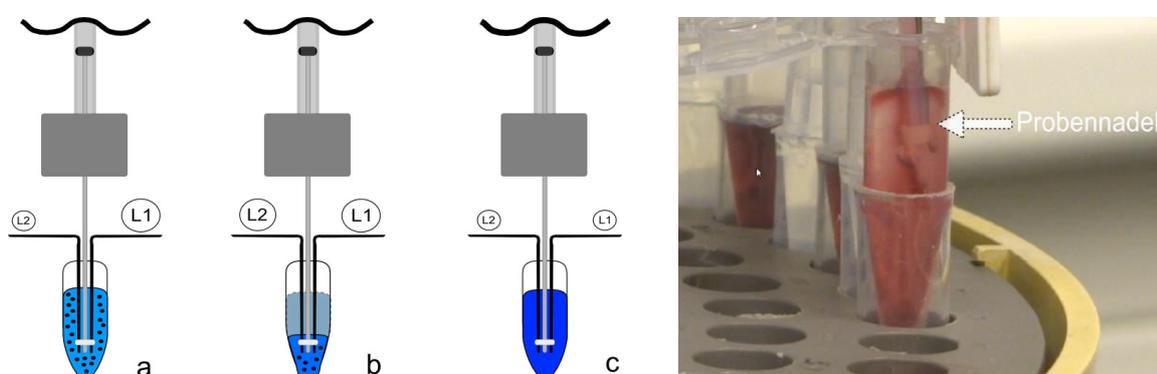


Abb. 4-2: Aufbau und Funktion der automatischen Probenahme.

Die technische Basis für Probenahme liefern Mikroreaktionsgefäße auf einem Sampler.

Der Schlauch L1 ist direkt an eine Durchflusszelle und eine Pumpe angeschlossen. Ist die Pumpe aktiv, kann die Probe aus dem Mikroreaktionsgefäß in die Durchflusszelle gelangen (Abb. 4-2a). Nach wenigen Sekunden ist das Gefäß fast leer und die Pumpe, die an den Schlauch L2 angeschlossen ist, wird aktiviert (Abb. 4-2b). Sie pumpt Spüllösung aus einem Vorratsgefäß in das Mikroreaktionsgefäß. Auf diese Art und Weise wird dem Durchflusssystem Flüssigkeit zugeführt, welche das Durchflusssystem reinigt und den Flüssigkeitsstrom in der Durchflusszelle aufrechterhält. Da die Pumpe am Schlauch L2 auf eine höhere Pumpgeschwindigkeit eingestellt ist als die Pumpe am Schlauch L1, wird das Mikroreaktionsgefäß mit Spüllösung gefüllt bis beide Pumpen abgeschaltet werden (Abb. 4-2c).

Diese Art der Probenahme, bei der unmittelbar nach der Messung einer Probe ein Reinigungsvorgang der Durchflusszelle erfolgt, entspricht am besten den Verhältnissen, die bei einer direkten Probenahme aus einem Bioreaktor vorliegen könnten. Bei der Analyse der Aufnahmen entsteht ein Bild, das vom zeitlichen Ablauf und von der Änderung der Zellzahl der oben erwähnten Abbildung (Abb. 4-1) entspricht.

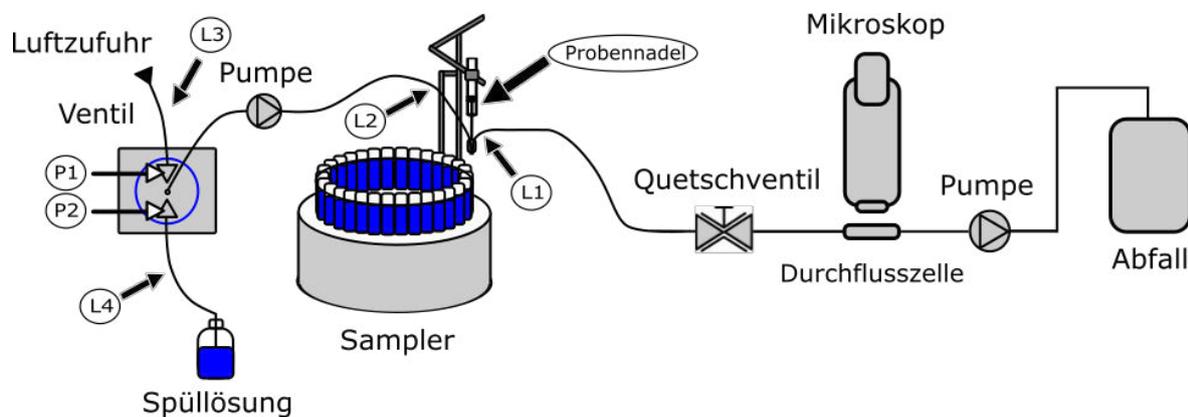


Abb. 4-3: Aufbau des Durchflusssystems und der automatischen Probenahme.

Die Abbildung (Abb. 4-3) zeigt den Aufbau eines Durchflusssystems mit automatischer Probenahme. Im Aufbau sind das Mikroskop mit einer Durchflusszelle, der Sampler, zwei piezoelektrische Pumpen und Ventile zu sehen. Am Schlauch L2 ist ein Zweiwegeventil angeschlossen, das in der Schaltposition P2 den Schlauch L2 mit dem Schlauch L4 verbindet. Über die aufgebaute Verbindung kann aus einem Vorratsgefäß die Spüllösung in die Probengefäße gelangen. Wird das Ventil auf Position P1 geschal-

tet, kann die Luft über den Schlauch L2 in die Probengefäße gepumpt werden. Damit werden die Zellen in einem Probengefäß aufgewirbelt. Dieser Schritt ist notwendig, um die Zellsuspension in Probengefäßen unmittelbar vor der Messung durchzumischen. An Schlauch L1 wird ein Quetschventil angebracht, welches den Fluss im Schlauch L1 blockiert, sobald die Probennadel ein Probegefäß verlässt. Damit wird verhindert, dass sich die Flüssigkeit im Schlauch gemäß der Druckdifferenz in eine bestimmte Richtung versetzen lässt. Ohne das Ventil könnten z. B. die Spüllösung aus dem Schlauch L1 auf den Sampler gelangen. Es könnte auch Luft in den Schlauch eingezogen werden, was für die Messungen im automatischen Lauf nicht erwünscht ist.

Der Sampler sorgt bei dem System für die Positionierung einzelner Mikroreaktionsgefäße. Ist eine Probe gemessen worden, wird die Probennadel aus dem Mikroreaktionsgefäß entfernt und das nächstpositionierte Mikroreaktionsgefäß unter die Probennadel gestellt. Da an der Nadel und in der Durchflusszelle von Probe zu Probe immer mehr Zellen haften bleiben, werden die einzelnen Proben nicht direkt nacheinander gemessen. Jeder Probe folgt im Sampler ein Reaktionsgefäß mit Spüllösung. Sobald die Probennadel in das Gefäß eingeführt ist, werden beide Pumpen aktiviert. Die Spüllösung strömt aus dem Gefäß direkt in die Durchflusszelle über den Schlauch L1. Parallel dazu wird die Spüllösung aus dem Vorratsgefäß über den Schlauch L2 in das Mikroreaktionsgefäß gepumpt. Auf dieser Art wird eine zusätzliche Reinigungsprozedur vollzogen, bevor eine neue Probe gemessen wird. Die Mikroreaktionsgefäße mit den Proben und der Spüllösung wechseln sich nacheinander unter der Probennadel ab.

4.3 Messungen mit der automatisierten Probenahme

Das digitale Mikroskop und das Durchflusssystem sollen im Rahmen der Experimente auf ihre Effektivität in Verbindung mit dem aufgebauten Probenahmesystem geprüft werden. Hierbei soll festgestellt werden, ob das entwickelte Mikroskop, das Durchflusssystem und angepasste Software für autonome Messungen an einem Schüttelkolben einwandfrei funktionieren. Mit Proben aus verdünnter Zellsuspension hoher

Zelldichte wird die Genauigkeit der Messungen überprüft und die Grenzen der aufgebauten Apparatur in Bezug auf die messbaren Zellkonzentrationen ermittelt.

4.3.1 Test der Messgenauigkeit

Im Mittelpunkt des Experimentes steht die Durchflusszelle Ibidi 100 μm . Da die Kanaltiefe dieser Durchflusszelle 100 μm beträgt, können die Zellen in ihrem Kanal günstig vor dem Objektiv positioniert werden. Die Tiefenschärfe des Objektivs 4x ermöglicht eine einheitliche Darstellung einzelner Zellen in der eingestellten Fokusebene (Kapitel 3.4).

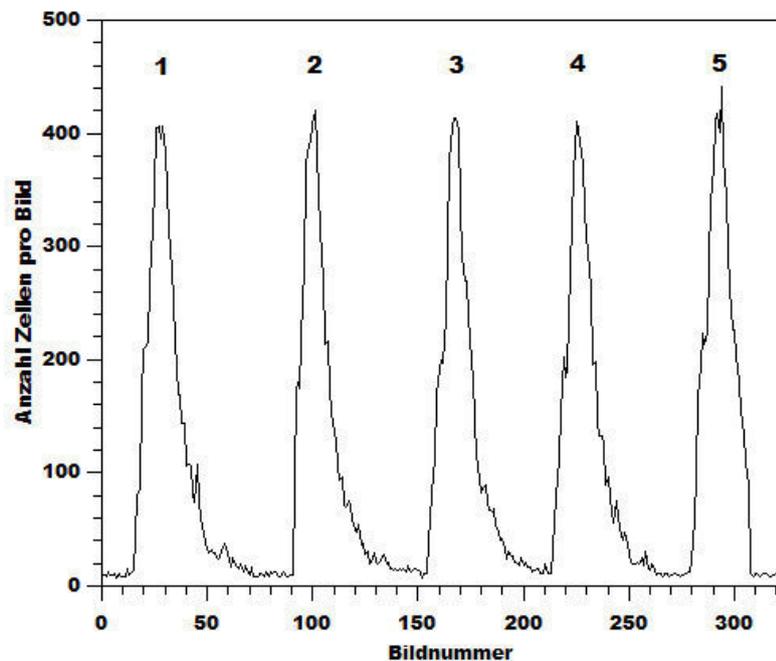


Abb. 4-4: Test der Messgenauigkeit mit automatisierter Probenahme.

Es sind fünf Proben gleicher Zellkonzentration hintereinander gemessen worden. Aus Darstellungsgründen sind die Peaks einzelner Messungen in einem Graphen zusammengeführt worden.

Die Abbildung (Abb. 4-4) zeigt einen Test der Messgenauigkeit im aufgebauten Durchflusssystem mit dem Mikroskop und der automatisierten Probenahme. Es sind fünf Proben gleicher Zellkonzentration in einem Durchgang gemessen worden. Die Peaks der einzelnen Messungen können gut miteinander verglichen werden, da ihre Form keine Hinweise auf Unregelmäßigkeiten beim Ausführen der Messungen gibt. Sie erheben sich weit über die Basislinie, beanspruchen definierbare Flächen für die

Berechnung von Integralen und sind nahezu symmetrisch. Lediglich am Abstieg nah der Basislinie bilden sich kleine Abschnitte, welche die Peaks leicht unsymmetrisch aussehen lassen [98]. Die Berechnung der Integrale über die gleiche Anzahl von Punkten ergibt folgende Zahlen (Tabelle 4-1):

Tabelle 4-1: Berechnete Integrale und Peakhöhen im Test der Messgenauigkeit.

Peak Nr.	1	2	3	4	5
Integral	6860	6216	6494	6508	6648
Peakhöhe	407	421	414	411	441

Die Berechnungen zeigen, dass die Peaks sehr ähnliche Flächeninhalte haben und somit eine gute Aussage über die Gesamtzellzahl geben können. Der Standardfehler der Integrale beträgt 105 Einheiten. In Bezug auf den Mittelwert der Integrale macht dieser Fehler etwa 1,6 % des Flächeninhaltes aus. Eine ähnliche Aussage kann auch über die Höhe der Peaks gemacht werden. Der Fehler macht auch hier etwa 1,6 % vom Mittelwert der Peakhöhe aus. Bei der Auswertung experimenteller Daten können beide Ergebnisse, nämlich das Integral eines Peaks sowie seine Höhe für die Ermittlung der Gesamtzellzahl mit einbezogen werden. Kommt es aber zu einer prozesstechnischen Störung während der Ausführung einer Messung, könnten die Peaks verformt und unsymmetrisch werden. Die Information der Peakhöhe wäre in diesem Fall nicht aussagekräftig. Deshalb werden bei den Berechnungen nur die Integrale als die Gesamtzellzahl einer Probe gewertet.

4.3.2 Bestimmung der messbaren Zellkonzentrationen

Mit dem Blick auf die bevorstehenden Messungen von Tierzellkultivierungen wird geprüft, ob sich die Proben verschiedener Zellkonzentrationen bei der Überwachung in eine gute Relation zu der Gesamtzellzahl, d. h. zu den berechneten Integralen bringen lassen.

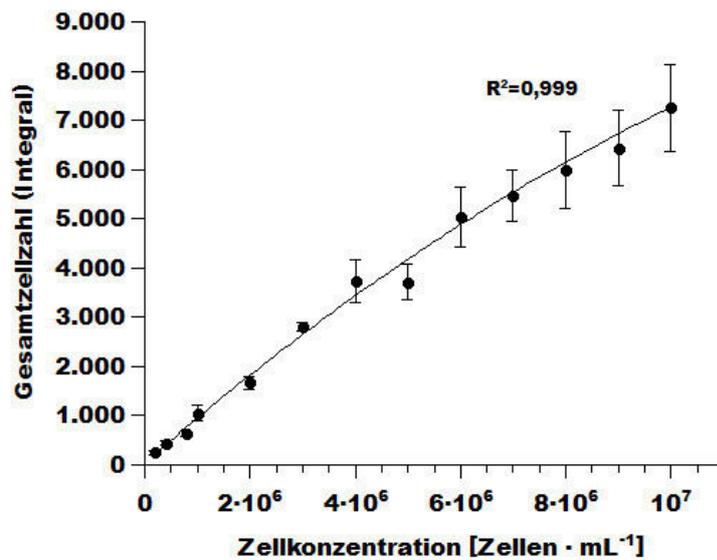


Abb. 4-5: Die Gesamtzellzahl (das Integral) der Zellen einer Probe in Abhängigkeit von Zellkonzentration.

Die Punkte repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen für jede einzelne Zellkonzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Messungen. Die Messungen wurden mit der Durchflusszelle Ibidi 100 µm durchgeführt.

Die Abbildung (Abb. 4-5) zeigt das Ergebnis der Probenmessungen verschiedener Zellkonzentrationen mit der Durchflusszelle Ibidi 100 µm unter Verwendung automatisierter Probenahme. Es sind Zellkonzentrationen im Bereich von 10^5 Zellen/mL bis 10^7 Zellen/mL aufgetragen und den jeweiligen Gesamtzellzahlen (Integralen) der bildbasierten Zellzählung zugeordnet.

Im ganzen Messbereich können die Integrale einzelner Messpunkte gut voneinander getrennt werden. Mit der steigenden Zellkonzentration wächst auch das Integral der Gesamtzellzahl. Im Bereich der kleineren Zellkonzentrationen unter 8×10^5 Zellen/mL bieten die Integrale keine zuverlässigen Informationen über die Zellkonzentration. Die Peaks dieser Proben heben sich oft kaum über die Basislinie ab. Das Ergebnis der Zellzählung mit dem Programm Graphic Analyzer kann Objekte mit einschließen, die keine Zellen sind. Das können z. B. Verunreinigungen aus toten und verklebten Zellen, mechanische Beschädigungen innerhalb oder außerhalb des Kanals der Durchflusszelle oder Anomalien im Bild sein. Deshalb ist es oft schwierig in den oben erwähnten Zellkonzentrationsbereich auf die gut hervorgehobenen Integrale zu kommen. Auf die Zellkonzentrationen ab etwa 8×10^5 Zellen/mL trifft diese Problematik nicht zu, da im Fokus der Kamera mehr Zellen zu finden sind, die einen klaren Peak ergeben. Im

Bereich der hohen Zellkonzentrationen streben die Punkte einem Grenzwert entgegen. Der Grenzwert für die Ausbreitung des Integrals ist theoretisch noch nicht erreicht. Doch die Daten, welche für die Berechnung der Integralflächen von Zellkonzentrationen um 10^7 Zellen/mL gemessen wurden, weisen darauf hin, dass die maximale Anzahl der Zellen, die in einem Bild noch detektiert und unterschieden werden können, bei ca. 800-900 Zellen mit der Kamera PCOPixelfly liegt. Diese Zahlen setzen eine Obergrenze. Die Zellkonzentrationen oberhalb von 10^7 Zellen/mL werden schwierig zu analysieren sein, ohne weiteren technischen Aufwand zu betreiben. Ein prozesstechnischer Fehler bei Positionierung der Proben führt bei der Messung im Bereich um 5×10^6 Zellen/mL zu einer Abweichung in der allgemeinen Tendenz.

Es ist festzuhalten, dass die Messung von Proben mit den Zellkonzentrationen zwischen 8×10^5 Zellen/mL und 10^7 Zellen/mL mit dem aufgebauten Mikroskop durchgeführt werden kann.

4.3.3 Messungen mit den Durchflusszellen verschiedener Tiefen

In ähnlichen Experimenten wie im Kapitel 4.3.2 werden auch die Ibidi 600 μm und Ibidi 800 μm getestet. Dabei ist hervorzuheben, dass bei der Verwendung der Durchflusszellen mit den oben genannten Kanaltiefen je nach den Einstellungen des Graphic Analyzer sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden können. Die Zellen bewegen sich in mehreren Ebenen und die Tiefenschärfe des Objektivs reicht nicht aus, um alle Zellen gleichwertig zu erfassen. Für die Auswertung in diesen Fällen ist das Programm so eingestellt worden, dass nur die Zellen detektiert werden, die sich in einer bestimmten Fokusebene befinden. Diese Zellen besitzen einen helleren Kern und können von den dunkelgrauen Zellkörpern aus anderen Ebenen mit bestimmten Einstellungen des Programms getrennt werden. Bei hohen Zellkonzentrationen um 4×10^6 Zellen/mL kann die Trennung allerdings nicht mehr genau erfolgen, da sich die Zellen aus verschiedenen Fokusebenen zu oft überlappen.

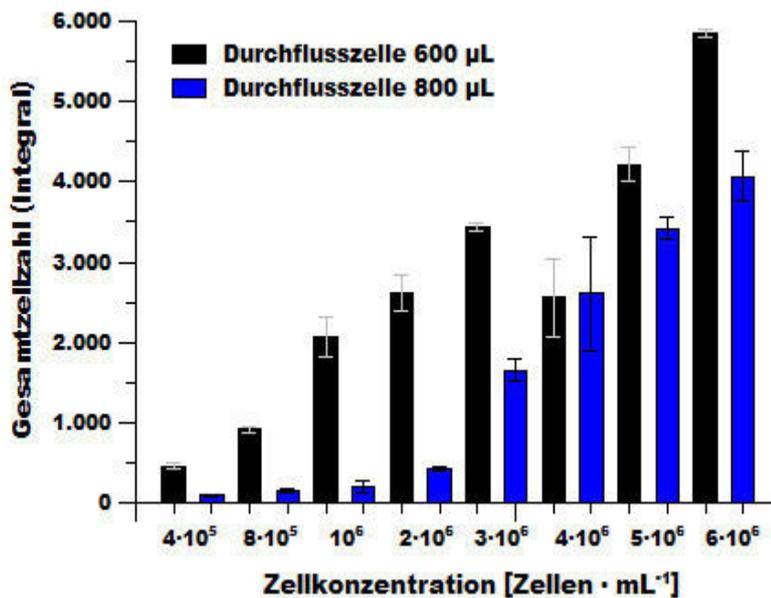


Abb. 4-6: Die Gesamtzellzahl (das Integral) der Zellen einer Probe in Abhängigkeit von Zellkonzentration in den Durchflusszellen Ibidi 600 µm und Ibidi 800 µm.

Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen für jede einzelne Zellkonzentration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Messungen.

Die Abbildung (Abb. 4-6) zeigt die ermittelten Integrale der Gesamtzellzahl in den Durchflusszellen Ibidi 600 µm und 800 µm. Der Bereich der gemessenen Zellkonzentrationen erstreckt sich zwischen 4×10^5 Zellen/mL und 6×10^6 Zellen/mL. Der allgemeine Trend zu einem höheren Integral bei Erhöhung der Zellkonzentration ist in beiden Durchflusszellen gut erkennbar. Der Übergang vom Integral zum Integral höher Zellkonzentration erfolgt bei Ibidi 600 µm sehr gleichmäßig und könnte gegebenenfalls durch eine Näherung mit Polynom niedriger Ordnung beschrieben werden. Die Ibidi 800 µm zeigt kleinere Unterschiede zwischen den Gesamtzellzahlen im Bereich von 4×10^5 Zellen/mL bis 2×10^6 Zellen/mL als die Ibidi 600 µm. Eine sprunghafte Erhöhung der Integrale erfolgt ab der Zellkonzentration 3×10^6 Zellen/mL. Ab der Messung verläuft der Anstieg der Integrale gleichmäßiger. Mit der Durchflusszelle Ibidi 800 µm könnten offenbar höhere Zellkonzentrationen untersucht werden, die oberhalb von 3×10^6 Zellen/mL liegen. Wie im Beispiel mit der Durchflusszelle Ibidi 100 µm sind auch in diesem Fall prozesstechnische Fehler aufgetreten, die für das Ergebnis bei der Durchflusszelle Ibidi 600 µm bei 4×10^6 Zellen/mL verantwortlich sind.

4.4 Fazit

Bei der Entwicklung der automatischen Probengabe konnte ein System entwickelt werden, das auf Basis eines Samplers funktioniert. Mit der entwickelten Probenahme erfolgte eine getreue Nachbildung eines Messvorgangs, der in der Realität an einem Schüttelkolben ablaufen könnte. Anhand der vorgestellten Messungen konnte gezeigt werden, dass die Durchflusszelle Ibidi 100 μm für die quantitativen Messungen einer Tierzellkultivierung am besten geeignet ist und im Konzentrationsbereich zwischen 8×10^5 Zellen/mL und 10^7 Zellen/mL zuverlässige Ergebnisse liefert. Die Form, mit der die Integrale den Anstieg von kleineren zu höheren Zellkonzentrationen aufzeichnen, kann nicht durch eine lineare Funktion beschrieben werden. Wird eine Kalibrierung durchgeführt, so muss die Anpassung durch ein Polynom erfolgen [99].

Die wichtigsten Ergebnisse der Messungen mit der Durchflusszellen Ibidi werden in der Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Bestimmung der Zellkonzentration in Durchflusszellen verschiedener Tiefen.

Chip Tiefe [μm]	Konzentration von Zellen in Suspension [Zellen/mL] (Zellkonzentration im Test)	Allgemeine Bewertung der Zelldetektion
100	200.000-10.000.000	Sehr gut bis gut für kleine und große Konzentrationen. Direkte Auswertung möglich ohne Nacharbeitung der Daten.
600	400.000-6.000.000	Gut für große Zellkonzentrationen. Ergebnisse hängen stark von den Einstellungen des Graphic Analyzers ab. Erfordert präzise Einstellung der Fokusebene. Daten erfordern große Nacharbeitung des Bildmaterials.
800	400.000-6.000.000	Gut für große Konzentrationen. Ergebnisse hängen stark von den Einstellungen des Graphic Analyzers ab. Erfordert präzise Einstellung der Fokusebene. Daten erfordern große Nacharbeitung des Bildmaterials.

Die Durchflusszellen Ibidi der Tiefe 600 μm und 800 μm konnten auch erfolgreich getestet werden. Die Tendenzen, welche die Messungen mit den Durchflusszellen aufzeichnen, reflektieren die Vergrößerung der Zellzahl-Integrale mit steigender Zellkonzentration in den Proben. Die Durchflusszelle Ibidi 600 μm besitzt im Konzentrationsbereich zwischen 4×10^5 Zellen/mL und 10^6 Zellen/mL eine relativ schlechte Trennung der einzelnen Integrale. Die Unterschiede zwischen den einzelnen blauen Säulen sind in diesem Bereich minimal (Abb. 4-6). Allerdings könnten solche Durchflusszellen für Messungen mit dem digitalen Mikroskop eingesetzt werden, wenn die Zellkonzentrationen ab 3×10^6 Zellen/mL gemessen werden und wenn die Zellzählung als Ziel im Vordergrund der Messung steht.

Die prozesstechnischen Fehler waren hauptsächlich auf die Funktionalität von FIA-Master zurückzuführen. Die Experimente wurden zum Auslöser einer gründlichen Optimierung des Programms.

5 Überwachung der Kultivierung in einem Schüttelkolben und Viabilitätsbestimmung

Dem Erfolg bei der Automatisierung von Prozessabläufen mit dem FIA-Master soll ein Experiment angeschlossen werden, bei dem die Zellsuspension einer Probe mit einem Farbstoff vermischt und im Durchfluss gemessen wird. Dabei soll der Prozentanteil lebender Zellen in der Proben bestimmen werden. Für diesen Zweck wird die Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau vermischt. Kann z. B. die Zellmembran einer toten Zelle den Farbstoff nicht zurückhalten, dringt der Farbstoff in die Zelle ein und färbt sie dunkelblau an. Im Fokus eines Labormikroskops erscheinen solche Zellen als dunkelblau gefärbt und können auf einen Blick identifiziert werden. Mit dem Programm Graphic Analyzer können solche Zellen unter anderem durch die Werte der bildlichen Entropie und den relativ kleinen mittleren Grauwert im Bild detektiert werden.

5.1 Überwachung der Kultivierung mit Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl

Für das Experiment werden exemplarisch CHO-K1-Zellen in einem Schüttelkolben kultiviert und überwacht. Dazu werden dem Schüttelkolben mit Zellsuspension in regelmäßigen Zeitabständen Proben für die Messungen mit dem digitalen Mikroskop entnommen. Die Bildaufnahmen werden mit dem Mikroskop erstellt, das über die Auflicht-Beleuchtung verfügt und auf der Rückseite der Durchflusszelle einen Reflektor besitzt (Kapitel 3.2).

Dem Schüttelkolben mit CHO-K1 werden manuell Proben entnommen. Dabei werden drei unabhängige Proben erstellt, deren Volumen 1 mL beträgt. Von jeder einzelnen Probe werden 500 μ L in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 5%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Für die Durchführung des Experiments wird ein Durchflusssystem aufgebaut, das eine Probe gemäß der im Kapitel 4.1 aufgeführten Art und Vorgehensweise aufnimmt (Abb. 5-1).

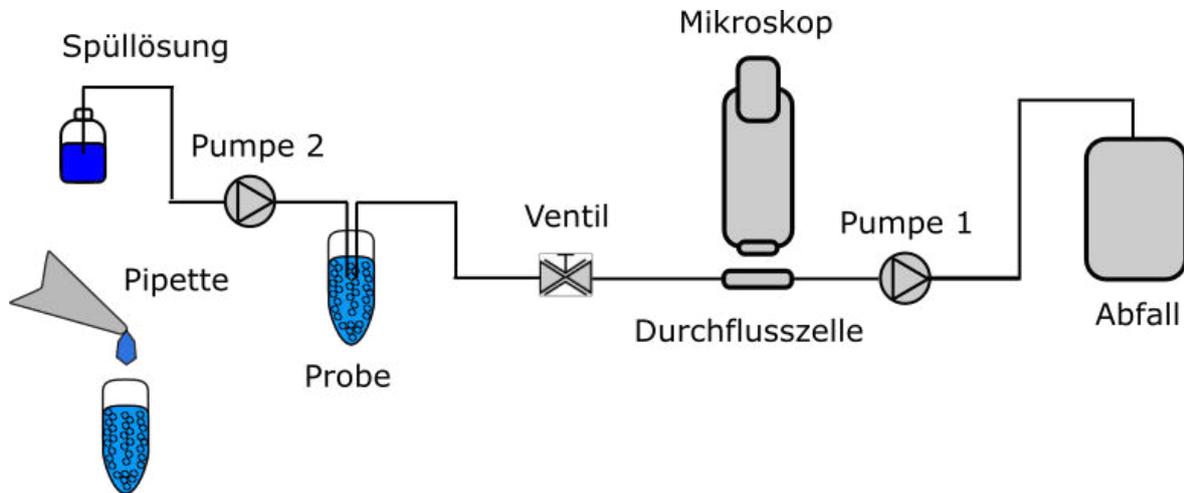


Abb. 5-1: Durchflusssystem für die Probemessung bei der Überwachung von Kultivierung mit CHO-K1.

Anhand der Ergebnisse kann der Verlauf der Kultivierung rekonstruiert werden. Dabei werden die Daten der manuellen Probenahme als die Gesamtzellkonzentration und die Konzentration toter Zellen in einem Graphen zusammengefasst. Die Daten von der Auswertung mikroskopischer Bilder werden als die Gesamtzellzahl und die Zahl toter Zellen in einem zweiten Graphen erfasst (Abb. 5-2).

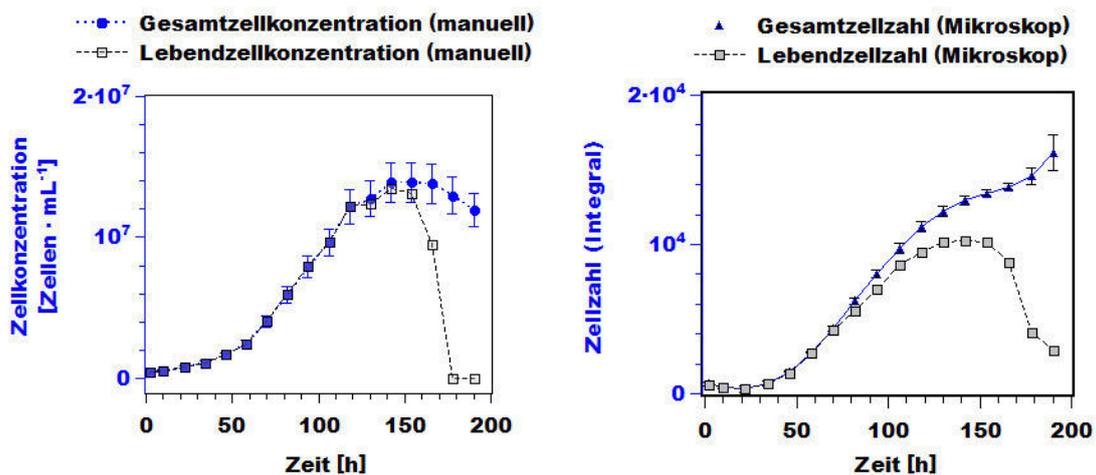


Abb. 5-2: Verlauf einer CHO-K1-Kultivierung aus Bestimmung der Gesamtzellkonzentration und Konzentration toter Zellen.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus manueller Bestimmung der Zellkonzentration und die Kurve der Gesamtzellzahl, die aus der Analyse des Bildmaterials entstanden ist. Daneben sind auch die Konzentrationen und die Zahlen toter Zellen eingetragen. Bei dem dargestellten Kultivierungsprozess handelt es sich um eine Kultivierung im Satzbetrieb. Die Zellen durchlaufen alle Wachstumsphasen, die lag-Phase zwischen 0 und 22 Stunden, die exponentielle Wachstumsphase zwischen 22 Stunden und 118 Stunden und die stationäre Phase, welche ab dem Zeitpunkt 130 Stunden mit dem zunehmenden Absterben der Zellen im Schüttelkolben zu Ende geht. Nach 178 Stunden sind keine lebenden Zellen im Schüttelkolben mehr vorhanden. Die sterbenden Zellen beginnen zu zerfallen und kleine Bruchstücke zu bilden. Während dieser Phase werden bei der manuellen Zählung nur diejenigen Objekte berücksichtigt, die noch als ganze Zellen mit klar definierter morphologischer Integrität erkennbar gewesen sind. Bei der Auftragung der Zellkonzentration gegen die Zeit spiegelt sich das in den zwei letzten Messwerten wider. Die Zellkonzentration beginnt ab 178 Stunden wieder zu sinken (Abb. 5-2, Graphik links).

Dem Ergebnis der manuellen Konzentrationsbestimmung steht das Ergebnis der bildgestützten Zellzählung gegenüber (Abb. 5-2, Graphik rechts). Die Gesamtzellkonzentration wird durch die Integrale der Zellzahl definiert, die für jede Probe aus der Auswertung von 500 Bildern berechnet worden sind. Zu jedem Zeitpunkt des Kultivierungsprozesses sind mehrere Proben hintereinander gemessen worden. Somit ergeben sich für jeden Zeitpunkt der Kultivierung insgesamt drei Integrale aus jeweils 500 Bildern. Die Kurve der Gesamtzellzahl wird durch eine Trendlinie repräsentiert, ein Polynom fünfter Ordnung, das über alle Messpunkte gezogen worden ist.

Wird die Kurve (Abb. 5-2, Graphik links) mit dem Graphen der Gesamtzellkonzentration (Abb. 5-2, Graphik links) verglichen, können Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede festgestellt werden. Die Gemeinsamkeiten liegen im Verlauf der Kurven im Bereich der erkennbaren exponentiellen Wachstumsphase. In diesem Bereich steigen die Kurven steil an. Im Gegensatz dazu sind in den Bereichen der lag-Phase und der stationären Phase Unterschiede festzustellen. Die Integrale der Proben, die zu Beginn des Kultivierungsprozesses genommen worden sind, weichen von den Daten der manuellen Messungen ab. Das liegt an der Verdünnung der Proben, die zu Beginn der

Zellkultivierung für zu niedrige Zellkonzentrationen in den Proben verantwortlich ist. Die Verdünnung ist zu groß gewesen, so dass nur wenige Zellen mit dem Mikroskop erfasst worden sind. Bei der Auswertung ergeben diese Zellen nur ein kleines Integral, das sich kaum über die Grundlinie hervorhebt (Kapitel 4.3.2). Solches Integral ist schwer von dem Grundrauschen zu trennen. Deswegen ist es in schwierig ein für den Konzentrationsbereich zuverlässige Ergebnisse aus den Bildaufnahmen zu berechnen.

Im Bereich der stationären Phase verläuft die Kurve der Gesamtzellzahl etwas steiler als der entsprechende Kurvenabschnitt der Gesamtzellkonzentration. Das liegt an der ausgleichenden Wirkung der Trendlinie und den beiden letzten Messwerten um 178 Stunden. Das Ergebnis wird von den toten Zellen und Zelltrümmern beeinflusst, die zu der Zeit vermehrt in den Proben vorliegen. Von dem Graphic Analyzer werden die Zelltrümmer toter Zellen als Zellen gewertet. Deswegen steigt innerhalb dieses Abschnitts die Gesamtzellzahl steil an.

5.2 Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten aus experimentellen Daten

Im Kapitel 5.1 ist der Kultivierungsverlauf der CHO-K1-Zellen anhand von zwei Wachstumskurven beschrieben worden. Die Wachstumskurve, die aus manueller Bestimmung der Gesamtzellkonzentration berechnet worden ist, zeigt viele Ähnlichkeiten mit dem Verlauf der Kurve der Gesamtzellezahl, die aus mikroskopischen Aufnahmen berechnet worden ist. Sind die beiden Kurven von ihrem Verlauf ähnlich, so soll es auch möglich sein aus der mikroskopisch bestimmten Zellzahlen genauso wie aus den Angaben der Zellkonzentration die spezifischen Wachstumsraten μ für jeden Zeitpunkt der Kultivierung zu berechnen. Die spezifische Wachstumsrate ist eine wichtige Kenngröße, welche die relative Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in einem Bioprozess repräsentiert und im Bereich der tierischen Tierzellkultivierung aus der Lebendzellkonzentration berechnet wird. Im Vergleich sollen zunächst jedoch die Daten genutzt werden, welche die Gesamtzellzahl und die Gesamtzellkonzentration der Messungen anzeigen.

Aus experimentellen Daten kann die spezifische Wachstumsrate zu einem beliebigen Zeitpunkt des Kultivierungsprozesses ermittelt werden. Da es sich in diesem Fall um einen Kultivierungsprozess im Satzbetrieb handelt, wird die spezifische Wachstumsrate $\mu(t)$ wie folgt berechnet [1]:

$$\mu(t) = \frac{1}{X(t)} * \frac{dX(t)}{dt} \quad (7)$$

Laut Definition ist $X(t)$ die Lebendzellkonzentration zu einem definierten Zeitpunkt der Kultivierung und $\frac{dX(t)}{dt}$ die zeitabhängige Änderung der Lebendzellkonzentration. Für den Vergleich wird für $X(t)$ die Gesamtzellkonzentration als Lebendzellkonzentration eingesetzt.

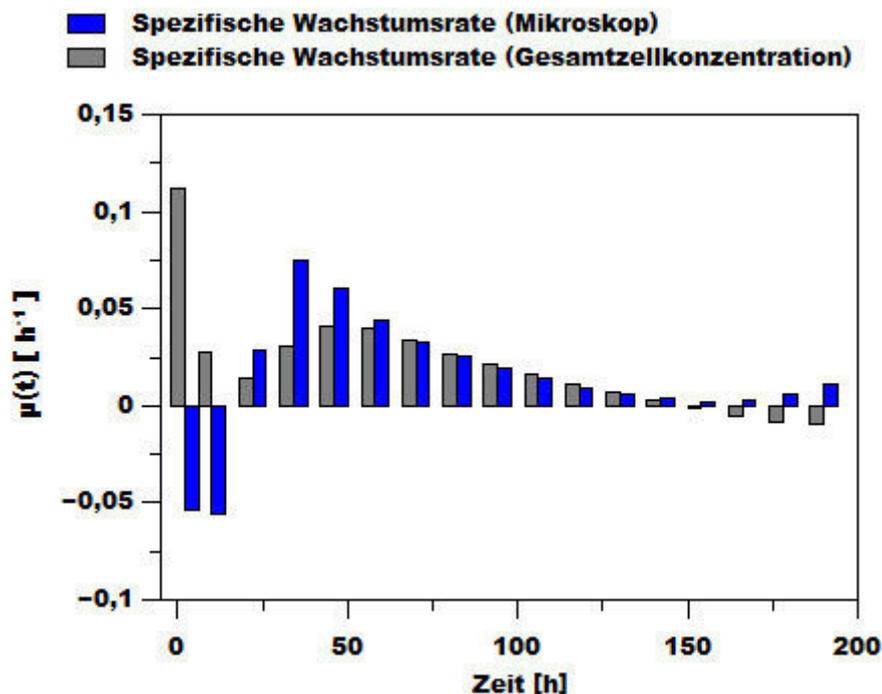


Abb. 5-3: Gegenüberstellung von $\mu(t)$ berechnet aus den Daten der Gesamtzellkonzentration (manuelle Messung) und aus Gesamtzellzahl der Bildaufnahmen (mikroskopische Messung).

Die Abbildung (Abb. 5-3) zeigt eine Gegenüberstellung der berechneten spezifischen Wachstumsraten im Kultivierungsverlauf. Die spezifischen Wachstumsraten, die anhand der Gesamtzellkonzentration und der Gesamtzellzahl berechnet worden sind, stimmen vor allem im fortgeschrittenen Stadium des Kultivierungsprozesses miteinander gut überein. Die grauen und die blauen Säulen zeigen im Bereich von 58 Stunden bis 154 Stunden sehr ähnliche Werte. Tendenziell sind die spezifischen

Wachstumsraten, die aus der Gesamtzellzahl des Mikroskops für den Bereich berechnet worden sind, etwas kleiner als die analogen Werte der manuellen Messung. Nur ab 142 Stunden ändert sich die Tendenz und die blauen Säulen werden etwas größer. Im Bereich zwischen 22 Stunden und 58 Stunden sind die blauen Säulen um etwa das Doppelte größer als die Werte der grauen Säulen.

Zwar ergibt sich tendenziell für den Verlauf der beiden Messungen dasselbe Muster, so sind aber auch Unterschiede zu Beginn und zum Ende der Messzeit zu erkennen. Bei den Messpunkten zu Beginn der Kultivierung nehmen die blauen Säulen negative Werte an. Dies liegt offenbar an den Werten der Gesamtzellzahl der mikroskopischen Messung, die für den Bereich der lag-Phase zu groß ausgefallen sind. Die Gesamtzellzahl wird in diesem Bereich aufgrund des Messrauschens und der Ungenauigkeiten bei der Auswertung der Bilder mit dem Graphic Analyzer etwas überschätzt (Kapitel 4.3.2). Aus diesem Grund ergibt sich eine negative Steigung der Trendlinie für die erste und die zweite Probenmessung ab dem Kultivierungsbeginn. Wird das negative Vorzeichen außer Acht gelassen, so kann davon ausgegangen werden, dass in dem Bereich keine wesentliche Änderung der spezifischen Wachstumsrate stattfindet. Die grauen Säulen sind zu Beginn der Kultivierung groß, passen sich aber nach etwa 12 Stunden der allgemeinen Tendenz an. Die Steigung der Trendlinie, welche die Kurve der Gesamtzellkonzentration repräsentiert, ist in der lag-Phase und vor allem zu Beginn der Kultivierung sehr steil. Nach etwa 154 Stunden nehmen die grauen Säulen negative Werte an. Dagegen steigen die blauen Säulen wieder langsam an. Beim Übergang in die stationäre Phase verringert sich die spezifische Wachstumsrate. Fangen die Zellen an abzusterben, so werden die spezifischen Wachstumsraten negativ. Bei den blauen Säulen ist genau das Gegenteil zu beobachten. Durch einen starken Anstieg der Kurve der Gesamtzellzahl im Endstadium steigen die blauen Säulen wieder an.

Es ist ersichtlich, dass aus den Daten der Gesamtzellzahl, die durch mikroskopische Messung gewonnen worden sind, nicht nur eine Nachbildung der Wachstumskurve berechnet werden kann. Vor allem die Werte $\mu(t)$ in der exponentiellen Wachstumsphase zeigen deutlich, dass mit den Daten und der gewählten Trendlinie spezifische

Wachstumsraten in guter Übereinstimmung zu den Werten $\mu(t)$ aus den Daten der Gesamtzellkonzentration berechnet werden können.

Da es sich um eine spezifische Kenngröße handelt, ist die Berechnung von $\mu(t)$ direkt aus den Integralen der Gesamtzellzahl möglich. Eine Gegenüberstellung der mikroskopischen Messdaten und der korrespondierenden Werten der Zellkonzentration ist nicht zwingend erforderlich. Sind nur die spezifischen Wachstumsraten als Ziel vom Interesse, um z. B. bei der Aufstellung von Modellen für den Verlauf eines Bioprozesses mit einbezogen zu werden, so können die mikroskopischen Daten nach einigen Experimenten auf den Verlauf der Zellkonzentration geeicht und folglich direkt für die Bestimmung von spezifischen Wachstumsraten unter Berücksichtigung der Kalibrationsdaten übernommen werden.

Gleichzeitig sollen die Werte der spezifischen Wachstumsraten aus mikroskopischen Daten differenziert betrachtet werden. Mit den bereits aufgeführten Fehlerquellen, die bei der mikroskopischen Zählung auftreten, kann die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten zu Werten führen, die nicht an die reale Bedingungen anknüpfen. Werden bei dem oben aufgeführten Vergleich die spezifischen Wachstumsraten aus manuell gewonnenen Messdaten als Werte behandelt, die absolut korrekt sind, unterscheiden sich die Höhen mancher grauen und blauen Säulen um das Anderthalb- bis Zweifache. Solche Unterschiede sind z. B. zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten und müssen rechnerisch kompensiert werden, falls sie systematisch auftreten. Außerdem handelt es sich bei dem Vergleich um die Werte, die aus den Werten der Gesamtzellkonzentration und der Gesamtzellzahl berechnet worden sind. Solche Werte sind nur dann praktisch anwendbar, wenn die Konzentration lebender Zellen nah bei 100 % liegt. Kann aus Daten der mikroskopischen Messung die Lebendzellzahl für jeden Messpunkt bestimmt werden, so können auch reale Verhältnisse bezüglich des Zellwachstums besser beurteilt werden. Spezifische Wachstumsraten könnten dann uneingeschränkt und sinnesgemäß z. B. für Modellierung eingesetzt werden. Das Mikroskop könnte dann die manuelle Zellzahlbestimmung ersetzen.

5.3 Klassifizierung der Zellen und die Bestimmung der Lebendzellzahl aus der Messung mit dem Mikroskop

Aus den Daten der optisch basierten Zellzählung können neben der Zellzahl auch noch andere Informationen zur Beurteilung der Zustände von Zellen ermittelt werden. Die Angaben wie Fläche und Exzentrizität repräsentieren zwei geometrische Größen, welche zur Klassifizierung von zweidimensionalen Objekten eingesetzt werden können. Mit ihrer Hilfe können Größe und Form der Zellen in einem Bild abgeschätzt werden. Mit den bildanalytischen Größen wie dem mittleren Grauwert und der Entropie können die Zellen als Gebilde innerhalb der erkannten Kanten einzeln beurteilt werden. Mit den Größen werden die Ausprägung der Graustufen und der Informationsgehalt eines Bildes positionsunabhängig gemessen. Einzeln können die oben erwähnten Größen nur ein eingeschränktes Bild über den Zustand einer Zelle bieten. In einigen Fällen ist es sinnvoll die Zellen bezüglich zwei der oben erwähnten Größen zu klassifizieren, um eine objektive Vorstellung über den Zustand der Zellen zu gewinnen.

5.3.1 Klassifizierung der Zellen anhand der Zellgröße und Exzentrizität

Geht es beispielweise um die Größe der Zellen und die Anzahl der Agglomerate, so können die Fläche und die Exzentrizität der Zellen kombiniert werden. Ein sehr interessanter Zusammenhang ergibt sich, wenn die Bildung von Zellagglomeraten während der Kultivierung untersucht wird.

Die Abbildung (Abb. 5-4, Graphik recht) spiegelt das Wachstum von kleinen Zellen (single cells) wider. Es ist ersichtlich, dass die Zahl der kleinen Zellen im Schüttelkolben mit der fortschreitenden Kultivierungszeit immer größer wird. Die Trendlinie steigt ähnlich der Kurve der Gesamtzellzahl an (Abb. 5-2). Die Punkte der dreifachen Messung, welche der einzelnen Messzeiten zugeordnet sind, liegen im Trend gut beieinander. Im Bereich der stationären Wachstumsphase bleibt die Weiterentwicklung erwartungsgemäß aus. Während der Absterbephase deuten die Punkten einen leichten Anstieg an, ähnlich der Kurve der Gesamtzellzahl gegen das Ende des Kulti-

vierungsprozesses. Grundsätzlich entspricht der Verlauf der Entwicklung von kleinen Zellen dem Verlauf einer idealen Wachstumskurve.

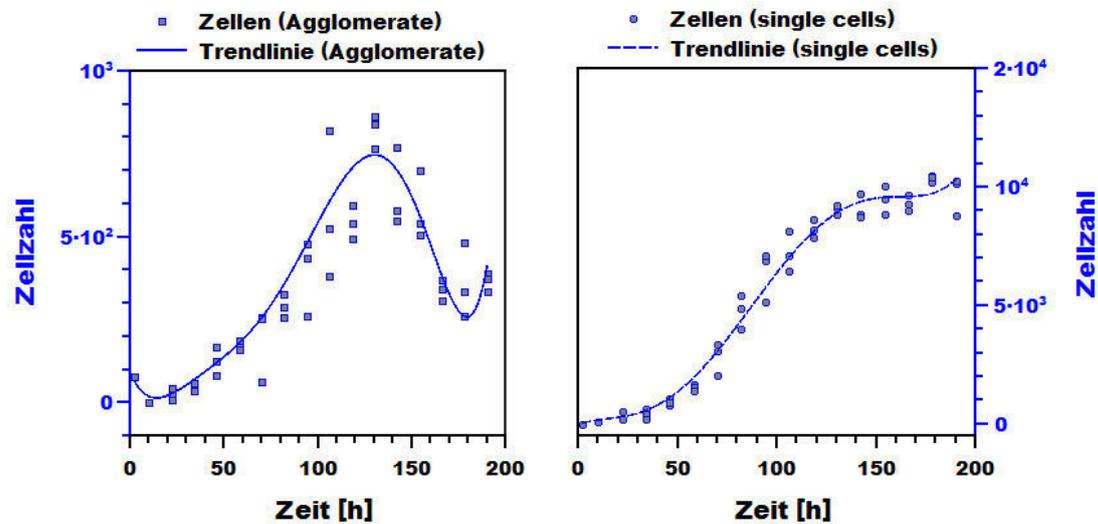


Abb. 5-4: Entwicklung der Anzahl von Agglomeraten (Graphik links) und von kleinen Zellen (Graphik rechts) im Laufe des Kultivierungsprozesses.

Die Abb. 5-4 (Graphik links) zeigt die Tendenz der Bildung von Agglomeraten im Laufe der Kultivierung. Dabei werden die Agglomerate als Objekte klassifiziert, deren geschätzter Durchmesser mehr als $30 \mu\text{m}$ beträgt und die einen Exzentrizitätswert von mehr als 2 besitzen. Der Verlauf der Trendlinie bei der Entwicklung von Agglomeraten ähnelt dem Verlauf einer Linie, welche die Lebendzellzahl repräsentieren könnte. Der Verlauf der blauen Trendlinie im Graphen rechts zeigt den Anstieg der Zellzahl bis zum Messpunkt 130 Stunden und im Anschluss einen schnellen Abfall der Anzahl von Agglomeraten. Verglichen mit den manuellen Bestimmung der Zellkonzentration (Abb. 5-2) kann zu diesem Zeitpunkt auch eine merkbare Zunahme der toten Zellen im Schüttelkolben beobachtet werden. Ab diesem Messpunkt nimmt die Entwicklung eine Wende an und die Anzahl der klassifizierten Agglomerate sinkt vom Messpunkt zum Messpunkt ab. Einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der Kurve übt dabei die Größe der klassifizierten Objekte aus. Im Schnitt sinkt der geschätzte Durchmesser von erkannten Objekten im Verlauf der Kultivierung um vier bis fünf Mikrometer, wenn die Werte zu Beginn und zu Ende des Kultivierungsprozesses miteinander verglichen werden (Anhang, Abb. 11-7). Die durchschnittliche Exzentrizität der Zellen steigt etwas zu Ende der Kultivierung an (Anhang, Abb. 11-9). Die erkannten zellähnlichen Objekte sind zum Ende der Kultivierung hin kleinere Zellen oder

Agglomerate beinah runder Form mit einem geschätzten Durchmesser von 15-17 μm und den Exzentrizitätswerten von 1,14. Die großen Zellen und Zellagglomerate mit elliptischer Form repräsentieren Zellen, die sich teilen. Sie treten zum Ende des Kultivierungsprozesses seltener auf.

Aus den Daten der Entwicklung von Agglomeraten und der Trendlinie (Abb. 5-4, Graphik links) können die spezifischen Wachstumsraten $\mu(t)$ berechnet und mit Wachstumsraten der Lebenszellkonzentration manueller Messungen verglichen werden.

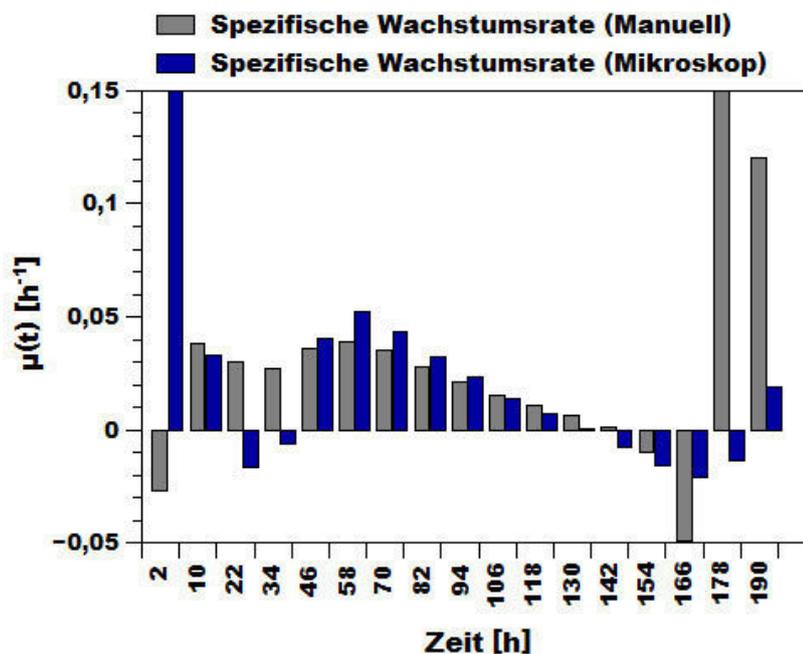


Abb. 5-5: Die Gegenüberstellung von spezifischen Wachstumsraten $\mu(t)$ aus manuellen Bestimmung der Lebenszellkonzentration (graue Säulen) und mikroskopischer Messung (blaue Säulen).

Die spezifischen Wachstumsraten der mikroskopischen Messung sind aus den Daten berechnet worden, welche die Anzahl von detektierten Agglomeraten während des Kultivierungsprozesses repräsentieren.

Der Graph zeigt eine Gegenüberstellung der spezifischen Wachstumsraten aus der manuell bestimmten Lebenszellkonzentration und der Zahl von Agglomeraten, die sich im Verlauf der Kultivierung bilden (Abb. 5-5). Genau wie im Vergleich der spezifischen Wachstumsraten aus der Gesamtzellkonzentration und der Gesamtzellzahl (Abb. 5-3) treten große Unterschiede der Werte bei den ersten vier Messpunkten zwischen 2 Stunden und 34 Stunden auf. Die blauen Säulen schwanken stark vom größten Wert beim Messpunkt 2 Stunden bis zu negativen Werten bei 22 Stunden

und 34 Stunden. Diese Schwankungen ergeben sich aus den Ungenauigkeiten der Trendlinie im Bereich der lag-Phase und dem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von Zellen. Die Werte der grauen Säulen sind in dem Bereich nur an einem Punkt zu Beginn des Kultivierungsprozesses negativ. Die Werte zwischen 10 Stunden und 34 Stunden liegen nah beieinander. In der Phase des exponentiellen Wachstums ergeben sich die gleichen Tendenzen, wie im Vergleich der spezifischen Wachstumsraten aus den Daten der Gesamtzellkonzentration und der Gesamtzellzahl. Die blauen Säulen sind zu Beginn größer als die grauen Säulen und zeigen diese Tendenz bis zum Messpunkt 106 Stunden. Bei der Graphik der Gesamtzellkonzentration (Abb. 5-3) tritt diese Wende bereits beim Messpunkt 70 Stunden auf. Das Ende des Wachstums zeichnet sich durch die niedrigen Werte der spezifischen Wachstumsraten aus, die durch graue Säulen repräsentiert werden. Die blauen Säulen gehen in den negativen Bereich ab dem Messpunkt 130 Stunden und entwickeln sich im Einklang mit den grauen Säulen ab dem Messpunkt 154 im negativen Bereich, bis die letzten Messpunkte um 178 Stunden und 190 Stunden mit übermäßig großen Werten den endgültigen Zelltod ankündigen.

Aus der oben erwähnten Beschreibung geht hervor, dass die Bildung von großen Agglomeraten und großen Zellen weitgehend im Einklang mit dem Zellwachstum verläuft. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass durch die Anzahl der Agglomerate und der großen Zellen die Werte der spezifischen Wachstumsraten mit guter Näherung an die Werte aus Daten der manuellen Messungen berechnet werden können. Dabei wird aber das Wachstum der Zellen anhand von vergleichsweise wenigen Objekten beurteilt. Sie machen bei manchen Messungen nur etwa 5-7 % der gesamten Anzahl von detektierten Zellen aus. Wie die dreifache Messung zeigt, kann die Anzahl der Agglomerate von Messung zu Messung erheblich schwanken, da es von Messung zu Messung auch eine große Vielfalt an großflächigen Agglomeraten unterschiedlicher Formen geben kann. Es ist schwer, sie zu definieren und noch einer bestimmten Klasse, wie der aus Zellgröße und der Exzentrizität zuzuordnen. Desweiteren fehlt der absolute Bezugspunkt um den klassischen Weg der Berechnung für die Zahl lebender Zellen in Prozent zu gehen. Dieser Punkt müsste definiert werden, um die berechneten Prozentangaben mit der Gesamtzellzahl in Verbindung zu bringen und aus den Daten der Gesamtzellzahl die Lebendzellzahl zu berechnen.

5.3.2 Klassifizierung der Zellen anhand bildbasierter Größen und Kennwerte

Im Folgenden wird ein Beispiel zur Berechnung der Lebendzellzahl präsentiert, das auf der Zusammenführung von Quotienten aus korrespondierenden geometrischen und bildbasierten Größen und Kennwerten beruht. Jede erkannte Zelle wird in die Berechnung der Lebendzellzahl einbezogen und erhält durch die Berechnung einen Wert C , der zur Lebend-Tot-Klassifizierung herangezogen wird.

Für die Bildung von Quotienten werden alle Größen herangezogen, welche durch die Auswertung der Bilder mit dem Graphic Analyzer gewonnen werden konnten. Dazu gehören die Fläche der Objekte A , die mittleren Grauwerte M_G , die bildliche Entropie H , die Kompaktheit K und Exzentrizität E sowie die Positionswerte mittlerer Intensitäten, der horizontale Wert P_H und der vertikale Wert P_V (Kapitel 2.4.3).

$$C = \left(\left(\frac{P_H * P_V}{A} \right)^{(M_G/H)} \right)^{(E/K)} * 10^5 \quad (8)$$

Die Basis der Berechnung bildet der Quotient aus dem Produkt der Positionswerte mittlerer Intensitäten P_H und P_V und der Zellfläche A . Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus einer geometrischen und zwei bildbasierten Größen. In der Regel werden die Zellen mit dem oben vorgestellten Mikroskop als runde Objekte mit dunklem Rand und hellem Kern dargestellt (Abb. 3-4). Je größer ein rundes Objekt ist, umso größer ist der Wert der Position entlang der horizontalen und vertikalen Achsen, der die mittleren Intensitäten im Graustufenprofil einer Zelle markiert. Die Werte der Positionen fallen bei runden Zellen nahezu gleichwertig aus. Zu Ausnahmen gehören die Zellen, bei denen große und asymmetrische Graustufengefälle auftreten. Das sind z. B. elliptische Zellobjekte, bei denen der innere helle Kern nicht mittig angeordnet ist (Anhang, Abb. 11-5). Da aus beiden Positionswerten eine flächenähnliche Angabe durch Multiplikation entsteht, kann sie mit der Fläche als gleichwertig gesetzt und in einem Quotienten untergebracht werden. Wenn der Durchschnitt dieser Werte über die Kultivierungszeit betrachtet wird, so sinkt er, wie auch die Fläche der Zellen zum Ende der Kultivierungszeit (Anhang, Abb. 11-7 und Abb. 11-11).

Ein weiterer Quotient wird aus den bildbasierten Kennwerten, dem mittleren Grauwert M_G und der Entropie H der Zellen zusammengesetzt. Das sind zwei Kennwerte, die positionsunabhängig eine Aussage über die Grauwertabstufung und den Informationsgehalt eines erkannten Zellobjektes liefern. Der mittlere Grauwert ist umso kleiner, je dunkler eine Zelle ist. Mit der Entropie kann die farbige Monotonie eines erkannten Objekts analysiert werden. Je monotoner eine Zelle im Bild ist, umso kleiner ist die Entropie, wobei sehr dunkle Zellobjekte eine kleinere Entropie aufweisen als die helleren Objekte mit schwarzer Umrandung (Anhang, Abb. 11-5, Tabelle 11-1). Beide Werte sind dimensionslos und können in einem Quotienten zusammengefasst werden. Da die Zellen im Versuch mit Trypanblau gefärbt sind, sinkt der mittlere Grauwert im Durchschnitt zum Ende der Kultivierungszeit (Anhang, Abb. 11-10). Die mittlere Werte der bildlichen Entropie steigen geringfügig an, wenn die Zellen beginnen abzusterben (Anhang, Abb. 11-12).

Noch ein Quotient wird aus den beiden Kennwerten der Rundheit, der Exzentrizität E und der Kompaktheit K gebildet. Beide Größen sind dimensionslos und werden zur Beurteilung der Zellform herangezogen. Beide Kennwerte definieren eine runde Zelle mit dem Wert 1 und steigen, wenn es sich um ein nicht rundes Objekt handelt. Bei der Analyse der Zellen fällt auf, dass die Werte der Exzentrizität in der Regel etwas größer sind als die Werte der Kompaktheit, wenn sie sich bei der Analyse auf dieselben Zellen beziehen. Ein Quotient aus den beiden Kennwerten erfüllt eine kompensierende Funktion. Wenn die beiden Kennwerte zu sehr voneinander abweichen, beeinflusst das die Beurteilung der Zelle zu Gunsten lebender oder toter Zellzahl. Während der Kultivierungszeit ändert sich der Durchschnitt der Kompaktheit und der Exzentrizität nur sehr geringfügig (Anhang, Abb. 11-8 und Abb. 11-9).

Gemäß der Formel (8) wird der Wert C für jede einzelne detektierte Zelle berechnet und das Ergebnis mit einem Schwellenwert verglichen. Liegt der Wert C einer Zelle unter dem Schwellenwert, wird sie als eine lebende Zelle gewertet. Ist der Wert größer als der Schwellenwert, wird die Zelle als tot gewertet. Das Ergebnis dieser Berechnungen wird den entsprechenden Werten der manuellen Messung in Form von Prozentanteilen zum Vergleich in einem Graphen gegenübergestellt (Abb. 5-6).

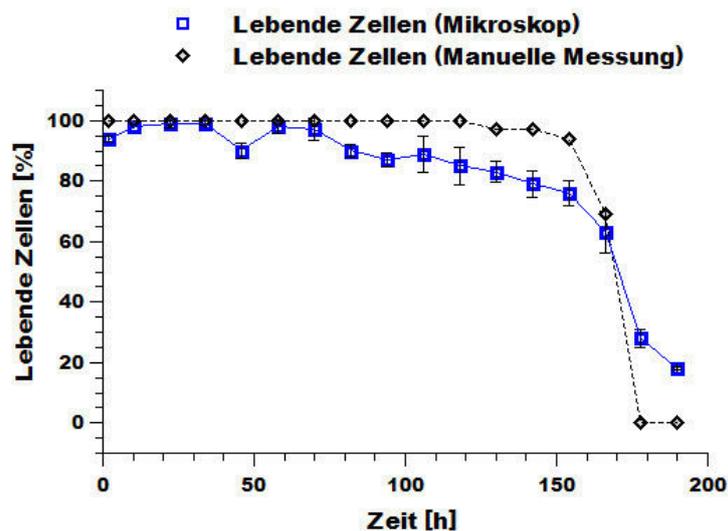


Abb. 5-6: Lebendzellzahl aus mikroskopischen Daten und manuellen Messungen.

Die Graphik repräsentiert Prozentanteile lebender Zellen. Im Vergleich werden Ergebnisse aus den Daten der manuellen Messung und Daten mikroskopischer Messungen zusammengefasst.

Die Gegenüberstellung von Prozentanteilen lebender Zellen aus Daten der mikroskopischen und manuellen Messungen zeigt, dass vergleichbare Tendenzen im Verlauf der Lebendzellzahl in Daten beider Messmethoden zu beobachten sind. Beide Graphen zeigen in einer guten Übereinstimmung den Wendepunkt im Verlauf des Kultivierungsprozesses als zum Messpunkt 130 Stunden die ersten toten Zellen im Kolben zu beobachten sind. Dieser Übergang ist am Graphen der mikroskopischen Messung schwer zu erkennen, da die vorigen Werte bereits ab dem Messpunkt 82 Stunden von der Marke 100 % abweichen. Der markante Punkt bei 166 Stunden mit 63 % lebender Zellen bei der blauen Markierung und 69 % bei der schwarzen Markierung ist bei beiden Graphen sehr gut zu erkennen. Die letzten Messpunkte um 178 Stunden und 190 Stunden zeichnen sich durch die größten Unterschiede in den Werten der beiden Messmethoden aus. Bei diesen Messpunkten sind keine lebenden Zellen in der Zellsuspension vorhanden. Durch die mikroskopischen Messungen wird der Eindruck erweckt als seien lebende Zellen im Schüttelkolben immer noch vorhanden. Bei diesen Messpunkten wirkt sich der Unterschied im Verlauf der Kurven der Gesamtzellkonzentration und der Gesamtzellzahl sehr anschaulich aus (Abb. 5-7). Die Steigung der Kurve der Gesamtzellkonzentration kehrt nach dem Durchlauf der stationären Phase um und sinkt wieder. Die Kurve der Gesamtzellzahl steigt dagegen

weiter an. Diejenigen Objekte, die keine lebenden Zellen sind, werden vom Mikroskop erfasst und im oben erwähnten Verfahren zur Bestimmung der Lebendzellzahl falsch interpretiert.

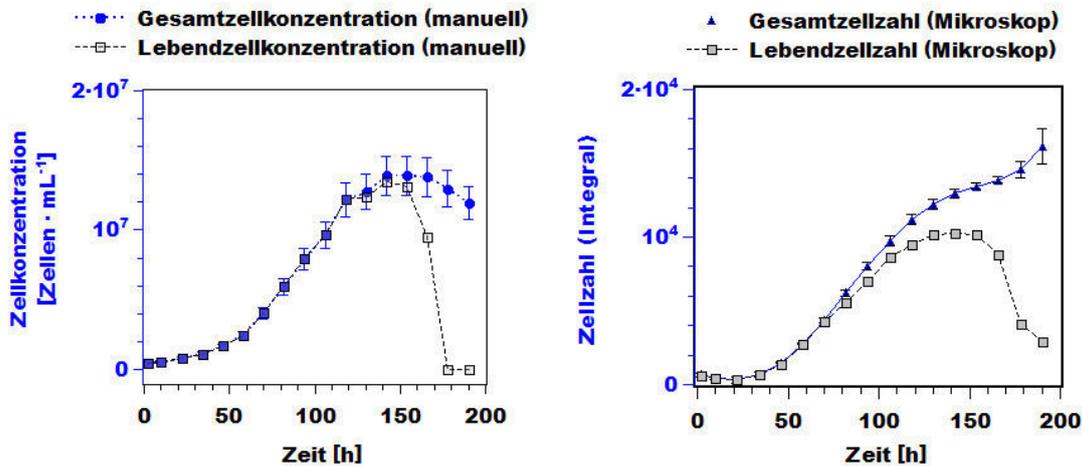


Abb. 5-7: Gesamtzellkonzentration und Lebendzellkonzentration der CHO-K1-Kultivierung. Manuelle Zählung unter Anwendung von Trypanblau-Färbung (Graphik links). Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl der CHO-K1-Kultivierung aus Daten der mikroskopischen Messung (Graphik rechts).

Dennoch konnte mit dem Verfahren zur Bestimmung der Lebendzellzahl eine einfache und annähernd genaue Kurve aufgestellt werden, welche die Lebendzellzahl im Verlauf des Kultivierungsprozesses wiedergibt.

5.4 Fazit

Im diesem Experiment wurde das Mikroskop in Verbindung mit einem Probenahme- und Durchflusssystem erfolgreich eingesetzt, um anhand von Proben und Viabilitätsfärbung das Wachstum von CHO-K1 in einem Schüttelkolben zu überwachen und zu beurteilen. Durch die wiederholende Analyse kleiner Probenmengen und die aufgenommenen Bilder konnte der Wachstumsverlauf der Zellen im Schüttelkolben rekonstruiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in der Phase des exponentiellen Wachstums aus den mikroskopischen Daten spezifische Wachstumsraten berechnet werden können, die den spezifischen Wachstumsraten aus manuell ermittelten Daten ähnlich waren. Es konnten Unterschiede bei den spezifischen Wachstumsraten in den

Phasen der Kultivierung beobachtet werden, deren mikroskopische Zellzahl von Probe zu Probe nur ungenau bestimmt werden konnte. Dies betrifft vor allem die Proben, die am ersten Tag des Kultivierungsprozesses dem Kolben entnommen wurden und die Zellkonzentrationen unter 8×10^5 Zellen/mL aufwiesen. Im diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass es sich bei den angegebenen Gesamtzellkonzentrationen um die Konzentration der Zellsuspension vor der Verdünnung mit Trypanblau handelt. Im Experiment wurden mit dem Mikroskop Proben der Verdünnung 1:2 (v/v) gemessen. Damit waren einige und tatsächlich gemessene Zellkonzentrationen kleiner und lagen nah bei den Konzentrationen, die mit dem Mikroskop nicht mehr ausreichend gut gemessen werden konnten (Kapitel 4.3.2).

Im Abschnitt der späteren stationären Phase und der Absterbephase gingen die Werte der spezifischen Wachstumsraten wieder stark auseinander. Dies ist im Allgemeinen auf die Unterschiede zwischen der Wahrnehmung des zellzählenden Beobachters und der automatischen Erfassung und Analyse von Zellen mit den vorgegebenen Algorithmen zurückzuführen. Das menschliche Auge ist fähig tote Zellen und Zelltrümmer zu unterscheiden. Mit dem Graphic Analyzer können sie nur bedingt auseinander gehalten werden, vor allem dann, wenn die Kennwerte, wie z. B. der mittlere Grauwert und die Zellgröße den Werten lebender Zellen gleichen.

Die Lebendzellzahl kann aus den mikroskopischen Daten mit guter Näherung berechnet werden. Die Entwicklung von großen Zellen und Zellagglomeraten, welche sich durch große Exzentrizität und Fläche im Bild auszeichnen, korreliert mit der Entwicklung der Lebendzellzahl während der Kultivierung. Steht z. B. die Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten im Mittelpunkt, so kann auf die Anzahl der großen Zellen und Zellagglomerate zugegriffen werden, um die Werte $\mu(t)$ zu berechnen. Stehen andere Ziele im Mittelpunkt, z. B. die Berechnung der Prozentanteile lebender Zellen, so stellt dieser Zusammenhang nicht den optimalen Lösungsweg dar. Die Bildung von Agglomeraten unterliegt Schwankungen während der Kultivierung. Es kann daher schwierig sein, einen optimalen Trend von Messung zu Messung aufzubauen. Zu große Abweichungen vom Trend können zu verfälschten Werten führen.

Mit der Bildung von Quotienten und ihrer Zusammenführung zu einem mathematischen Ausdruck für die Berechnung des Werts C ist ein guter Anhaltspunkt gegeben,

um die Lebendzellzahl und die Lebendzellkonzentration in einem Kultivierungsprozess annähernd zu bestimmen. In guter Näherung lassen sich die Zellen anhand ihrer Größe und Begebenheiten der Grauwerte als tote und lebende Zellen einstufen. Hierbei werden große Zellen und Zellobjekte mit einem hohen mittleren Grauwert begünstigt und als Lebend eigenstuft. Aber die Vielfalt der Objekte und ihre Formen sowie die Abstufung der Grauwerte folgen nicht immer dieser Regel. Mittelgroße Zellobjekte mit einem großen mittleren Grauwert und einem kleinen Entropiewert können ebenso begünstigt werden, wie die lebenden Zellen. Das kann z. B. bei Zelltrümmern der Fall sein. Die Werte P_H und P_V sind stark von der Ausrichtung der Zellen im Raum abhängig und können deshalb auch als Fehlerquelle angesehen werden. Der Wert C ist ein Wert, der innerhalb eines mathematischen Modells und bei Heranziehung probenspezifischer Daten für mikroskopische Bestimmung der Lebendzellzahl optimiert werden kann.

6 Parallelkultivierung und Überwachung der CHO-Zellen

Das Experiment soll beweisen, dass mit dem aufgebauten analytischen System relevante Daten zur Beurteilung von Kultivierungsprozessen in Schüttelkolben erhoben werden können. Die Daten sollen über die gesamte Dauer der Kultivierung automatisch aufgezeichnet werden. In diesem Experiment werden zwei Schüttelkolben mit CHO-K1-Zellen parallel überwacht. Dabei werden den Schüttelkolben mit einem Probenahme- und Durchflusssystem laufend Proben entnommen und automatisch zu den Sensoren und dem Mikroskop geführt. Mit den Daten der mikroskopischen Messung wird die Gesamtzellzahl der Proben ermittelt. Mittels der optischen Chemosensoren werden pH-Werte und Gelöstsauerstoff-Werte gemessen. Parallel zu den automatisch aufgenommen Daten werden Informationen über den Verlauf der Kultivierungen durch manuelle Probenahme gewonnen. An die Bestimmung der Zellkonzentrationen mit einer Zählkammer schließen sich Messungen der Glukose- und Laktatkonzentration sowie manuelle Bestimmung der pH-Werte an.

6.1 Automatische Überwachung von zwei Schüttelkolben

Für das Experiment wird spezielle Apparatur aufgebaut (Abb. 6-1). Über Schläuche wird an die Durchflusszelle eine piezoelektrische Pumpe 1 angeschlossen, welche über eine Leitung mit der Kaskade aus drei Tropfkammern verbunden ist. Die untere und die obere Tropfkammern der Kaskade sind steril und umschließen eine nicht sterile Tropfkammer mit optischen Chemosensoren. Die Tropfkammer besitzt am oberen Anschluss eine Düse, welche in das Innere der Tropfkammer hineinragt. An der Düse befinden sich die Spots der Sensoren, welche über optische Lichtleiterkabel mit den Transmittern verbunden sind. Bildet sich ein Tropfen an der Düse, so werden die angrenzenden Spots vollständig mit Flüssigkeit benetzt und können an der vorbeifließenden Zellsuspension messen (Anhang, Abb. 11-6).

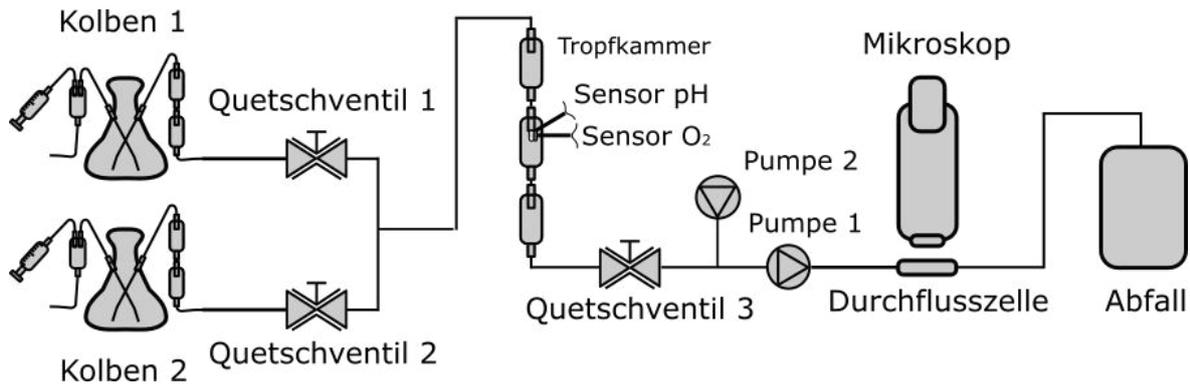


Abb. 6-1: Apparatur für die Durchführung von Parallelkultivierungen.

Durch die piezoelektrische Pumpe 1 wird die Flüssigkeit aus den Kolben gezogen und an den Spots in der mittleren Tropfkammer vorbeigeführt. Die Proben werden im Durchfluss gemessen. Die Schüttelkolben werden abwechselnd durch das Öffnen und Schließen der Quetschventile 1 und 2 für das System freigeschaltet. Ist das Ventil am Schüttelkolben 1 geöffnet, so wird das Ventil am Schüttelkolben 2 geschlossen. Die Probe fließt in die Tropfkammer mit den Sensoren, passiert die piezoelektrische Pumpe und gelangt in die Durchflussszelle, wo sie im Durchfluss mikroskopisch analysiert wird. An den Kolben befinden sich zusätzliche Anschlüsse für manuelle Probenahme. Eine kleine Kaskade aus zwei Tropfkammern trennt die Kolben als Sterilitätsbarriere von den anderen Elementen des Durchflusssystem. Vor der Durchflussszelle befindet sich ein Sperrventil, das Quetschventil 3, mit dem der Fluss zwischen der Durchflussszelle und der Tropfkammer mit Sensoren unterbrochen werden kann. Wird ein Reinigungsvorgang mit der Spritzenpumpe 2 eingeleitet, wird das Ventil geschlossen, um das Eindringen der Spüllösung in die Tropfkammern zu vermeiden.

6.2 Ergebnisse der Parallelkultivierung

6.2.1 Ergebnisse manuell durchgeführter Messungen

Im Experiment wird das Zellwachstum von CHO-K1 in zwei Schüttelkolben überwacht. Aus den Ergebnissen der manuellen Zellkonzentrationsbestimmung und den Werten aus Glukose- und Laktatkonzentrationsbestimmung werden Informationen über den Verlauf der Kultivierungsprozesse gewonnen (Abb. 6-2).

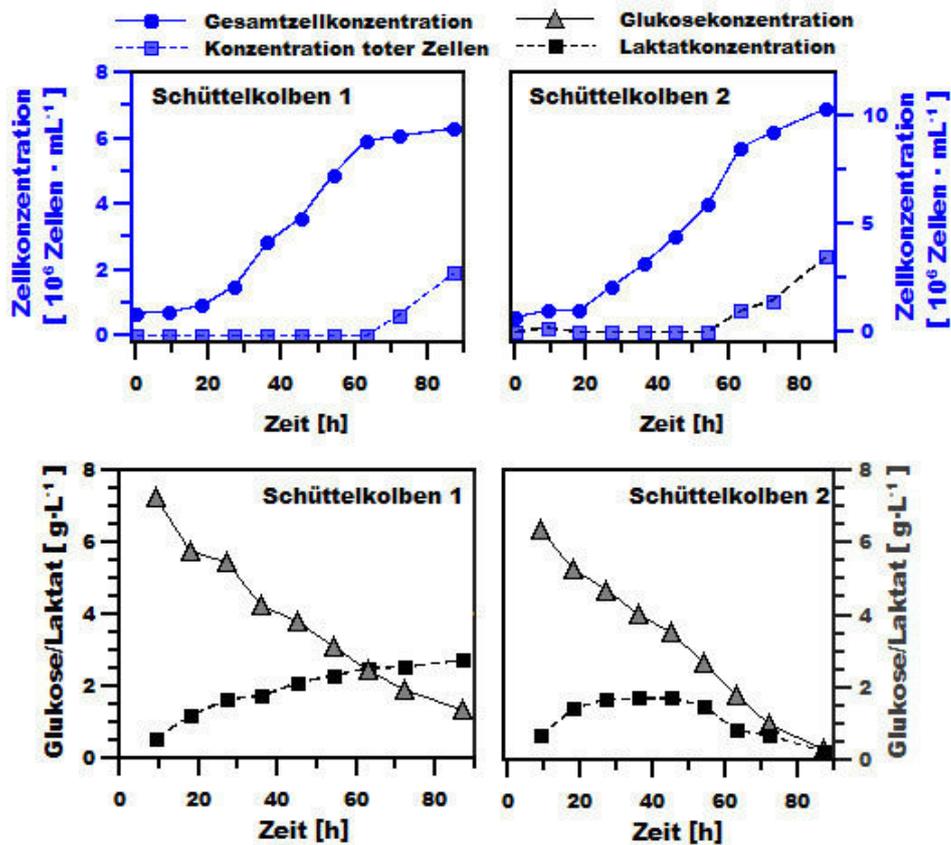


Abb. 6-2: Verlauf von Parallelkultivierung aus Messungen manuell entnommener Proben.

Die Gesamtzellkonzentration und die Konzentration toter Zellen sind in den blauen Graphen zusammengefasst. Die Änderung der Glukose- und Laktatkonzentration ist in den unteren Graphen aufgeführt.

Die Gesamtzellkonzentration im Schüttelkolben 1 erreicht $6,3 \times 10^6$ Zellen/mL innerhalb von 84 Stunden. Die Zellen im Schüttelkolben 2 wachsen innerhalb derselben Zeitspanne bis zu einer Konzentration von 10^7 Zellen/mL. In den Schüttelkolben beginnt die Konzentration toter Zellen zwischen 63 Stunden und 72 Stunden zu steigen. Sie erreicht zum Ende der Kultivierung etwa $1,9 \times 10^6$ Zellen/mL im Schüttelkolben 1 und $3,4 \times 10^6$ Zellen/mL im Schüttelkolben 2.

Das Wachstum der Zellen in den beiden Schüttelkolben zeigt drei typische Wachstumsphasen, die bei Kultivierung im Satzbetrieb auftreten. Zu Beginn der Kultivierungsprozesse zeigt sich die sogenannte lag-Phase, welche sich über einen Zeitraum von 0 - 18 Stunden ab dem Kultivierungsbeginn erstreckt. In dieser Phase nimmt die Zellkonzentration nur sehr geringfügig zu. Nach 18 Stunden der Kultivierung gehen die Zellen in eine aktive Teilungsphase über und die Zellkonzentration nimmt von

Messpunkt zu Messpunkt stark zu. Nach 63 Stunden erreichen die Zellen das Maximum ihres Wachstums und werden durch die geringere Verfügbarkeit von Nährstoffen in ihrem Wachstum limitiert. Sie gehen in die stationäre Phase über. Mit der eingetretenen stationären Phase nimmt auch die Konzentration toter Zellen in den beiden Schüttelkolben zu. Ab dem Messpunkt 72 Stunden der Kultivierungszeit steigt die Anzahl toter Zellen in beiden Kolben.

Parallel dazu sinkt die Glukosekonzentration in den beiden Schüttelkolben mit der fortschreitenden Kultivierungszeit (Abb. 6-2, Graphen unten). Dagegen verläuft die Entwicklung der Laktatkonzentration in den beiden Kolben unterschiedlichen. Im Schüttelkolben 1 steigt die Laktatkonzentration im Verlauf des Kultivierungsprozesses an. Die Zellen verbrauchen Glukose, die zu Beginn der Kultivierung in großen Mengen vorliegt und setzen Laktat frei. Im Schüttelkolben 2 beginnt dagegen die Laktatkonzentration langsam zu sinken und erreicht die Konzentration von 0,2 g/L am Ende der Kultivierungszeit.

6.2.2 Ergebnisse automatisch durchgeführter Messungen

Durch die Bildaufnahmen kann der Verlauf des Zellwachstums in den Schüttelkolben gut rekonstruiert werden. In den oberen Graphen der Abbildung (Abb. 6-3), die mit blauer Markierung die Gesamtzellzahl repräsentieren, sind Trends zu beobachten, die dem Wachstumsverlauf von Zellen im Schüttelkolben 1 (Abb. 6-2, Graphik links, oben) und im Schüttelkolben 2 (Abb. 6-2, Graphik rechts, oben) gleichen. Vor allem wurden der Beginn der Kultivierung und die Wachstumsphase in guter Näherung erfasst und abgebildet. Werden die Kurven der mikroskopischen Zellzahlbestimmung mit den analogen Werten der Gesamtzellkonzentration genauer verglichen, so sind auch Unterschiede, z. B. am äußersten Beginn der Kultivierungszeit feststellbar. Die Gesamtzellzahl der mikroskopischen Messungen zwischen den Messpunkten 0 Stunden und 18 Stunden ist nicht genau ausgefallen. Da in diesem Zeitabschnitt die Zellkonzentrationen in den beiden Kolben unter 8×10^5 Zellen/mL gemessen wurden, könnte dies auf die bereits erwähnte Ungenauigkeit bei dem Messen kleiner Konzentration mit dem Mikroskop zurückzuführen sein.

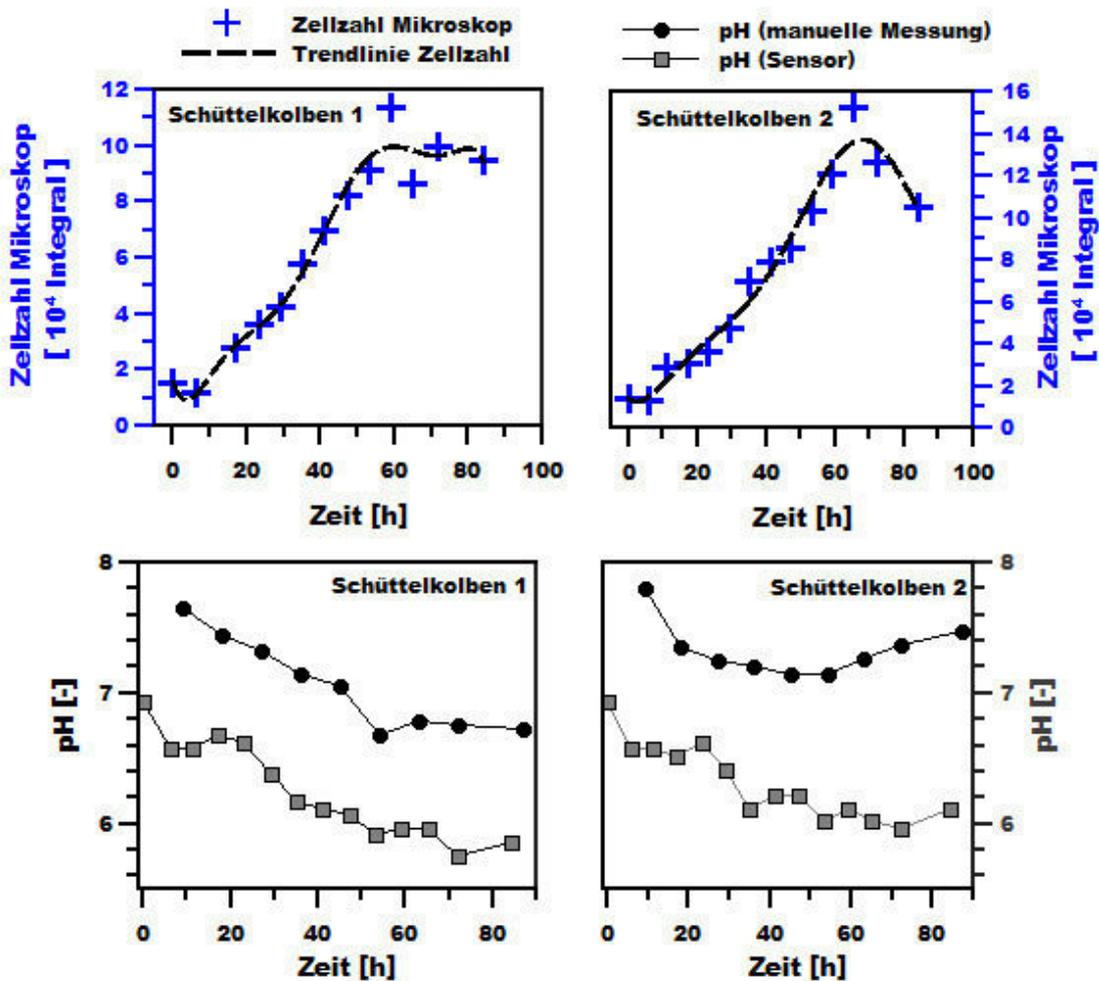


Abb. 6-3: Verlauf von Parallelkultivierung aus Messungen automatischer Probenahme.

Die Gesamtzellzahl aus mikroskopischen Daten vom Schüttelkolben 1 (Graphik links, oben) und dem Schüttelkolben 2 (Graphik rechts, oben). Die pH-Messung mit dem optischen Sensor für den Schüttelkolben 1 (Graphik links, unten) und den Schüttelkolben 2 (Graphik rechts, unten). In den Graphen sind neben der automatischen Messung mit dem Sensor auch die pH-Werte der Referenzmessung mit einer pH-Elektrode eingetragen.

Die exponentielle Wachstumsphase und der Übergang zur stationären Phase verlaufen erwartungsgemäß gut und korrelieren mit Daten der manuellen Messungen. Ab dem Messpunkt 59 Stunden beginnen die Werte der mikroskopischen Zählung stärker zu streuen.

Zum Zeitpunkt 65 Stunden werden sehr hohe Zellzahl-Werte in den beiden Kolben aufgenommen. Aus darauf folgenden Messungen ergaben sich Werte, welche stark streuen. Sie kündigen die stationäre Phase im Verlauf des Zellwachstums an. Nur im Schüttelkolben 2 bricht noch der letzte Wert beim Zeitpunkt 84 Stunden aus der allgemeinen Tendenz heraus.

Zum Messpunkt 65 Stunden bildete sich in den Kolben eine große Schaumschicht. Die einzelnen Luftblasen gelangten oft in das Durchflusssystem und störten das Mikroskop bei der Detektion.

Mit der durchgeführten morphologischen Untersuchung und Größenanalyse der Zellobjekte konnten keine nachweisbaren Abweichungen der Zellform und Zellgröße während der Kultivierung festgestellt werden (Anhang, Abb. 11-14).

Bei der Messung der pH-Werte in den beiden Schüttelkolben (Abb. 6-3, untere Graphen) kann wie erwartet eine Absenkung der pH-Werte ab dem Beginn der Kultivierung festgestellt werden. Nach etwa 41 Stunden der Kultivierungszeit werden aber die Unterschiede zwischen zwei Kolben auffälliger. Der pH-Wert im Schüttelkolben 1 sinkt deutlich ab, erreicht die Marke 6 und überquert sie zum Ende der Kultivierungszeit. Im Schüttelkolben 2 wird der pH-Wert von 6 erst bei dem Messpunkt 65 Stunden erreicht. Zum Ende des Kultivierungsprozesses steht der pH-Wert deutlich bei der Marke 6,12.

Die Vergleichsmessungen mit der pH-Elektrode decken die gleichen Unterschiede beim Vergleich der pH-Werte auf. Im Schüttelkolben 1 sinkt der pH-Wert mit fortschreitender Zeit und im Schüttelkolben 2 zeigen die Messungen einen Anstieg ab dem Messpunkt 63 Stunden an. Der Anstieg ist aus den Messungen mit dem optischen Sensor etwas schlechter zu erkennen als aus den Messungen mit der pH-Elektrode.

Mit dem Beginn der Kultivierung nimmt der pH-Wert im Schüttelkolben 1 kontinuierlich ab, was auf die Bildung von Laktat hinweist. Im Schüttelkolben 2 sinkt der pH-Wert auch kontinuierlich innerhalb der lag-Phase und der Phase des exponentiellen Wachstums ab. Aber noch während der exponentiellen Wachstumsphase steigt der pH-Wert wieder an. Das deutet darauf hin, dass noch während der exponentiellen Wachstumsphase Laktat im Schüttelkolben 2 verbraucht wird.

6.3 Beurteilung der Überwachungsdaten

Aus den experimentellen Daten geht hervor, dass sich die Zellen in einem Schüttelkolben auf den Verbrauch von Laktat umstellen. Somit wird das Zellwachstum im Schüttelkolben 2 selbst dann gefördert, wenn die Hauptnährstoffe, wie z. B. Glukose zum Ende des Kultivierungsprozesses begrenzt zur Verfügung stehen. Es stellen sich mit dem Verbrauch von Laktat ungleiche Kultivierungsbedingungen in den Kolben auch deshalb ein, weil die Laktatkonzentrationen für unterschiedliche pH-Werte in den beiden Schüttelkolben verantwortlich sind.

Eine Umstellung auf den Verbrauch von Laktat findet im Schüttelkolben 1 nicht statt. Dieser Unterschied produziert ungleiche Milieubedingungen für die Zellen in den beiden Schüttelkolben voraus. Da die Kolben zu Beginn der Kultivierung mit dem gleichen Mediumvolumen ausgestattet worden sind und die Zellkonzentrationen zu Beginn der Kultivierung annähernd übereinstimmten, könnte die Umstellung auf den Verbrauch von Laktat im Schüttelkolben 2 auf einen externen Einfluss zurückzuführen sein. Der Verbrauch von Laktat durch Zellen und seine Nutzung unmittelbar für die ATP-Produktion setzen eine gute Verfügbarkeit von Sauerstoff voraus [100; 101]. Folglich muss im Schüttelkolben 2 eine bessere Begasung des Kultivierungsmediums stattgefunden haben. Im folgenden Graphen sind die Ergebnisse der Bestimmung von gelöstem Sauerstoff in den Kolben mit dem optischen Sensor dargestellt (Abb. 6-4).

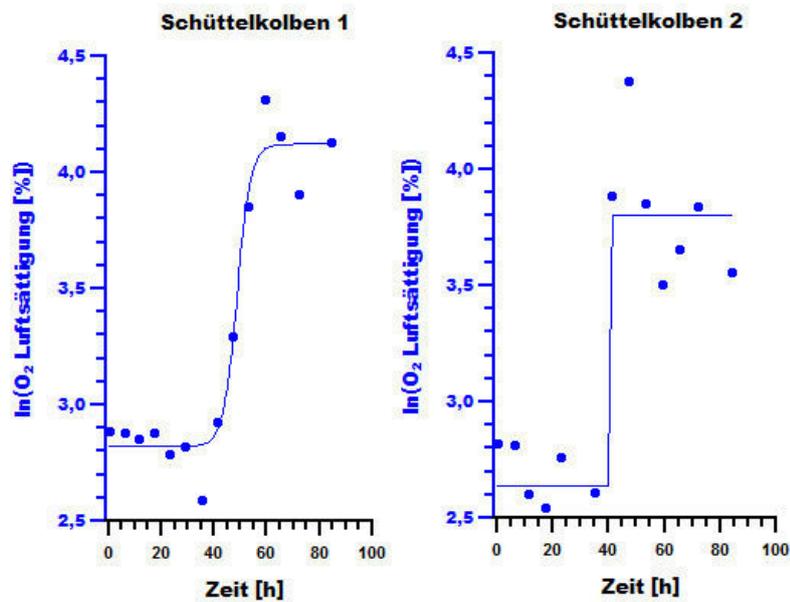


Abb. 6-4: Sauerstoffkonzentrationen während der Parallelkultivierung.

Die einzelnen Werte sind in Form von logarithmierten Werten der O_2 -Luftsättigung [%] eingetragen.

Die logarithmierten Werte des als Luftsättigung angegebenen Sauerstoffgehaltes sind gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu sehen, dass diese Werte für die beiden Schüttelkolben zu Beginn der Kultivierung gering ausgefallen sind. Die Werte liegen zwischen den Marken 2,6 und 2,9. Ab dem Messpunkt 41 Stunden sind die logarithmischen Werte schlagartig angestiegen. Im Schüttelkolben 1 erfolgt dieser Anstieg aber langsamer als im Schüttelkolben 2. Den Zellen im Schüttelkolben 2 steht ab der Zeit mehr Sauerstoff zur Verfügung und sie können Laktat verbrauchen.

6.4 Fazit

Die Überwachung von Parallelkultivierungen mit dem Mikroskop und den optischen Chemosensoren bestätigt in Verbindung mit den manuell durchgeführten Messungen die Unterschiede im Wachstum von CHO-K1-Zellen in zwei parallel überwachten Schüttelkolben.

Im Schüttelkolben 1 wachsen die Zellen während der Kultivierung bis zu einer Zellkonzentration von $6,3 \times 10^6$ Zellen/mL und bis 1×10^7 Zellen/mL im Schüttelkolben 2. Die erreichten Integrale der Gesamtzellzahl betragen $9,7 \times 10^4$ - $9,9 \times 10^4$ im Schüttel-

kolben 1 und $1,20 \times 10^5$ – $1,26 \times 10^5$ im Schüttelkolben 2 zum Ende der Kultivierungszeit. Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Zellen im Schüttelkolben 2 im Laufe der Kultivierung eine höhere Gesamtzellkonzentration erreicht haben als die Zellen im Schüttelkolben 1. Mit den Messungen der Glukose- und Laktatkonzentrationen sind Daten erhoben worden, mit denen sich eine Umstellung der Zellen auf den Verbrauch von Laktat im Schüttelkolben 2 belegen lässt. Diese Umstellung auf den Laktatverbrauch im späteren Abschnitt der exponentiellen Wachstumsphase ist bei CHO-Zellen bekannt und kann unter anderem von der Sauerstoffverfügbarkeit und dem Grad der Begasung abhängen. Die Bestimmung der pH-Werte mit dem optischen Sensor und der pH-Elektrode hat Hinweise auf diese Umstellung gegeben. Mit steigender Laktatkonzentration werden die pH-Werte kleiner. Der Verbrauch von Laktat bewirkt eine Erhöhung der pH-Werte. Diese Änderungen sind im Verlauf der Kultivierungszeit zu beobachten und in Rahmen der Übersicht an den Messungen mit der pH-Elektrode besser erkennbar als an den Messungen mit dem optischen Sensor. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Wirkung des Puffers im Medium sein. Die Schüttelkolben und die Apparatur befinden sich in einem Brutschrank, der ständig mit Kohlenstoffdioxid begast wird. Dies könnte eine genaue Bestimmung der pH-Werten mit dem optischen Sensor erschwert haben.

Möglicherweise ist die Umstellung der Zellen auf die Verstoffwechslung von Laktat darauf zurückzuführen, dass der Schüttelkolben 1 mit der automatischen Probenahme etwas langsamer geleert worden ist als der Schüttelkolben 2. Die Probenahme führte zu der Vergrößerung des flüssigkeitsfreien Volumens im Schüttelkolben 2 und stellte somit mehr Fläche und Volumen für die Ausbreitung des flüssigen Mediums bei Ausschwenkung auf der Schüttelplattform. Innerhalb weniger Stunden konnte das Medium viel besser durchmischt werden und mehr Sauerstoff aufnehmen. Diese Sauerstoffverfügbarkeit innerhalb kürzerer Zeit könnte die Zellen in die Lage versetzt haben Laktat aus dem Medium in den Stoffwechsel einzubinden.

Der Schüttelkolben 2 ist programmtechnisch immer der erste Schüttelkolben gewesen, dem automatisch eine Probe entnommen worden ist. Tritt ein Fehler während der automatischen Probenahme auf, wird der Schüttelkolben 2 auch immer als erster Kolben wieder für die Probenahme geschaltet. Da im Verlauf des Experiments solche

Fehler zu Beginn der Kultivierung aufgetreten sind, entsteht der ungleichmäßige Füllstand in den beiden Schüttelkolben.

Die automatische Probenahme und die automatische Datenaufzeichnung haben ihre Funktion erfüllt und eine solide Basis für die Beurteilung des Zellwachstums in zwei Schüttelkolben bereitgestellt. Die in sich geschlossene und einheitliche Steuerung aller Elemente im Durchfluss- und Probenahmesystem sowie die Synchronisierung mit dem In-situ Control haben die Aufzeichnung von repräsentativen Daten mit dem digitalen Mikroskop ermöglicht. Nach einigen Probeläufen zu Beginn der Kultivierung hat die aufgebaute Anlage über die gesamte Zeitdauer einwandfrei und zuverlässig funktioniert. Gelegentlich ist die Steuerung abgeschaltet worden, um die Durchflusszelle von Luftblasen zu befreien und die Spritze der Spritzenpumpe mit der Spüllösung zu beladen.

Die Technik zur Anordnung der optischen Chemosensoren an einer Tropfkammer und die Messungen der abtropfenden Zellsuspension haben die Erwartungen erfüllt. Mit den Sensoren konnten relevante Daten für die Beurteilung der Kultivierungen gewonnen werden ohne die aufgebaute Apparatur einer Kontaminationsgefahr auszusetzen. Die Bedingungen, die Messungen in einer luftgefüllten Tropfkammer und in einem Inkubator negativ beeinflussen könnten, sind die hohe Luftfeuchtigkeit und eine hohe Konzentration an Kohlendioxid. Außerdem bildet sich während der Kultivierung auch viel Schaum in den Schüttelkolben. Dadurch können manche Proben viele Luftblasen enthalten. Das Medium mit viel Schaum wird an den Sensoren vorbeigeführt und die Proben können die Spots nicht ausreichend mit Flüssigkeit benetzen. Die Messung wird verfälscht.

Durch die automatisierte Überwachung des Zellwachstums mit dem Mikroskop und den optischen Chemosensoren konnten mögliche Unterschiede der Kultivierungsverläufe in zwei Schüttelkolben festgestellt werden. Die automatischen Messungen der Zellkonzentration, der pH-Werte und die Bestimmung des gelösten Sauerstoffgehaltes brachten Ergebnisse, welche direkte Hinweise auf die Umstellung des Zellenstoffwechsels auf den Verbrauch von Laktat im Schüttelkolben 2 gegeben haben. Allerdings sind diese Hinweise nur in Verbindung mit manuell gewonnenen Daten wie z. B. die Bestimmung der Laktatkonzentration, richtig interpretierbar.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich Techniken und Methoden entwickelt, die eine automatische Überwachung von tierischen Zellen in Suspensionskulturen ermöglichen. Das Kernelement ist ein digitales Mikroskop, dessen systematische Entwicklung und Erprobung durch technische Neuerung und unter Verwendung von Zellen aus Suspensionskulturen der CHO-K1 begleitet worden ist. Ein wichtiges Merkmal des Mikroskops ist die Visualisierung von Zellen mit Auflicht-Beleuchtung und einem Reflektor (Kapitel 3.2). Im automatischen Betrieb produziert das Mikroskop Bildsequenzen, die zur Weiterverarbeitung mit dem verbesserten Algorithmus des Bildverarbeitungsprogramms Graphic Analyzer bereitgestellt werden. Mit den entwickelten Probenahme- und Durchflusssystemen als auch mit den optischen Chemosensoren ist das Mikroskop zum hochwertigen Überwachungssystem für Suspensionskulturen ausgebaut worden. Es konnte gezeigt werden, dass mittels spezieller Durchflusszellen und piezoelektrischer Pumpen die Proben aus einem Schüttelkolben effizient für die mikroskopische Analyse bereitgestellt werden können. Damit können nicht nur zuvor präparierte Proben, sondern auch kleine Probenmengen aus laufenden Kultivierungen erfolgreich untersucht werden.

Am Beispiel der Kultivierung von CHO-K1 konnte die Effektivität der bildbasierten Analyse bestätigt werden. Die Gesamtzellkonzentrationen, die mit dem Mikroskop gemessen werden können, nehmen den Konzentrationsbereich von 8×10^5 Zellen/mL bis 1×10^7 Zellen/mL ein (Kapitel 4.3.2). Bei der mikroskopischen Analyse stehen diesen Zellkonzentrationen die Integrale der Zellzahl gegenüber, die bei der Durchführung einer Kalibration durch ein Polynom beschrieben werden könnten. Durch experimentelle Arbeiten konnten mit dem Mikroskop die Zellen bezüglich ihrer Größe, Form und Agglomeration analysiert werden (Kapitel 5.3). Es konnte festgestellt werden, dass diese Eigenschaften mit der Zellteilung und der Zellviabilität im direkten Zusammenhang stehen. Die Eigenschaften sind messbar und können kombiniert werden, um eine klare Aussage über den Verlauf eines Kultivierungsprozesses fällen zu können. Vor allem die Zellgröße und die Exzentrizität der Zellobjekte konnten viel zur Beurteilung eines Kultivierungsprozesses beitragen. Die Zellen werden kleiner

und besitzen kleine Exzentrizitätswerte, wenn sie zum Ende der Kultivierung abzustarben beginnen. Die Viabilität der Zellen kann bei Färbung mit Trypanblau unter anderem auch durch bildgebende Kennwerte, wie den mittleren Grauwert und die bildliche Entropie ermittelt werden.

Im Laufe der Entwicklungsarbeit wurden die Programme für Bildverarbeitung und Ansteuerung gründlich überarbeitet und optimiert. Das Graphic Analyzer ist mit zusätzlichen Funktionen ausgestattet worden. Dazu gehören z. B. der Entropie- und der Exzentrizitätsfilter. Eine weitere neue Funktion ist das Weichzeichnen, mit der die Detektion von Zellen in stark verrauschten Bildern möglich geworden ist. Die neuen Filter waren unentbehrlich bei der Analyse von Bildern und für Eliminierung von unerwünschten Objekten, die fälschlicherweise als Zellen hätten erkannt werden können. Mit dem verbesserten Steuerungsprogramm FIA-Master konnten die Durchfluss- und Probenahmesysteme nach dem Prinzip der Zeitschaltung angesteuert werden. Das Programm macht die eigenständige Ausführung von Messaufgaben zu einem beliebigen Zeitpunkt und über mehrere Tage möglich. Auch das Programm In-situ Control hat im Laufe des Projekts eine wichtige Modernisierung erfahren. Es wurde mit einer Fernsteuerungsoption ausgestattet und mit dem Programm FIA-Master gekoppelt. Damit konnte das Programm bei den Langzeitmessungen und den durchgeführten Überwachungen von Parallelkultivierungen ohne menschliches Eingreifen aktiviert und deaktiviert werden.

Das alles trug zum Aufbau eines Überwachungssystems bei, mit dem das Zellwachstum in zwei Schüttelkolben gleichzeitig überwacht wurde. Mit Hilfe der entwickelten sterilen Probenahme konnten die Proben erfolgreich gemessen werden, ohne dass die Kulturen kontaminiert war. Bei den Kultivierungen konnte auf die Nutzung von Antibiotika verzichtet werden. Der Probenfluss erfolgte über eine Tropfkammer, die mit optischen Chemosensoren ausgestattet war. In Verbindung mit den Sensoren und den parallel durchgeführten manuellen Messungen der Laktat- und Glucosekonzentrationen wurde ein solider Datensatz gesammelt. Dieser beschrieb das Wachstum der Zellen in den beiden Schüttelkolben. Damit konnte eine Umstellung von Zellen auf den Verbrauch von Laktat in einem Schüttelkolben nachgewiesen werden. Die Be-

stimmung der Zellzahl mit dem Mikroskop ergab für beide Schüttelkolben klare Wachstumskurven vor allem für die exponentielle Wachstumsphase (Kapitel 6).

Mit den entwickelten Probenahme- und den Durchflusssystemen sowie dank der durchgeführten Automatisierung sind optisch basierte Zellzähler und Zytometer entstanden, die in Verbindung mit einem Sampler zur automatischen Probenanalyse eingesetzt werden können. In Verbindung mit den optischen Sensoren erfolgte der Aufbau eines automatischen At-line Systems für Probenanalyse.

8 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden die Weichen für die Entwicklung eines vollautomatischen digitalen Mikroskops und mehrerer Probenahmesysteme gestellt, um das Wachstum tierischer Zellen zu überwachen. Mit dem Rückblick auf die Ergebnisse der durchgeführten Experimente kann davon ausgegangen werden, dass das entwickelte digitale Mikroskop künftig in Kombination mit anderen Messgeräten bei der Überwachung von biotechnologischen Prozessen eingesetzt wird. Abgesehen von einigen Nachteilen, wie z. B. der Dauer der Bildanalysen, ist das Mikroskop ein solides optisch basiertes Gerät für die automatische Bewertung und Dokumentierung von Tierzellkultivierungen. Mit solchen Geräten können Zellen in Bildern betrachtet und gleichzeitig analysiert werden, was den Vorteil hat, dass die Ergebnisse anhand konkreter bildlicher Strukturen kritisch beurteilt werden können. Digitale Mikroskope, die als Zellzähler und Zytometer eingesetzt werden, bedürfen in erster Linie einer fortgeschrittenen Steuerungs- und Bildverarbeitungssoftware, welche die Bilder in Echtzeit aufnehmen und die Mengen der Zellobjekte analysieren kann. Ein robuster Algorithmus für die Auswertung der Bildaufnahmen könnte die notwendige Zeit für die Bildverarbeitung erheblich verkürzen und die Auswertung von großen Bildsequenzen weiter verbessern. Das digitale Mikroskop könnte zukünftig mit einigen automatischen Einstellungsoptionen optimiert werden. Dazu gehören z. B. ein Autofokus bzw. die Möglichkeit das Mikroskop bei der Scharfeinstellung in einer Fokusebene zu fixieren. Auch modernisierte und verbesserte Durchfluss- und Probenahmesysteme könnten die Leistung von Mikroskopen verbessern.

Optische Messinstrumente sind attraktiv für die Biotechnologie und werden mit der Weiterentwicklung auf optischer, material- und programmiertechnischer Ebenen für immer bessere und präzisere Ergebnisse sorgen. Die Geräte werden nicht nur besser, sondern auch preisgünstiger. Für biotechnologische- und pharmazeutische Industrie werden solche Instrumente gemäß der gestellten Anforderung und der Nachfrage immer bestimmte Preis- und Leistungskriterien erfüllen. Aber bereits heute ist es möglich mit relativ kleinen Investitionen Mikroskope für optisch basierte Zellzählung

und bildbasierte Zytometrie zu bauen, welche z. B. die Kamera eines Smartphones nutzen, um Bilder zu akkumulieren.

9 Materialien und Methoden

9.1 Mikroskopobjektive

Die Planung und der Aufbau von Mikroskopen fanden in Kooperation mit der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie statt.

Tabelle 9-1: Teileliste des Mikroskops

Teilbezeichnung	Beschreibung
Tubus	Material: Messing Länge: 147 mm Außendurchmesser: 35 mm Innendurchmesser: 25 mm
C-mount Adapter	Material: Messing Länge mit Gewinde: 25 mm Durchmesser Gewinde: Gewinde 33 mm; C-mount Innendurchmesser: 15 mm
Adapter-Objektiv	Material: Messing Länge: 28 mm Außendurchmesser: 28 mm Durchmesser Gewinde: 25 mm; Objektivseite: 20,32 mm
Mikroskopfuß	Material: Titan Länge 120 mm Breite: 80 mm Tiefe: 12 mm

9.2 Berechnung der Abbildungsmaßstäbe

Für die Berechnung des Abbildungsmaßstabes wurde die Zählkammer Neubauer *improved* 0,1 mm vor dem Objektiv des Mikroskops positioniert. Die Positionierung des Gitters erfolgte so, dass die Quadrate (50 μm Kantenlänge) das Gesichtsfeld des Mikroskops ausfüllten. Anschließend wurden die Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP auf der Pixelebene untersucht. Insgesamt wurden bei 6 Flächen von jeweils 250 μm Kantenlängen in horizontale und vertikale Richtung bestimmt und die Bildpixel ausgezählt. Die Größe der Abbildung wurde anschließend anhand der Bildpixelzahl und der berechneten Kantenlängen der Abbildung bestimmt.

9.3 Mikroskopobjektive

Für das Experiment wurde folgende Apparatur aufgebaut (Abb. 9-1):

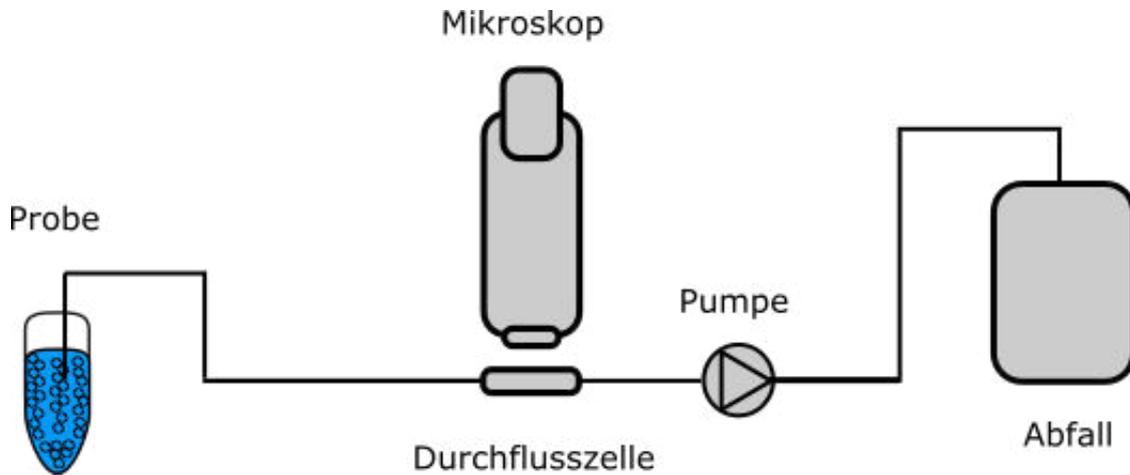


Abb. 9-1: Apparativer Aufbau für das Experiment zur Testung des Mikroskops mit verschiedenen Objektiven.

Die Durchflusszelle Ibidi 100 μm wurde auf einer metallischen Halterungsplatte vor dem Objektiv positioniert. Auf der Rückseite der Durchflusszelle wurde ein Spiegel angebracht. Das Mikroskop wurde mit der Kamera Sony XCD-X700 ausgestattet, die bei voller Auflösung 2 Bilder/s aufnahm. Zunächst wurde das Durchflusssystem vollständig mit Wasser gefüllt. Die Proben mit CHO-K1-Zellen wurden in einem Mikroreaktionsgefäß (Volumen 2 mL) zu dem Schlauch des Durchflusssystems geführt. Das Probenvolumen betrug 1 mL. Bei der Messung betrug die Pumprate 900 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sobald das Probenvolumen im Probengefäß ausgeschöpft war, wurde der Schlauch in ein Gefäß mit 100 mL Wasser bei ausgeschalteter Pumpe getaucht. Die Auswertung mit dem Graphic Analyzer erfolgte nur zur Bestimmung der Größe von Zellobjekten. Im Prozessverlauf wurden 400 Bilder erstellt.

Die Proben wurden einer laufenden Kultivierung mit CHO-K1-Zellen entnommen. Die Zellen wurden in einem Schüttelkolben (125 mL) in 50 mL TC42 mit 4 mM Glutamin und 1 % Antibiotikum kultiviert. Die Zellkonzentration zu Beginn der Kultivierung betrug 6×10^5 Zellen/mL. Es wurde die Kamera Sony XCD-X700 eingesetzt. Die Einstellungen Graphic Analyzer, siehe Kapitel 9.9.

Tabelle 9-2: Verwendete Objektive

Objektiv Bezeichnung (4x) (Objektiv I)	Olympus UPlan FLM
Numerische Apertur (NA)	0,13
Arbeitsabstand	17 mm
Feldnummer	26,5
Abbildungsmaßstab (Vergrößerung)	4x
Objektiv Bezeichnung (10x) (Objektiv II)	Olympus UPlan FLM
Numerische Apertur (NA)	0,3
Arbeitsabstand	11 mm
Feldnummer	26,5
Abbildungsmaßstab (Vergrößerung)	10x

9.4 Aufbau eines Durchflusssystems mit automatisierter Probenahme

Um das Mikroskop und die dazugehörige Durchflusszelle wird ein Durchflusssystem aufgebaut, das einen Sampler für die Probenvorlage einbindet.

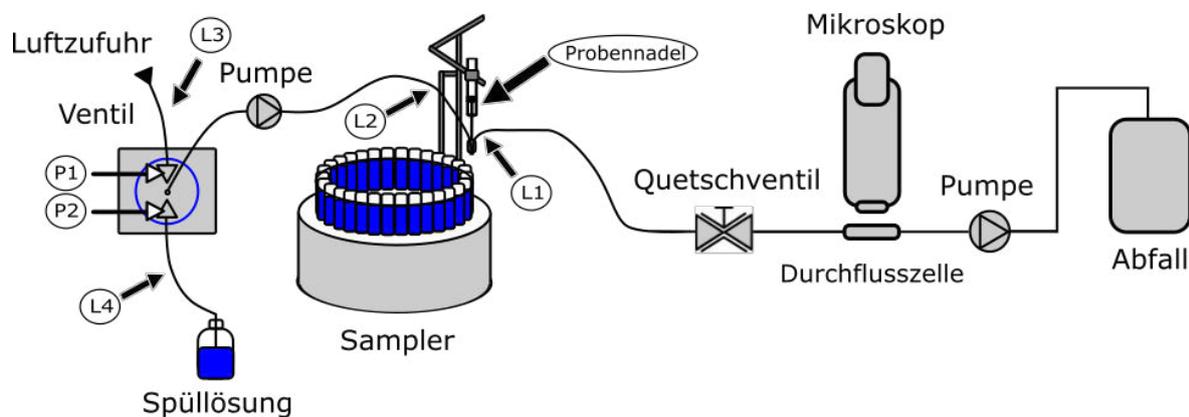


Abb. 9-2: Durchflusssystem und automatische Probengabe.

Die Proben werden in Mikroreaktionsgefäße abgefüllt und auf den Sampler gestellt. Der Sampler verfügt über zwei separate Leitungen, Leitung L1 und Leitung L2, welche mittels einer Probennadel in die Probengefäße getaucht werden können. Über die Leitung L1 wird die Probe aus dem Probengefäß in die Durchflusszelle geführt. Nach der Aufnahme der Bildsequenz gelangt die Zellprobe in einen Abfallbehälter. Die Leitung L2 führt zu einem Zweiwegeventil, das auf Position P1 und Position P2 geschaltet werden kann. Die Position P1 verbindet die Leitung L2 mit der Leitung L3. Die Pumpe führt sterile Luft aus der Leitung L3 in die Leitung L2 und in das Proben-

gefäß ein. Die Position P2 verbindet die Leitung L4 mit der Leitung L2 und ermöglicht den Zufluss von Spüllösung, z. B. von Wasser oder NaCl 0,9 % in die Leitung L2.

Die Vermessung einer Probe beginnt mit dem Einbringen der Probengefäße mit definiertem Probeninhalt auf die Trommel des Samplers. Mit dem Einbringen der Nadel in das Probengefäß und dem Einbinden der Luftpumpe durch die Schaltung des Ventils in Position P1 wird die Probe durch sterile Luft aufgestäubt. Dieses Aufstäuben dauert 10 s, um den Inhalt des Probengefäßes gut durchzumischen. Die Leitung L1 führt die Probe zu der Durchflusszelle und es werden Bilder im Durchfluss erstellt. Anschließend wechselt das Ventil von Position P1 zu Position P2, um die Leitung L4 mit der Leitung L2 zu verbinden. Durch die Betätigung der Pumpe fließt die Spüllösung in das Probengefäß ein, wo bereits nur wenige Mikroliter von der Probe verbleiben. Die Spüllösung fließt in das Probengefäß und gelangt in Leitung L1. Dabei werden die Durchflusszelle und die damit verbundenen Leitungen gereinigt. Auf diese Art und Weise wird auch der Flüssigkeitsstand in der Leitung der Durchflusszelle immer aufrechterhalten und das Eindringen der Luftblasen in das System wird verhindert.

Während der Pause und Deaktivierung aller Pumpen kann der Sampler zur nächsten Position wechseln, wo ein Probengefäß mit Spüllösung bereit steht. Mit der Spüllösung aus dem Probengefäß werden alle Reste der Probe aus dem Durchflusssystem entfernt. Mit der nachfließenden Spüllösung wird das System über die Leitung L2 wieder geflutet und steht für den Empfang der nächsten Probe bereit.

Mit dem Sampler können mehrere Proben bis zur Anzahl von 74 automatisch vermessen werden. Dabei kann der Sedimentation der Zellen durch das Aufstäuben der Probe entgegen gewirkt werden, so dass die Proben vor der Messung immer gut durchmischt sind. In der Praxis können aber wenige Proben gleichzeitig angesetzt und nacheinander vermessen werden, da mit der Zeit die Qualität der Zellproben bedingt durch Sedimentation und das allmähliche Absterben der Zellen abnimmt. Das Kontaminationsrisiko steigt.

Für die Zwecke der Probenahme-Automatisierung wurde ein Extraktionssammler Fraction Collector FRAC 1000 eingesetzt und modernisiert. Der Kollektor wird zusätzlich mit einer Tauchnadel ausgestattet, die mittels eines hydraulischen Zylinders

in Bewegung gesetzt wird. Der hydraulische Druckzylinder ist über den Schlauch mit einer Spritzenpumpe verbunden, in der eine Spritze (20 mL) mit Wasser eingespannt ist. Drückt Pumpe die Flüssigkeit in den Schlauch, wird der Zylinder mit Wasser gefüllt und die Nadel wird nach unten bewegt. Sie wird in das Probengefäß getaucht. Zieht die Pumpe das Wasser aus dem Zylinder heraus, bewegt sich die Nadel aufwärts und wird aus dem Probengefäß gezogen. An der Spitze der Nadel werden Schläuche befestigt. Über die Schläuche gelangt die Probe in die Durchflusszelle des Mikroskops. Die Messungen aus Kapitel 4.3.1 wurden mit Proben der Zellkonzentration $8,93 \times 10^6$ Zellen/mL durchgeführt. Die Tiefe der Durchflusszelle Ibidi betrug 100 μm . Die Bilder wurden mit einer Rate von 2 Bilder/s aufgenommen. Bei der Auswertung wurden je Probe 50 Bilder berücksichtigt. Die Proben wurden mit der Durchflusszelle Ibidi 100 μm gemessen. Das Probenvolumen betrug 300 μL . Die Fließrate betrug etwa 900 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Für die Messungen aus Kapitel 4.3.2 wurden die Proben aus Verdünnung einer Zellsuspension der CHO-K1 mit der Zellkonzentration von $1,36 \times 10^7$ Zellen/mL hergestellt. Die Viabilität der Zellen betrug 100 %. Die Zellsuspension wurde auf die entsprechenden Konzentrationen mit NaCl 0,9 % verdünnt. auf den Sampler geladen und in einem Durchgang gemessen. Die Bilder wurden mit einer Rate von 2 Bilder/s aufgenommen. Bei der Auswertung wurden je Probe 50 Bilder berücksichtigt. Es wurde die Durchflusszelle Ibidi 100 μm eingesetzt. Das Volumen der Probe betrug 300 μL . Die Probe wurde bei einer Fließrate von 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ gemessen.

Für die Ergebnisse wurde ein Polynom berechnet:

$$f(x) = 39,616918092239 \cdot 0,00093606931705645 \cdot x - 2,1353604340203 \cdot 10^{-11} \cdot x^2$$

Für die Messungen mit den Durchflusszellen Ibidi der Tiefe 600 μm und 800 μm wurden die Proben von 400 μL mit 1080 $\mu\text{L}/\text{min}$ gemessen. Die Bildaufnahmezeit betrug 2 Bilder/s. Bei der Auswertung wurden 60 Bilder berücksichtigt. Die Fließrate betrug 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Bilder wurden mit der Kamera PCOPixelFly aufgenommen. Die Einstellungen Graphic Analyzer, siehe Kapitel 9.9.

9.5 Überwachung der Kultivierung in einem Schüttelkolben und Viabilitätsbestimmung

Für die Erstellung der Bildaufnahmen mit dem Mikroskop wurden dem 250 mL Schüttelkolben mit 150 mL Zellsuspension in regelmäßigen zeitabständigen Proben entnommen. Bei jeder Probenahme wurden unabhängig voneinander drei Mikroreaktionsgefäße mit je 1 mL Zellsuspension befüllt. Aus jedem Mikroreaktionsgefäß werden 500 µL Probe in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 5%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die Proben wurden auf einen Ständer für Mikroreaktionsgefäße gestellt und dem Durchflusssystem zugeführt. Der Einzug der Probe in das System findet über einen Schlauch statt, der in das Mikroreaktionsgefäß bis zum Boden eingeführt wird. Die Probe wurde zunächst drei Sekunden mit einer Fließrate von 1,5 mL/min in das Durchflusssystem eingezogen und dann mit einer Fließrate von 600 µL/min durch die Durchflusszelle gepumpt. Sobald die Probe fast vollständig aus dem Mikroreaktionsgefäß abgepumpt war, wurde über den zweiten Schlauch, der etwa zur Hälfte in das Reaktionsgefäß getaucht war, mit einer Fließrate von 700 µL/min deionisiertes Wasser gepumpt. Das Wasser gelang direkt nach der Probe in das Durchflusssystem und wurde nach Abschluss der Messung als Reinigungslösung mit einer Fließrate von 2 mL/min verwendet. Nach dem Austritt aus der Durchflusszelle gelangen die Zellsuspension und Reinigungslösung in den Abfallbehälter. Nach der Messung wurde das Durchflusssystem noch zwei Minuten gespült. Während dieser Zeit wurde die nächste Probe einer Messreihe vorbereitet, mit dem Farbstoff Trypanblau gefärbt und dann dem Durchflusssystem zugeführt.

Die Bilder wurden mit der Kamera Sony XCD-X700 und einer Rate von 3 Bilder/s aufgenommen. Im Experiment wurde das Mikroskop im Auflicht-Modus verwendet. Die Durchflusszelle mit der Tiefe 100 µL wurde an der Halterung des Mikroskops befestigt. An die Rückseite der Durchflusszelle wurde ein Reflektor (Spiegel) angebracht. Er wurde in der Höhe der optischen Achse vom Mikroskop positioniert, um das vom Mikroskop ausgehende Licht zu reflektieren. Die Schaltung der Pumpen und Ventile erfolgte mit Hilfe von FIA-Master.

Die Einstellungen Graphic Analyzer, siehe Kapitel 9.9.

9.6 Parallelkultivierung und Überwachung der CHO-Zellen in Schüttelkolben

9.6.1 Durchführung

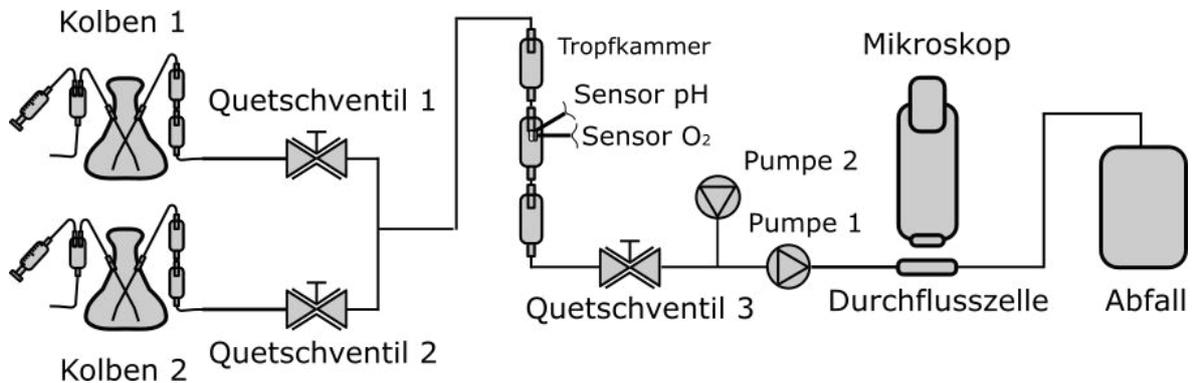


Abb. 9-3: Apparatur für die Durchführung von Parallelkultivierungen.

Bei der Durchführung des Versuchs wird das Mikroskop im Durchlichtmodus eingesetzt. Die Zellproben wurden mit der Durchflusszelle Ibidi 100 μm gemessen. Bei den geöffneten Ventilen wird eine Probe durch die piezoelektrische Pumpe dem jeweiligen Kolben entnommen und an den Tropfkammern und den Sterilitätsbarrieren vorbeigeführt. Die Probe gelangt in die Tropfkammer mit der pH- und Sauerstoffsensoren und fließt dann in die Durchflusszelle. Anschließend gelangt sie in den Abfallbehälter. Vor der Pumpe befindet sich ein Verbindungsstück, das eine Spritzenpumpe in das System einbindet. Die Spritzenpumpe enthält eine Spüllösung aus konzentrierter Zitronensäure (10 %), die bei geschlossenen Quetschventilen und laufender piezoelektrischer Pumpe in das System eingeleitet wird. Die Spüllösung dient der Reinigung und Desinfektion der Pumpe, Durchflusszelle und Abfalleitung. Die Sterilität des gesamten Durchflusssystems erfolgt somit durch die Einleitung der sauren Spüllösung in die Durchflusszelle. Die sterilen Schläuche und die Tropfkammern, welche die optischen Sensoren umschließen, werden vor dem Prozessbeginn sterilisiert, können aber beim Bedarf, z. B. wegen undichter Stellen oder verstopfter Leitungen leicht ausgetauscht werden.

Die Fließrate der Probenlösung durch das System beträgt 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ und die Probenahme aus einem Kolben dauert 4 min. Der Probenahmevergang wird alle sechs Stunden wiederholt.

Die beiden Kolben wurden mit Zellen derselben Zellsuspension angeimpft und demselben Mediumvolumen ausgestattet. Zu Kultivierungsbeginn sind jeweils 250 mL TC 42 Medium zugegeben worden und die Zellkonzentration betrug 6×10^6 Zellen/mL. Das Medium enthielt 8 mM Glutamin.

Es wurde die Kamera PCOPixelfly eingesetzt.

Bei der Auswertung wurden 300 Bilder berücksichtigt.

Die Einstellungen Graphic Analyzer, siehe Kapitel 9.9.

9.6.2 Optische Chemosensoren

Die Spots werden ohne vorherige Sterilisation zusammen mit den Lichtleitern in die Tropfkammer eingebaut. Die Lichtleiter werden an der Tropfkammer in den Hülsenkämen aus Metall befestigt und so positioniert, dass sie in einem Winkel von 90° zueinander stehen (Abb. 11-6). Der Lichtleiter ragt in die Tropfkammer hinein. Die Spots befinden sich unmittelbar am Ende des Lichtleiters. Fällt ein Tropfen der Probe in die Tropfkammer, werden die Spots vollständig mit Flüssigkeit benetzt. Um Kontaminationen im Schüttelkolben durch die Tropfkammer zu vermeiden, werden auf beiden Seiten, nämlich am Eingangs- und am Ausgangsanschluss der Tropfkammer Sterilitätsbarrieren installiert. Das sind zwei Tropfkammern, welche die Sensor-kammer von der Durchflusssystem trennen. Ist die Tropfkammer vollständig isoliert und luftdicht verklebt, kann ein Probenfluss durch die piezoelektrische Pumpe erzeugt werden.

Nach dem Gebrauch wurden die Spots entsorgt oder ausgetauscht. Bei Messungen im Inkubator erfahren die Spots nur die Lichteinwirkung durch den Transmitter. Das Tageslicht fällt nur gelegentlich auf die Spots, hauptsächlich nur während der Probe-nahme.

9.6.2.1 Sauerstoffsensor

Der Sauerstoffsensor OXY-4 MINI ist ein optischer Sensor mit vier separaten Anschlüssen für optische Leiter, welche an ihren Enden mit sensitiven Spots verbunden werden. Die Spots tragen einen Farbstoff, ein Luminophor, dessen Moleküle mit dem gelösten Sauerstoff im Kultivierungsmedium interagieren und bei Erhöhung des Sauerstoffgehaltes ihre optischen Eigenschaften ändern. Durch die Interaktion mit dem Sauerstoff wird das Fluoreszenzsignal des Luminophors gemindert und die Phasenwinkel der gemessenen Signale sinken.

Die Kalibrierung setzt zwei Messungen des Gelöstsauerstoffs voraus. Die Kalibrationslösung 1 besteht aus deionisiertem Wasser. Sie wird durch die Zufuhr von Luft aus der Umgebung mittels einer piezoelektrischen Pumpe mit Sauerstoff angereichert und im System als Lösung mit 100 % Sauerstoffsättigung verwendet [102].

Der Kalibrationslösung 2 wird dagegen durch Zugabe von Natriumsulfit der Sauerstoff entzogen. Eine 1 % Natriumsulfitlösung wird als eine Lösung mit 0 % Sauerstoffsättigung eingesetzt. Dabei wurde 1 g Natriumsulfit in 100 mL deionisiertes Wasser gelöst.

Für die Kalibrierung wurden an das Durchflusssystem mit den Sensoren und Tropfkammern zwei Schüttelkolben angeschlossen. Im Schüttelkolben 1 wurden 150 mL Kalibrationslösung 1 eingegeben. Der Schüttelkolben 2 wurde mit 150 mL Kalibrationslösung 2 befüllt. Der Schüttelkolben 1 wurde über einen Schlauch ständig mit Luft begast. Die Kolben blieben auf einer Schüttelplattform bei 160 rpm etwa 30 min stehen. Danach wurden die Kolben abwechselnd für das Durchflusssystem und das Pumpen freigegeben um die Lösungen über die Sensorspots zu pumpen.

- Daten aus Kalibrierung des Sauerstoffsensors:

O ₂ Luftsättigung [%]	Phasenwinkel [°]
0	57,96
100	29,92

9.6.2.2 pH-Sensor

Mit dem Sensor pH-1 MINI V2 wird der pH-Wert der Proben ermittelt im Durchflusssystem [103]. Das Licht erfährt eine Phasenverschiebung, die mit dem Basisgerät detektiert werden kann. Die Spots für pH-Messung beinhalten zwei Farbstoffe, einen Referenzluminophor und einen Luminophor, dessen Emission sich in Abhängigkeit von dem jeweiligen pH-Wert ändert. Ändert sich der pH-Wert der Probe, so wird der sensitive Luminophor protoniert oder deprotoniert. Die optischen Eigenschaften des Farbstoffes ändern sich. Das beeinflusst seinerseits die messbare Abklingzeit und die Phasenwinkel, die als Verzögerung zwischen den gesendeten Signalen des Anregungslichts und den empfangenen Signalen der Farbstoffemission aufgefasst werden können. Sie markieren eine Phasenverschiebung, die bei der Aufzeichnung der Daten mit dem Transmitter sichtbar gemacht wird. Mit dem Referenzluminophor werden die Bezugswerte für eine exakte Messung der pH-Werte erzeugt.

Wie bei der Messungen mit dem Sauerstoffsensor können die aufgezeichneten Phasenwinkel bestimmten pH-Werten zugeordnet werden. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Messsignal kann nicht durch eine lineare Funktion beschrieben werden. Die Kalibrationspunkte werden aus Messungen mit Kalibrationslösungen verschiedener pH-Werte gewonnen und über Kalkulation durch den Kurvenverlauf einer Boltzmann-Sigmoidfunktion beschrieben [103].

$$\text{Wert}(x) = \text{Wert}_{\max} + (\text{Wert}_{\min} - \text{Wert}_{\max}) / (1 + \exp\left(\frac{x-x_0}{dx}\right)) \quad (9)$$

Der Wert_{\max} ist der maximale Wert im gegebenen Zusammenhang, der Wert_{\min} ist der minimale Wert. In diesem Zusammenhang entsprechen diese Werte dem maximalen und minimalen Phasenwinkel. Mit dem x_0 wird der Mittelpunkt der Kurve markiert und dx ist das Differenzial.

Die Kalibrierung erfolgte durch die Messung von 6 Kalibrationslösungen mit pH 4 bis pH 9. Die Pufferlösungen (150 mL in Kolben) wurden aus Schüttelkolben zum Sensor-Spot gepumpt. Die Dauer der Messung betrug fünf Minuten. Die Fließrate betrug

600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Bei allen Messungen befanden sich die Kolben auf einer Schüttelplattform und wurden bei 160 rpm geschüttelt.

- Daten aus Kalibrierung des pH-Sensors:

pH-Wert der Pufferlösung	Phasenwinkel [°]
4	54,73
5	52,22
6	45,43
7	32,34
8	24,92
9	23,44

- Konstanten der ermittelten Boltzmann-Funktion für den pH-Sensor:

$Wert_{max}$	54,91
$Wert_{min}$	22,85
x_0	6,49
dx	0,58

9.7 Zellkultivierung

Für die Experimente mit dem Mikroskop wurden CHO-K1-Zellen kultiviert. Sie entstammen der Zellsammlung von Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld und sind nicht für Produktion bestimmter Substanzen gentechnisch verändert worden.

Die Zellen wurden in Schüttelkolben *Corning® Erlenmeyer Cell Culture Flasks* 125 mL und 250 mL kultiviert. Für die Vorbereitung einer Vorkultur wurden Zellen in einem 250 mL Kolben angesetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug 50-100 mL. Für die Experimente im Kapitel 4.3 wurden auch die Ansätze von 25 mL kultiviert. Die Zellkonzentration betrug beim Ansetzen der Kolben 5×10^5 – 6×10^5 Zellen/mL. Die Viabi-

lität der Zellen beim Passagieren lag bei 95 – 100 %. Die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums wird in der Tabelle 9-3 wiedergegeben:

Tabelle 9-3: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für CHO-K1.

Medium TeutoCell 42 (TC 42)	
Glutamin	4 mM – 8 mM
Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (optional)	1 %

Die Zellen wurden im Inkubator Heracell 240 bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Durchmischung fand mit Hilfe eines Schüttlers bei 160 rpm statt. Bei den Zellkonzentrationen von 8x10⁶ Zellen/mL bis 1,2x10⁷ Zellen/mL, die innerhalb von vier bis fünf Tagen erreicht wurden, wurden die Zellen passagiert.

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer, indem die Zellen in vier großen Feldern ausgezählt wurden. Der Mittelwert der Zellzahl wurde für Berechnung eingesetzt. Die Berechnung der Zellkonzentration fand nach der Formel (10) statt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} = \text{Anzahl}_{\text{Mittelwert}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 \quad (10)$$

Die Prüfung der Zellviabilität wurde im Test mit der 5 % Trypanblau-Lösung (Trypanblau in 0,9 % NaCl) durchgeführt. Dabei wurden 20 – 30 µL Zellsuspension mit der gleichen Menge an Trypanblau-Lösung verdünnt. Die Verdünnung betrug 1:2 (v/v). Bei den Zellkonzentrationen ab 5x10⁶ Zellen/mL wurden 10 µL Probe mit 20 µL 0,9 % NaCl verdünnt und mit Trypanblau-Lösung auf 60 µL aufgefüllt.

Für Messungen der Glukose- und Laktatkonzentrationen sowie für die Herstellung neuer Kultivierungsansätze wurden zellhaltigen Proben zentrifugiert (bei 180 g) um Zellen vom Medium zu trennen.

Die manuelle Probenahme fand bei laufenden Kultivierungen unter sterilen Bedingungen in einer Clean Bench statt. Bei den Kultivierungen aus Kapitel 6, deren Schüt-

telkolben unmittelbar an die Probenahmevorrichtungen der Durchflusssysteme angeschlossen waren, fand die sterile Probenahme über eine vakuumbildende Kammer statt. Die Kammer besteht aus einem Mikroreaktionsgefäß mit dem Gesamtvolumen von 2 mL und ist am oberen Ende mit zwei Schläuchen verbunden. Der Schlauch 1 ist mit einer sterilen Spritze verbunden, mit der Luftdruck beziehungsweise Vakuum erzeugt wird. Der Schlauch 2 wird direkt ins Kultivierungsmedium getaucht. Am dem unteren Ende der Kammer befindet sich der Schlauch 3. An diesem Anschluss wird die Probe aus dem System gepumpt. Sind die Schläuche entriegelt, so kann durch Spritzenbewegung Flüssigkeit aus dem Schüttelkolben in die Kammer aufgesaugt werden. Wird der Schlauch 2 gequetscht und der Schlauch 3 entriegelt, so kann die Probe durch die Einführung der Luft aus der Kammer verdrängt werden. In der Zeit zwischen den Probenahmen ist der Fluss in den Schläuchen durch Schlauchklemmen blockiert.

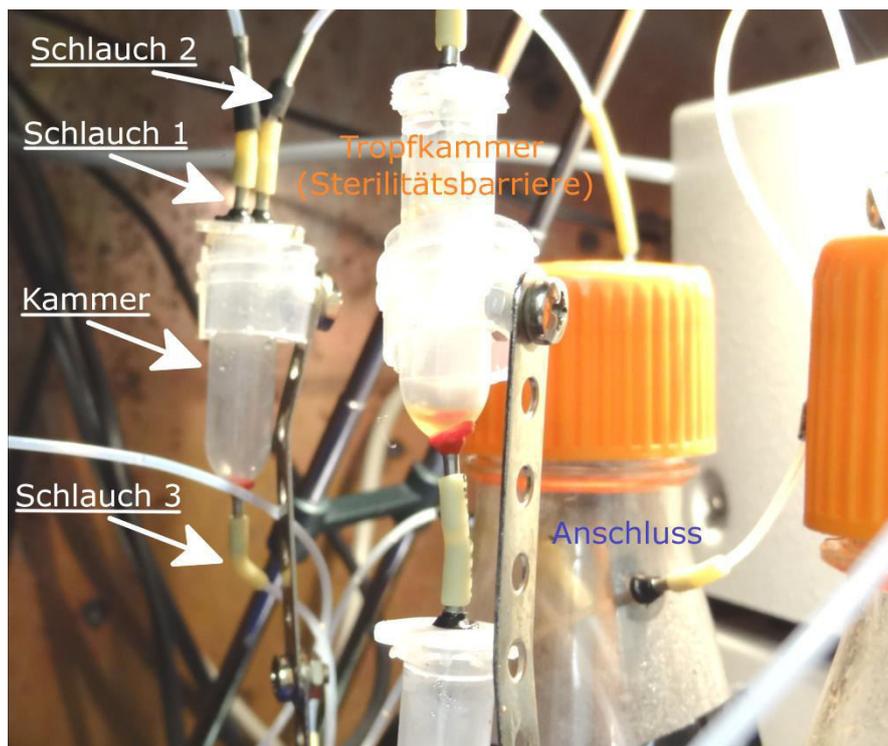


Abb. 9-4: Übersicht der Durchflusselemente an einem Schüttelkolben.

Der Schüttelkolben einer Probenahme-Kammer für manuelle Probenentnahme ausgestattet. Die Tropfkammern dienen als Sterilitätsbarriere. Die Anschlüsse ragen in den Kolben hinein und sind mit den Wänden des Kolbens fest verschweißt.

9.8 Kultivierungskolben

Für die Experimente mit der automatischen Probenahme wurden die Schüttelkolben in ihrer Bauart modifiziert. Die Kolben wurden am Halsansatz durch thermische Belastung mit herausragenden Anschlüssen von zwei Millimeter im Durchmesser versehen (Abb. 9-4). Die Anschlüsse bestehen aus zwei Metallhülsen von jeweils 5 mm Länge. Die erste Hülse wurde so montiert, dass sie mit ihrer ganzen Länge in den Kolben hinein ragt. Die zweite Hülse wurde mit der Ersten fest verschweißt und bildete ein Kanal durch den ein Plastikschauch (Probeschlauch) in den Kolben gereicht wurde. Ähnlich wurde auch die Sterilkammer für die Probenahme am Kolben angeschlossen.

9.9 Bildverarbeitung

Für die Auswertung wurden Aufnahmen mit Zellobjekten mit dem Programm Graphic Analyzer und den darin enthaltenen Algorithmus *Life And Death* ausgewertet. Das Programm stellt eine Bedienungsfläche zur Verfügung, welche über Regler zur Einstellung essentieller Parameter genutzt wird (Abb. 11-3).

Für die Auswertung der Bilder aus den durchgeführten Experimenten wurden für jedes Experiment spezielle Einstellungen im Programm vorgenommen. In der Tabelle 9-4 sind diese Einstellungen zusammengefasst worden. Die Tabelle beinhaltet Kapitelnummern, die das jeweilige Experiment kennzeichnen, auf das Ziel des Experiments und seine Durchführung hinweisen. In weiteren Zeilen wird auf die relevanten technischen Hilfsmittel hingewiesen, z. B. auf die Maßstabsabbildungen von Objekten, die Tiefen der Durchflusszellen oder der Zeitpunkt der Kultivierung, zu dem eine Änderung der Einstellungen vorgenommen worden ist. Diese Faktoren haben für die Experimente und die Bildanalyse entscheidende Bedeutung gehabt und haben die Wahl der Einstellungen von Graphic Analyzer beeinflusst.

Vor der Verarbeitung mit dem Graphic Analyzer wurden alle Bilder einer *flat-field-correction*-Operation unterzogen. Dabei wurde der Hintergrund eliminiert, der auf den Bildern mit Zellen abgebildet war. Als Vorlage dafür dienten die Aufnahmen der

jeweiligen Bildsequenz, die keine Zellen enthielten und nur den Hintergrund wiedergaben [85], (siehe ImageJ CalculatorPlus, Kapitel 2.4.4).

Die Bilder aus dem Experiment im Kapitel 6 wurden durch anisotrope Diffusion geglättet [85], (siehe ImageJ Anisotropic Diffusion 2d, Kapitel 2.4.4).

Mit den eingestellten Parametern und den gewünschten Optionen für die Speicherung der Aufnahmen konnte die Analyse der Bilder gestaltet werden. Das Ergebnis der Analyse wurde als *commaseperated file (CSV)* in Tabellenform exportiert.

Die Steuerungsskripte für das Programm FIA-Master wurden mit einem XML-Editor erstellt. Dabei wurden Funktionen einzelner Geräte gemäß dem kontinuierlichen Zeitablauf zugeordnet und als Skript abgespeichert (Abb. 11-4).

Tabelle 9-4: Einstellungen des Graphic Analyzers.

Tabelle A:

	Kapitel 3.4		Kapitel 4.3.1	Kapitel 4.3.2	Kapitel 4.3.3	
	Kapitel 9.3		Kapitel 9.4	Kapitel 9.4	Kapitel 9.4	
	Objektiv 4x	Objektiv 10x	Ibidi 100 µm	Ibidi 100 µm	Ibidi 600 µm	Ibidi 800 µm
Schwellenwert Canny-Min	27	27	42	43	23	21
Schwellenwert Canny-Max	49	40	55	55	51	60
Gauss σ	2	2	5	5	2	2,2
Objekt-Min	0	670	97	97	98	89
Objekt-Max	1275	10000	3186	3186	3186	2936
Schwellenwert Grauwert	255	255	255	255	255	255
Entropie- Filter	min	min	3,5	3,5	4,1	4,1
Exzentrizität- Filter	max	max	2,9	3,0	3,5	3,1

Tabelle B:

	Kapitel 5	Kapitel 6	
	Kapitel 9.5	Kapitel 9.6	
	Ibidi 100 μm	0 h	53 h
Schwellenwert Canny-Min	12	20	10
Schwellenwert Canny-Max	30	21	42
Gauss σ	2,18	5	2
Objekt-Min	70	190	3
Objekt-Max	3186	1275	256
Schwellenwert Grauwert	255	255	255
Entropie-Filter	2,8	4,2	3,9
Exzentrizität-Filter	3,0	2,9	0

9.10 Datenverarbeitung und Analyse

Die Daten aus den Tabellen des Graphic Analyzers wurden für die Auswertung zusammengefasst, so dass die Anzahl der Zellen pro Bild gegen die Bildnummer aufgetragen werden konnten. Die Intergrale der Peaks wurden gemäß Condal-Bosch-Verfahren berechnet [105]. Die Integration der Peaks aus Experiment im Kapitel 6 erfolgte mit dem Trapez-Verfahren [106].

Für das Approximieren der Gesamtzellzahl und der Gesamtzellkonzentration wurden Polynome verwendet.

Abb. 5-2:

Mikroskopische Gesamtzellzahl:

$$f(x) = 714,9811877128 - 36,077903818767 * x + 0,23258091946644 * x^2 + 0,032528214548231 * x^3 - 0,00030811409186735 * x^4 + 7,7566070893826 * 10^{-7} * x^5 + 5,5813825185337 * 10^{-12} * x^6;$$

Gesamtzellkonzentration:

$$f(x)=438.300,79223255+ 8.165,1826978673 *x+ 420,52911983824 *x^2- \\ 13,385970065402 *x^3+0,42790640763485 *x^4-0,0033961486890102 *x^5+ \\ 7,8653973022725*10^{-12} *x^6;$$

Abb. 5-4:

Agglomerate:

$$f(x)=90,453408002573 -13,28482092065 *x+0,76668646070135 *x^2 - \\ 0,017269198637604 *x^3+ 0,00020304477350976 *x^4 -1,1155835693267*10^{-6} *x^5+ \\ 2,236899285654*10^{-6} *x^6;$$

Single Cells:

$$f(x)=17,221515352428+ 29,878993568429 *x-1,4707675405631 *x^2 \\ 0,042531970431615 *x^3-0,00031560240558894 *x^4+ 7,1625247228119*10^{-7} *x^5;$$

Abb. 6-3:

Schüttelkolben 1:

$$f(x)=15.435,267193601-4.110,0441034793 *x+848,26968840577 *x^2 - \\ 57,425284793471*x^3 +1,9340193351605 * x^4 -0,033526110211695*x^5+ \\ 0,00028642627257063*x^6-9,5647490091359*10^{-6}*x^7;$$

Schüttelkolben 2:

$$f(x)=13.881,523629031-1.218,1423630628*x + 327,30508678542*x^2 - \\ 17,0860397583*x^3 + 0,42047043952347*x^4 -0,0046506647574595*x^5 + \\ 1,8577009198142*10^{-5}*x^6;$$

Abb. 6-4:

Für die Veranschaulichung der Verläufe erfolgte die Approximation durch Boltzmann-Funktion:

Schüttelkolben 1:

$$f(x)= 4,1219344567088+(2,8215920512699-4,1219344567088)/ \\ (1+\exp((x-48,604624651198)/2,5957387976825));$$

Schüttelkolben 2:

$$f(x) = 3,8040234736854 + (2,6367603360507 - 3,8040234736854) / (1 + \exp((x - 40,667171263299) / 0,048388954923718));$$

Für die Entwicklung von In-situ Control, Graphic Analyzer und FIA-Master bedanke ich mich bei Dr. Patrick Lindner vom Institut für Technische Chemie.

Bei der morphologischen Untersuchung (Abb. 11-14) wurden die Werte der Zellgröße und die Exzentrizitätswerte durch die Mittelwerte der Größe und der Exzentrizität der jeweiligen Probe geteilt, um für alle Proben einheitliche Ausgangswerte zu gewinnen. Jedes Zellobjekt wurde gemäß der Eingabe: Objektgröße > 0,8, Objektgröße < 1,2 und Exzentrizität > 1 bewertet und der entsprechenden Gruppen zugeordnet.

9.11 Listen der Chemikalien, Materialien und Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Geräte und Chemikalien eingesetzt:

Tabelle 9-5: Materialien und Geräte.

Geräte und Materialien	Hersteller
Aderendhülsen	Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
Anlage, Entionisieren von Wasser Arium 611 Ultrapure water system	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Cleanbench MSC Advance	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Dampfsterilisationsanlage Systec V-150	Systec GmbH, Wetzlar, Deutschland
Durchflusszellen Ibidi μ -Slides	Ibidi GmbH, Planegg, Deutschland
Erlenmeyer Schüttelkolben (120 mL/250 mL)	Corning Inc., USA
Extended Micropump Control	Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund
FLEXILUX 600 Lichtquelle	Schölly Fiberoptics GmbH, Denzlingen, Deutschland
Fraction Collector FRAC 1000	Amersham Biosciences, GB
Grüne Leuchtdiode FLAT LED - 100°	revoArt-LED
Glukose/Lactat-Messung, YSI 2300/2700	YSI Incorporated, Yellow Springs, USA

Geräte und Materialien	Hersteller
Inkubator Heracell 240	Thermo Electron Co., Erlangen, Deutschland
MFA-PP Lineartisch (UE16PP)	Newport Corporation, Irvine, Calif., USA
pH-Meter pH-1 MINI V2	Presens GmbH, Regensburg, Deutschland
pH-Meter/pH-Elektrode	Metrohm GmbH, Filderstadt, Deutschland
Mikropipetten (10µL/100µL/1mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten (100µL/1mL)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (1 mL/2mL)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop Olympus BH 2, Metallographic ext.	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Olympus IX50	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mixer Vortex VM300	NeoLAB Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer (<i>improved</i>)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Orbital Shaker DOS-10M	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Messgerät OXY-4 MINI	Presens GmbH, Regensburg, Deutschland
Piezoelektrische Pumpe Bartels	Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund
Quetschventile/Ventile, Smartline Valve Drive	Knauer GmbH, Seelze, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 mL/50 mL)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Schrittmotor SH4009M0406-A (Revolver)	Nanotec GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Spitzen für Pipetten (10 µL/100 µL/1mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spritzenpumpe Aladdin	World Precision Instruments LLC, USA
Strahlteiler	Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Waage AC 211 S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Waage Analytic AC 210S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Waage AT621 DeltaRange	Mettler Instruments AG, Greifswald, Deutschland
Waage CPA8201	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9-6: Chemikalien- und Hilfsmittelliste.

Chemikalien	Hersteller
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	Citro-Essenz, SURIG, Speyer & Grund, Mainz, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochloritlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
pH-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Repair Stick Alu ESTA	Toolcraft, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
Silikonkleber Elastosil RT-601	Wacker Chemie AG, München, Deutschland
TeutoCell 42 (TC42)	TeutoCell AG, Bielefeld, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Corporation, USA
2-Komponenten-Kleber	UHU GmbH, Bühl, Deutschland
2-Komponenten-Kleber	Toolcraft, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland

10 Literaturverzeichnis

- [1]. HASS V.C., PÖRTNER R., Praxis der Bioprozesstechnik. 2009, Spektrum Akademischer Verlag, S. 31.
- [2]. Edmund Optics, "Aufbau von digitalen Vidiomikroskopen", Artikel,
Link: <http://www.edmundoptics.de/resources/application-notes/microscopy/digital-video-microscope-objective-setups/>,
zuletzt abgerufen am 28.07.2016.
- [3]. FRITSCH O., Physik für Biologen und Mediziner. 2013, Springer Spectrum, S. 111-112.
- [4]. HENKEL K., Die Mikrofibel, Ausgabe: 14. Juni 2003, S. 35-36,
Link: <http://www.klaus-henkel.de/mikrofibel.pdf>,
zuletzt abgerufen am 16.08.2016.
- [5]. ZIMMERMANN J., Optische Mikroskopie, Seminarvortrag 23. Oktober 2003, S. 4,
Link: <http://www.physik.uni-regensburg.de/forschung/schwarz/Mikroskopie/01-OptMikroskopie.pdf>,
zuletzt abgerufen am 16.08.2016.
- [6]. Universität Oldenburg, Physik-Praktika, Kap. 5, Brechungsgesetz, Dispersion, S. 5,
Link: https://www.uni-oldenburg.de/fileadmin/user_upload/physik/ag/physikpraktika/download/BPR/NPR_BIO_Kapitel_5.pdf,
zuletzt abgerufen am 28.08.2016.
- [7]. LINKENHELD C., "Pfad durch die Lichtmikroskopie", 06.03.2016,
Link: <http://www.mikroskopie.de/pfad/architekturen/drei.htm>,
zuletzt abgerufen am 28.08.2016.
- [8]. PAUL H., "Lexikon der Optik, M bis Z", Mikroskopische Abbildung . 2003, Spektrum Verlag, S. 36.
- [9]. Trioptics, Knowledge Base, Optische Winkelmessung, Link:
<http://www.trioptics.com/de/knowledge-base/optische-winkelmessung/>,
zuletzt abgerufen am 28.08.2016.
- [10]. WILKINSON M.H.F, SCHULT F., "Digital Image Analysis of Microbes". 1998, Wiley, S. 66-67.
- [11]. HAUS J., "Optische Mikroskopie: Funktionsweise und Kontrastierverfahren",
Optische Vergrößerung: Von der Lupe zum Mikroskop. 2014, WILEY-VCH Verlag, S. 28.
- [12]. HOUCK M.M., Trace Evidence, Essential of forensic science. 2009, Facts on File, S. 48.

- [13]. Zeiss Campus, Education in Microscopy and Digital Imaging,
Link: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/objectivemagnification/indexflash.html>,
zuletzt abgerufen am 03.09.2016.
- [14]. LITFIN G., Technische Optik in der Praxis, 3. Auflage. 2005, Springer Verlag
Berlin Heidelberg, S. 70-80.
- [15]. Leica Microscopes, Objektive,
Link: <http://www.leica-microsystems.com/de/produkte/objektive/>,
zuletzt abgerufen am 03.09.2016.
- [16]. SPECTOR D.L., GOLDMAN R.D., Basic Methods in Microscopy, Protocols and
Concepts from Cells: A Laboratory Manual, 2006, Cold Spring Harbor
Laboratory Press, S. 11.
- [17]. KREMER B.P., Das große Kosmos-Buch der Mikroskopie. 2010, Franckh-Kosmos
Verlags-GmbH, S. 22-23.
- [18]. TU Darmstadt, Physik, Grundpraktikum Optik,
Link: http://www.physik.tu-darmstadt.de/study/praktika/bsc_gp/gpo_1/index.de.jsp,
zuletzt abgerufen am 04.09.2016.
- [19]. Lexikon der Physik, Spektrum Akademischer Verlag 1998,
Link: <http://www.spektrum.de/lexikon/physik/feldlinse/4853>,
zuletzt abgerufen am 05.12.2016.
- [20]. Techniklexikon, Optik Okular und Farbvergrößerungsdifferenz,
Link: <http://www.techniklexikon.net/d/farbvergr%C3%B6sserungsfehler/farbvergr%C3%B6sserungsfehler.htm>,
zuletzt abgerufen am 04.09.2016.
- [21]. CORLE T.R., KINO S.K., Confocal Scanning Optical Microscopy and Related
Imaging Systems, 1996, ACADEMIC PRESS, S. 93-94.
- [22]. Mineralienatlas - Fossilienatlas, Lexikon Mikroskopie Sichtfeld,
Link: <https://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Sichtfeld?lang=de&language=german>,
zuletzt abgerufen am 10.09.2016.
- [23]. HOPPERT M., Microscopic Techniques in Biotechnology . 2003, Wiley-VCH
Verlag, S. 79.
- [24]. Olympus, Scientific objectives,
Link: <http://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/uplfln/>,
zuletzt abgerufen am 18.09.2016.
- [25]. KÜHLKE D., Optik Grundlagen und Anwendungen. 2011, Verlag Harri Deutsch,
S. 146.

- [26]. GSTRANTHALER G., LINDL T., Zell- und Gewebekultur. 2013, Springer Verlag, S. 123-124.
- [27]. RAPOPORT D.H., BECKER T., Bildbasierte Zytometrie – eine Technologie erobert die Zellkultur. 2014, Labor&more, No.7, S. 12-16.
- [28]. WILKINSON M.H.F, SCHUT F., SIERACKI M.E., VILES C.L., Digital Image Analysis of Microbes, Enumeration and sizing of micro-organisms using digital image analysis. 1998, John Wiley & Sons, S. 192-193.
- [29]. CADENA-HERRERA D. et al., Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. 2015, Biotechnology Reports 7, S. 9-16.
- [30]. VOROBYEV I.A., BARTENEVA N.S., Imaging flow cytometry: Methods and Protocols, Methods in molecular biology. 2016, SpringerVerlag, S. 1-3.
- [31]. Merck Millipor, ImageStream®X Mark II Imaging Flow Cytometer,
Link: <http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/cell-analysis/amnis-imaging-flow-cytometers/imagestreamx-Mark-ii-imaging-flow-cytometer/>, zuletzt abgerufen am 24.09.2016.
- [32]. BASIJI D.A. et al., Cellular Image Analysis and Imaging by Flow Cytometry. 2007, Clin Lab Med. September 27(3): 653-viii.
- [33]. ThermoFisher, Analytic Instrumets:
Link: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-instruments/automated-cell-counters/>,
zuletzt abgerufen am 24.09.2016.
- [34]. Biozym, Hightech Geräte, Zellbiologie,
Link: <http://www.biozym.com/>, zuletzt abgerufen am 25.09.2016.
- [35]. Biorad, Life Science Research,
Link: <http://www.bio-rad.com/de-de/product/tc20-automated-cell-counter>,
zuletzt abgerufen am 25.09.2016.
- [36]. Chemometec, automated cell counter
Link: <https://chemometec.com/cell-counters/cell-counter-nc-200-nucleocounter/>, zuletzt abgerufen am 25.09.2016.
- [37]. Roche, Cedex HiRes Analyzer,
Link: <https://www.lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/products/cedex-hires-analyzer>, zuletzt abgerufen am 25.09.2016.
- [38]. Nexcelom Biosciences, Cellometer Auto T4 counting Chamber,
Link: <http://www.nexcelom.com/Cellometer-Auto-T4/index.htm>,
zuletzt abgerufen am 25.09.2016.
- [39]. MULISCH M., WELSCH U., Romeis Mikroskopische Technik. 2010, 18 Auflage, Spektrum Akedemischer Verlag, S. 475.

- [40]. JOERIS K., FRERICHS J.G, In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. 2002, *Cytotechnology* 38, S. 129–134.
- [41]. REHBOCK C., Entwicklung eines Durchfluss-Multitestersystems zur Beobachtung von Kultivierungsprozessen in der Biotechnologie. 2010, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- [42]. RUDOLPH G., Entwicklung und Einsatz inline-mikroskopischer Verfahren zur Beobachtung biotechnologischer Prozesse. 2007, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- [43]. BRÜCKERHOF T., Bildbasiertes Inline-Monitoring von Kultivierungsprozessen mit einem optimierten In-situ Mikroskopsystem. 2006, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- [44]. LÜCKING T., Entwicklung einer universellen Bypass-Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen. 2015, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, S. 76.
- [45]. ÜNAL M., Mikroalgenkultivierungen und die Überwachung des Kultivierungsprozesses mittels Durchflussmikroskopie. 2013, Dissertation, Leibniz Universität Hannover
- [46]. BLUMA A., Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse. 2009, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- [47]. PREDIGER A., Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für die Bioprozesstechnik. 2013, Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- [48]. BLUMA A., HÖPFNER T., et al., In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of art. 2010, *Anal Bioanal Chem* 398, Springer Verlag, S. 2429–2438.
- [49]. Sequip S+E GmbH, In-situ Video Microscope - IVM,
Link: <http://www.sequip-particle-technology.de/bildanalyse/pia-ivm/>,
zuletzt abgerufen am 27.09.2016.
- [50]. SOPAT GmbH, SOPAT-MM, <https://sopat.de/en/applications/>,
zuletzt abgerufen am 27.09.2016.
- [51]. TROTTER M., Trotter Biotech Solutions, Bioreactor Sampling, Artikel, 27.08.2012, Link: <http://www.pharmpro.com/article/2012/08/bioreactor-sampling>, zuletzt abgerufen am 28.09.2016.
- [52]. Metrohm AG, What is Atline Analysis?,
Link: <http://www.metrohm-processlab.com/overview/index.html>,
zuletzt abgerufen am 28.09.2016.

- [53]. IbiDi GmbH, μ Slides I Luer Family, Instruction pdf, Link: http://ibidi.com/fileadmin/products/labware/channel_slides/S_801XX_Slide_ILuer/IN_801XX_I_Luer.pdf, zuletzt abgerufen am 08.10.2016.
- [54]. Hinweis: Mit dem Stand zum 07.10.2016 sind μ Slides I Luer 100 μ m nicht mehr serienmässig oder nur auf Anfrage erhältlich.
- [55]. JUNGE G., Einführung in die Technische Strömungslehre. 2015, zweite Auflage, Hanser Verlag, S. 52-53.
- [56]. SCHWEIZER A., Formelsammlung und Berechnungsprogramme für Anlagenbau, Link: <http://www.schweizer-fn.de/stroemung/druckverlust/druckverlust.php>, zuletzt abgerufen am 08.10.2016.
- [57]. BERLIN K., Handbuch für Dampf- und Kondensatanlagen, <http://www.dampfundkondensat.de/pdf/Theorie.pdf>, S. 14-15, zuletzt abgerufen am 08.10.2016.
- [58]. Bartels GmbH, Products, Pump mp6, Link: <http://www.bartels-mikrotechnik.de/content/view/16/22/lang.english/>, zuletzt abgerufen am 08.10.2016.
- [59]. BÖGE A., Handbuch Maschinenbau: Grundlagen und Anwendungen der Maschinenbau-Technik. 2007, 18 Auflage, Vieweg, S. 82-83.
- [60]. HAUSER G., Hygienegerechte Apparate und Anlagen. 2008, Wiley-VCH, S. 177.
- [61]. AKO Armaturen & Separationstechnik GmbH, Produkte, Link: <http://www.ako-armaturen.de/produkte/pneumatischequetschventile.html>, zuletzt abgerufen am 08.10.2016.
- [62]. GRÖNKE K., Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse : vom isotopisch stationären zum instationären Fall. 2011, Dissertation, Forschungszentrum Jülich, S.122 : s.n.
- [63]. DERFUS G.E, ABRAMSON D. et al., Cell culture monitoring via an auto-sampler and an integrated multi-functional off-line analyzer. 2010, Biotechnology Progress, Volume 26, Issue 1, Wiley, S. 284–292.
- [64]. GLINDKAMP A., RIECHERS D. et al., Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends. 2009, Advanced in Biochem Engin/Biotechnol 115, Springer Verlag, S. 148–149.
- [65]. TROY D.B., BERINGER B., Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2006, Lippincott Williams & Wilkins, 21st Edition, S. 839.
- [66]. Basler AG, Übersicht Anwendungsgebiete, Link: <http://www.baslerweb.com/de>, zuletzt abgerufen am 09.10.2016.
- [67]. DEMANT C., STREICHER-ABEL B., SPRINGHOFF A., Industrielle Bildverarbeitung: Wie optische Qualitätskontrolle wirklich funktioniert. 2011, 3. Auflage, Springer Verlag, S. 242-259.

- [68]. BABITZKY A., LINDNER P., SCHEPER T., Cell assessment by at-line microscopy. 2014, *Methods Mol Biol.*, Springer (1104:343-53.doi: 10.1007/978-1-62703-733-4_21).
- [69]. ANNADURAI S., SHANMUGALAKSHMI R., *Fundamentals of Digital Image Processing*. 2007, Pearson Education, S. 81.
- [70]. NAGABHUSHANA S., *Computer Vision and Image Processing*. 2006, New Age International Publishers, S. 48-50.
- [71]. CANNY J., A Computational Approach to Edge Detection. 1986, *IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE*, VOL. PAMI-8, NO. 6, S. 679-698.
- [72]. Simple PC von Kristian Starkloff, [C++] Der Gauss-Filter – mit Beispiel, Artikel vom 13.02.2014,
Link: <http://www.simple-pc.de/c-der-gauss-filter-mit-beispiel/>,
zuletzt abgerufen am 09.10.2016.
- [73]. NISCHWITZ A., FISCHER M., HABERÄCKER P., SOCHER G., *Computergrafik und Bildverarbeitung, Band II: Bildverarbeitung*. 2011, Vieweg+Teubner, 3 Auflage, S. 177-180, 407-409.
- [74]. BURGER W., BURGE M. J., *Digitale Bildverarbeitung: Eine algorithmische Einführung mit Java*. 2015, 3 Auflage, Springer Vieweg, S. 197-203.
- [75]. BÄSSMANN H., KREYSS J., *Bildverarbeitung AdOculos*. 2004, Springer Verlag, S. 161.
- [76]. STEINBRECHER R., *Bildverarbeitung in der Praxis*. 2005, Oldenbourg, 2 Auflage überarbeitet, S.230,
Link: <http://www.rst-software.de/dbv/download.html>,
zuletzt abgerufen am 11.10.2016.
- [77]. HÖPFNER T., PREDIGER et al., Online-Viabilitätsmessung von Hefe- und Tierzellen mittels Durchfluss-Mikroskopie. 2010, Leibniz Universität Hannover, TCI-Hannover (Poster).
- [78]. Aforge, Image Statistics,
Link: http://www.aforgenet.com/framework/features/image_statistics.html,
zuletzt abgerufen am 12.10.2016.
- [79]. IWAINSKY A., WILHELMI W., *Lexikon der Computergrafik und Bildverarbeitung*. 1994, Vieweg+Teubner Verlag, S. 86.
- [80]. ImageJ, Bildverarbeitungsprogramm,
Link: <https://imagej.nih.gov/ij/>, zuletzt abgerufen am 12.10.2016.
- [81]. GIMP, Bildverarbeitungsprogramm,
Link: <https://www.gimp.org/>, zuletzt abgerufen am 12.10.2016.

- [82]. MONTABONE S., Beginning Digital Image Processing Using Free Tools for Photographers. 2010, Apress, S. 105.
- [83]. TSCHUMPERLE D., DERICHE R., Vector-Valued Image Regularization with PDE's : A Common Framework for Different Applications. 2004, INRIA, Odyssee' Lab.
- [84]. JÄHNE B., Digitale Bildverarbeitung. 2005, 6 Auflage, Springer Verlag, S. 501-503.
- [85]. Flat-field correction,
Link:http://wwwfacilities.uhnresearch.ca/wcif/imagej/image_intensity_proce.htm, zuletzt abgerufen am 22.10.2016.
- [86]. PLATAS BARRADAS O., Process and cultivation strategies for the human industrial cell line AGE1.HN. 2014, Dissertation, TU Hamburg-Harburg, S. 29.
- [87]. DEMUTH C., Chemische Sensoren in der Bioprozessanalytik. 2014, Chemie in unserer Zeit, Volume 48, Issue 1, S. 60–67.
- [88]. HENKEL S., BEUTEL S., Messung des pH-Werts in der Biotechnologie. 2013, Chemie Ingenieur Technik, Volume 85, Issue 6, S. 872–885.
- [89]. CHMIEL H., HITZMANN B., SCHEPER T., Bioprozesstechnik, Bioprozessanalytik und -steuerung. 2011, 3 Auflage, Spektrum Verlag, S. 267-270, 278-281.
- [90]. PreSens GmbH, Products, <http://www.presens.de/products>, zuletzt abgerufen am 23.10.2016.
- [91]. GRÜNDLER P., Chemische Sensoren. 2004, Springer Verlag, S. 214.
- [92]. Presens GmbH, manual fiberoptic minisensors pH-4 mini, S. 10-13,
Link: http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/downloads/manuals/pH-4_mini_UM1-1.pdf, zuletzt abgerufen am 28.10.2016.
- [93]. HAAKE C., Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung von rekombinanten humanen Zytokinen aus chinese hamster ovary-Zellen. 2012, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, S. 1.
- [94]. COSTA A.R., RODRIGUES M.E. et al., Assessment of different approaches for the adaptation of CHO cells to serum-free medium. 2010, BIT's 2nd Annual International Congress of Antibodies. Beijing, China, 24-26 Março, S. 493.
- [95]. WEI-SHOU HU, JAYAPAL K.P., et al, Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting. 2007, Chemical Engineering Progress 103 (10), S. 42.
- [96]. LANDGREBE D., Identifikation von hochproduzierenden Säugetierzellen und die Aufreinigung ihrer Produkte. 2012, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, S. 18.
- [97]. STORHAS W., Bioverfahrensentwicklung. 2013, 2 Auflage, S. 73.

- [98]. KOLB B, Gaschromatographie in Bildern. 2003, 2 überarbeitete Auflage, Wiley-VCH, S. 32.
- [99]. NEITZEL V., Nicht lineare Kalibrationsfunktionen. 2002, CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 53. Jahrgang, Heft 2, S. 44-47.
- [100]. STOREY K.B., Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. 2004, Wiley, S. 300.
- [101]. ZHOU W., KANTARDJIEFF A., Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing. 2014, Springer, Volume 139, S. 45.
- [102]. Presens GmbH, Instruction Manual OXY-4 mini, S. 18,
http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/downloads/manuals/IM_OXY-4_mini_dv2.pdf,
zuletzt abgerufen am 29.10.2016.
- [103]. Presens GmbH, Instruction Manual pH-1 mini,
Link: http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/downloads/manuals/IM_pH-1_mini_dv2.pdf,
zuletzt abgerufen am 29.10.2016.
- [104]. HARTWIG R. S., ZIEMANN U., Das TMS-Buch: Handbuch der transkraniellen Magnetstimulation. 2007, Springer Verlag, S. 64, Abb. 5.1
- [105]. DYSON N., A., Chromatographic Integration Methods. 1998, Royal Society of Chemistry, Cambridge, S. 29.
- [106]. ŞANAL Z., Mathematik für Ingenieure: Grundlagen - Anwendungen in Maple. 2015, 3 Auflage, Springer Vieweg, S. 314.

11 Anhang

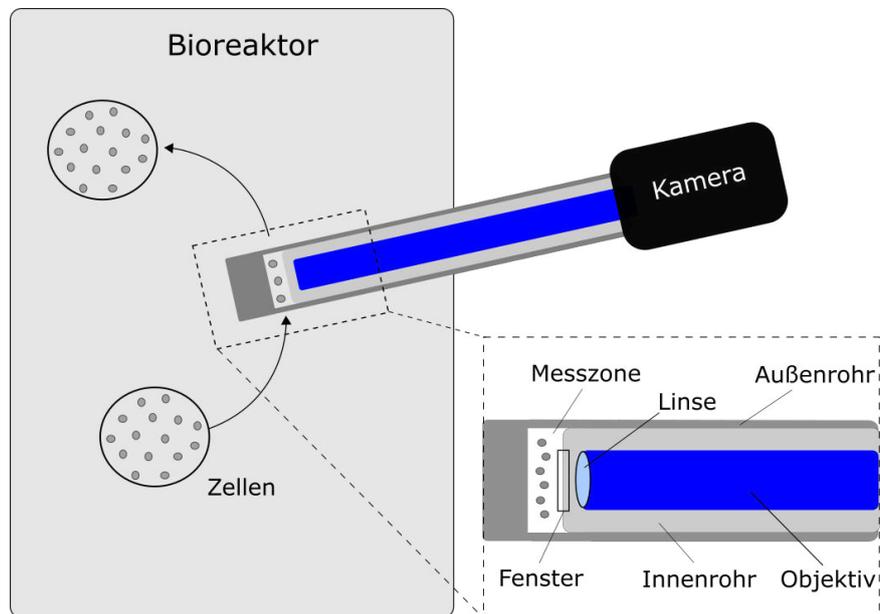


Abb. 11-1: Funktion und Aufbau eines In-situ Mikroskops.

Die verlängerte Objektivfassung (blaues Segment) ist vom Innenrohr umschlossen. Die Linse vom Objektiv grenzt an ein Fenster, das in das Innenrohr eingearbeitet ist. Zusammen mit dem unteren Segment des Außenrohres bildet das Innenrohr eine Messzone. Die Zellsuspension wird vom Rührer des Bioreaktors angetrieben und in die Messzone gepresst. Dabei gelangen die Zellen in das Sichtfeld des Mikroskops.

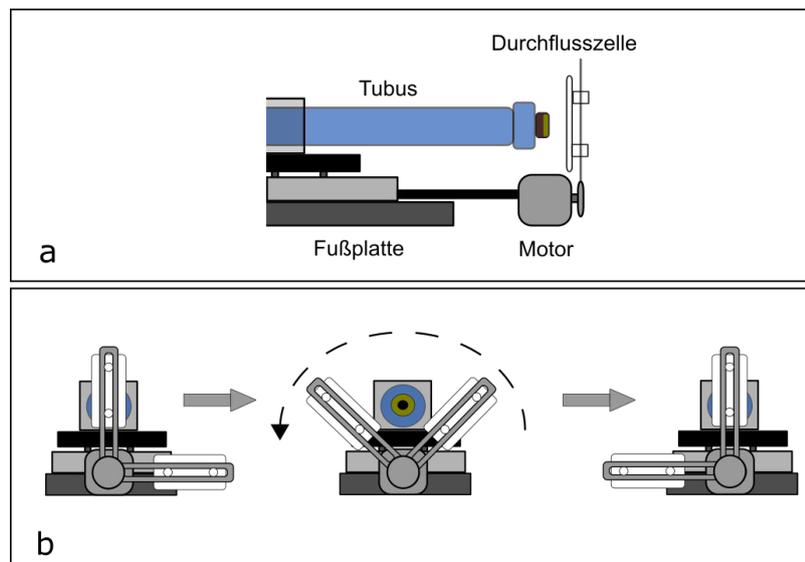


Abb. 11-2: Digitales Mikroskop und automatisierter Chipwechsler.

a) Prototyp des digitalen Mikroskops mit dem automatischen Chipwechsler, seitlich abgebildet. b) Der Chipwechsler umfasst Halterungen für zwei Durchflusszellen, die abwechselnd vor das Objektiv geführt werden können.

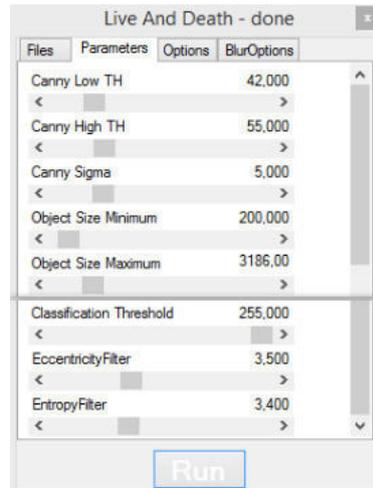


Abb. 11-3: Graphische Benutzeroberfläche Graphic Analyzer.

Cycle Number	Image Number	Object Number	Size [Pixel]	Compactness	Eccentricity	Mean Grey Value	VmeanL	HmeanL	Entropy
1,000	0,000	0,000	356,000	1,165	1,375	143,542	10,356	10,789	4,506
1,000	0,000	1,000	351,000	1,135	1,419	146,601	10,533	11,084	4,462
1,000	0,000	2,000	430,000	1,035	1,381	147,333	10,904	11,457	4,608
1,000	0,000	3,000	411,000	1,018	1,174	133,012	11,091	10,208	5,306
1,000	0,000	4,000	411,000	1,092	1,250	130,555	11,068	10,961	5,226
1,000	0,000	5,000	291,000	1,033	1,367	134,306	9,005	9,333	5,029
1,000	0,000	6,000	358,000	1,080	1,511	147,832	9,399	10,754	4,804

Abb. 11-4: Tabelle mit Ergebnissen aus der Bildanalyse und Zellerkennung.

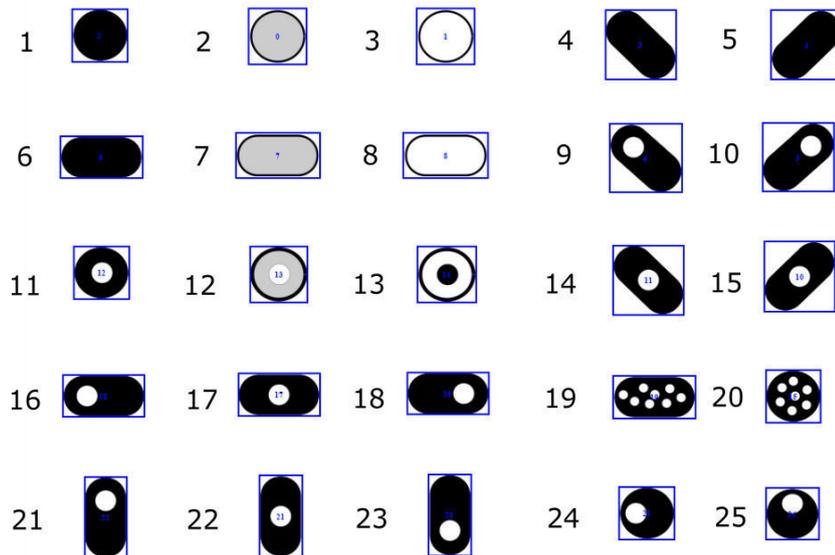


Abb. 11-5: Beispiele der Auswertung mit dem Programm Graphic Analyzer.

Siehe auch Tabelle 11-1.

Tabelle 11-1: Beispiele der Auswertung mit dem Graphic Analyzer.

Siehe auch Abb. 11-5.

Objekt Nummer	Fläche [Pixel]	Kompaktheit	Exzentrizität	Mittlerer Grauwert	P _v	P _H	Entropie
1	3147	1,11	1,10	9	31	32	0,74
2	3552	1,08	1,07	183	33	34	4,05
3	3569	1,09	1,07	209	33	34	3,15
4	4235	1,24	1,97	9	42	43	0,62
5	4234	1,26	1,98	9	41	42	0,61
6	4274	1,23	2,00	12	24	48	0,81
7	4766	1,20	1,89	186	27	49	4,50
8	4786	1,20	1,89	211	27	50	3,15
9	4239	1,26	2,00	39	31	31	1,06
10	4240	1,25	1,99	39	31	53	1,06
11	3162	1,10	1,10	50	31	33	1,42
12	3575	1,09	1,07	168	33	34	3,94
13	3604	1,11	1,08	160	33	34	2,22
14	4241	1,24	1,99	39	41	42	1,07
15	4240	1,25	1,99	39	41	41	1,06
16	4271	1,23	1,97	41	25	34	1,36
17	4315	1,22	1,94	42	25	48	1,36
18	4277	1,23	1,97	41	25	61	1,41
19	4316	1,23	1,95	58	24	47	1,84
20	3152	1,10	1,08	64	31	32	1,91
21	4271	1,23	1,98	41	33	24	1,42
22	4316	1,24	1,95	42	48	26	1,36
23	4317	1,22	1,93	42	61	24	1,39
24	3157	1,10	1,10	49	31	22	1,44
25	2948	1,11	1,07	49	21	31	1,45

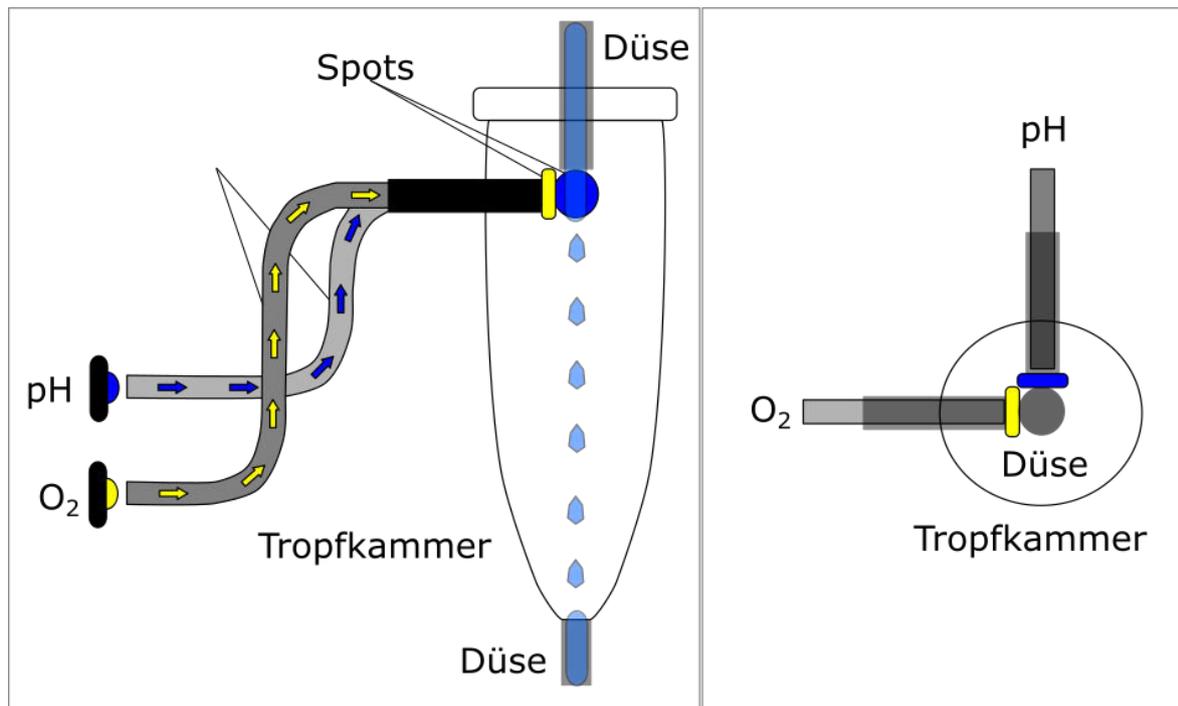


Abb. 11-6: Schematische Darstellung einer Tropfkammer mit integrierten optischen Chemosensoren.

Die Zellsuspension fließt aus der oberen Düse in die Tropfkammer ein und benetzt die Spots der optischen Chemosensoren. Anschließend tropft die Zellsuspension zum Boden der Tropfkammer ab und wird von der unteren Düse aufgefangen. Die Spots sind an den metallischen Hülsen in der Tropfkammer festgeklebt. Die Hülsen dienen als Halterung für die Lichtleiter, welcher mit den Transmittern für die Bestimmung der pH-Werte und des Gelöstsauerstoffs verbunden sind. Die Hülsen sind an der Tropfkammer in einem Winkel von 90° zueinander angeordnet.

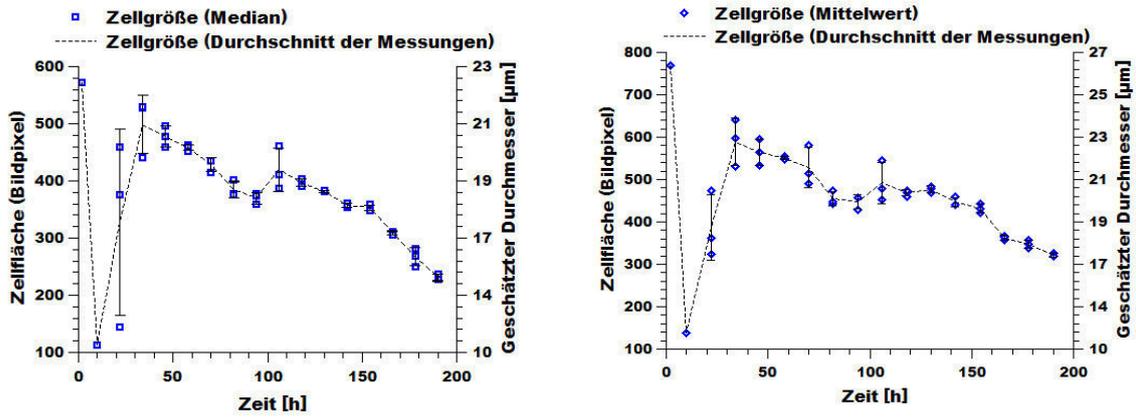


Abb. 11-7: Durchschnittswerte der gemessenen Zellgröße (Fläche) im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren den geschätzten Durchmesser der Zellobjekte, welcher aus den Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) der Zellfläche abgeleitet wird.

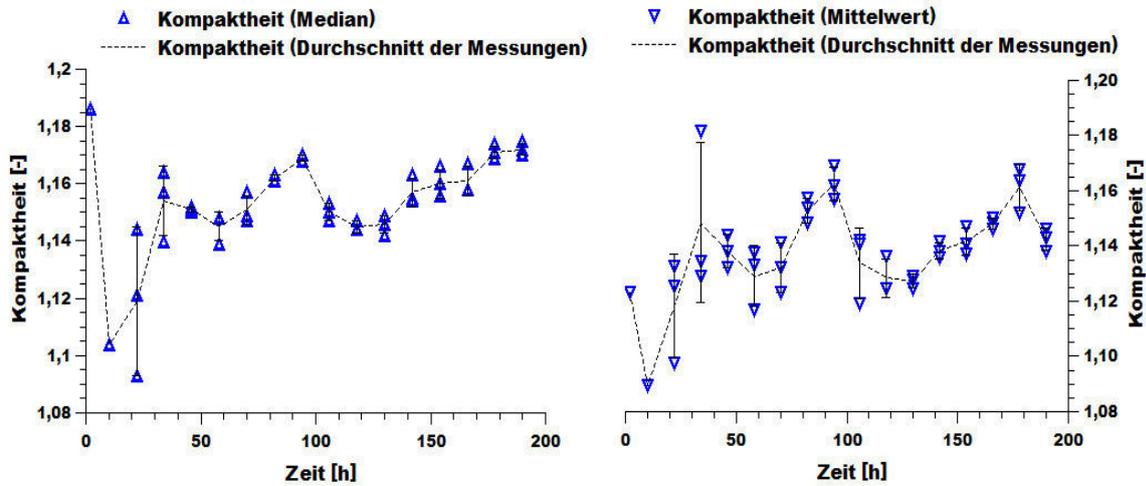


Abb. 11-8: Durchschnittswerte der gemessenen Kompaktheit im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren die Werte der Kompaktheit, die auf der Berechnung von Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) basieren.

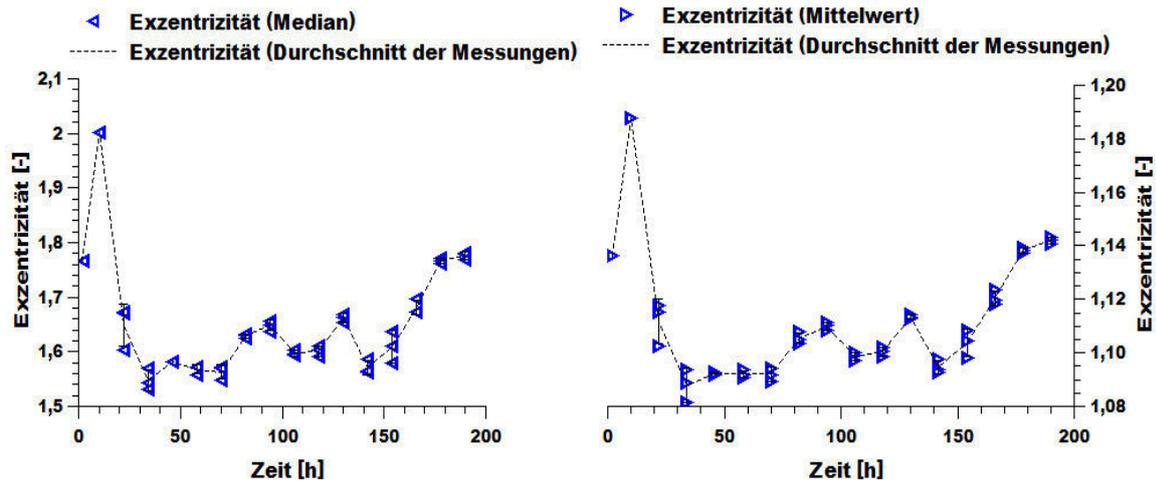


Abb. 11-9: Durchschnittswerte der gemessenen Exzentrizität im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren die Werte der Exzentrizität, die auf der Berechnung von Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) basiert.

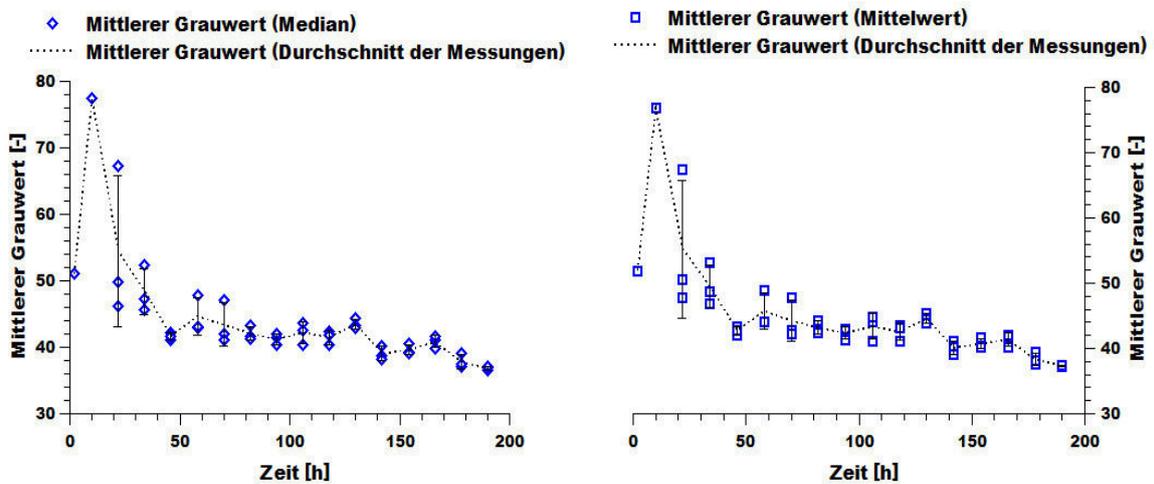


Abb. 11-10: Durchschnittswerte der gemessenen mittleren Grauwerte im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren mittlere Grauwerte, die auf der Berechnung von Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) basiert.

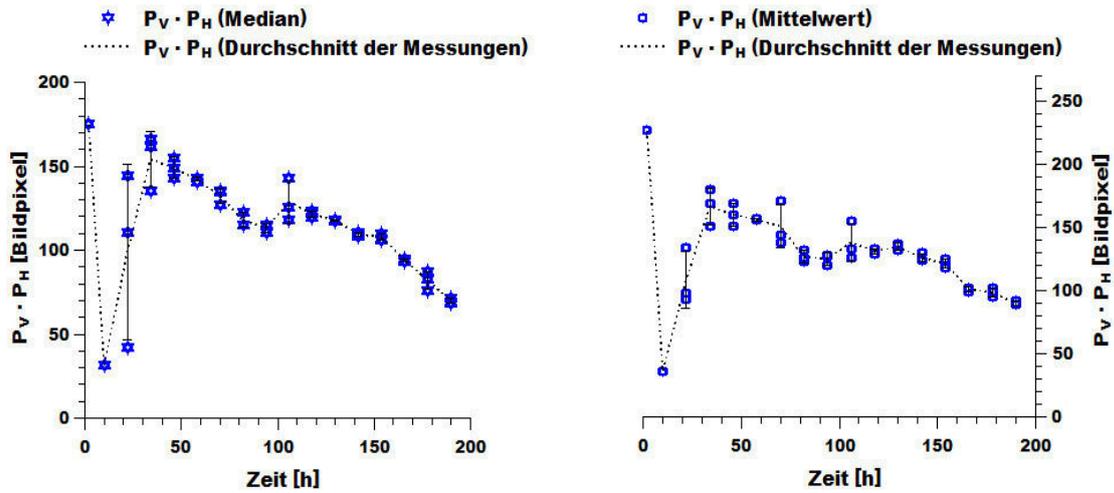


Abb. 11-11: Durchschnittswerte des Produkts aus vertikalen und horizontalen Position der mittleren Intensitätswerte im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren Produkte aus vertikalen und horizontalen Position der mittleren Intensitätswerte, die auf der Berechnung von Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) basiert.

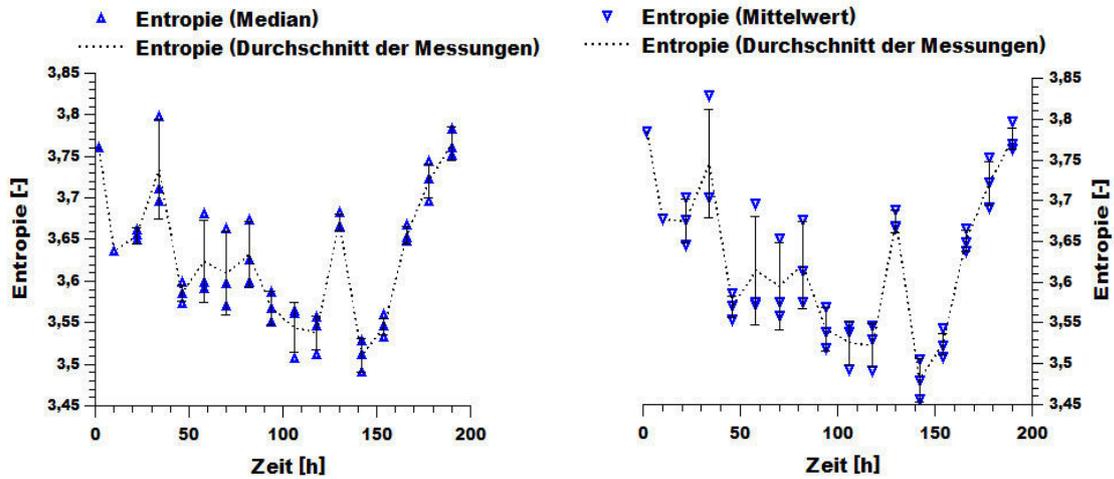


Abb. 11-12: Durchschnittswerte der gemessenen mittleren Entropie im Verlauf des Kultivierungsprozesses mit Trypanblau-Färbung.

Die Werte repräsentieren die bildliche Entropie, die auf der Berechnung von Medianen (Graphik links) und Mittelwerten (Graphik rechts) basiert.

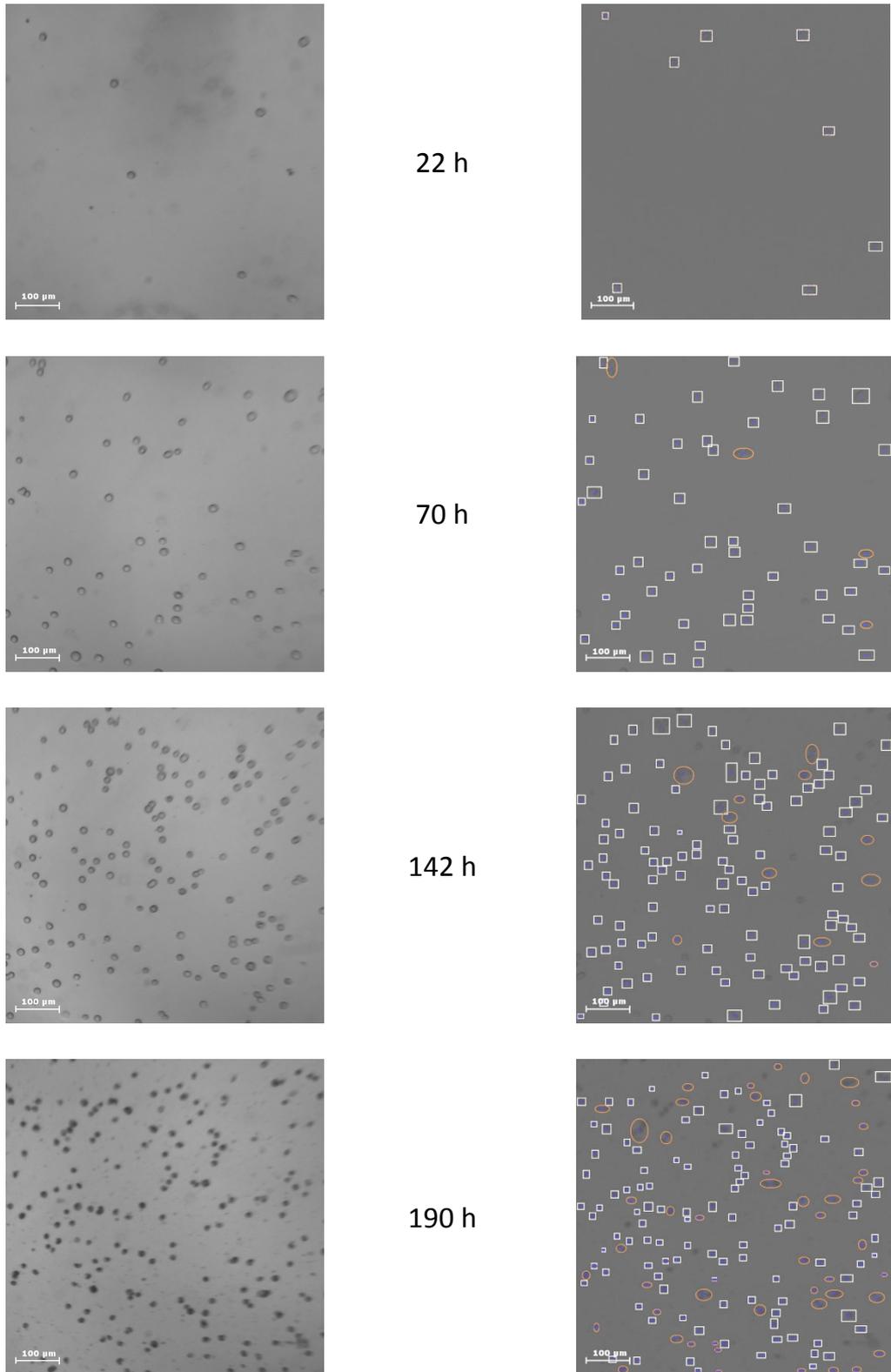


Abb. 11-13: Bilder aus Überwachung einer Zellkultivierung mit dem digitalen Mikroskop. Mit den Bildern werden die Originalaufnahmen (links) und die ausgewerteten Aufnahmen (rechts) präsentiert. Die Bilder wurden bei der Überwachung der CHO-K1-Kultivierung während des Experiments aus Kapitel 5 aufgenommen. Die Proben wurden nach 22 Stunden, 70 Stunden, 142 Stunden und 190 Stunden ab dem Beginn der Kultivierung gemessen.

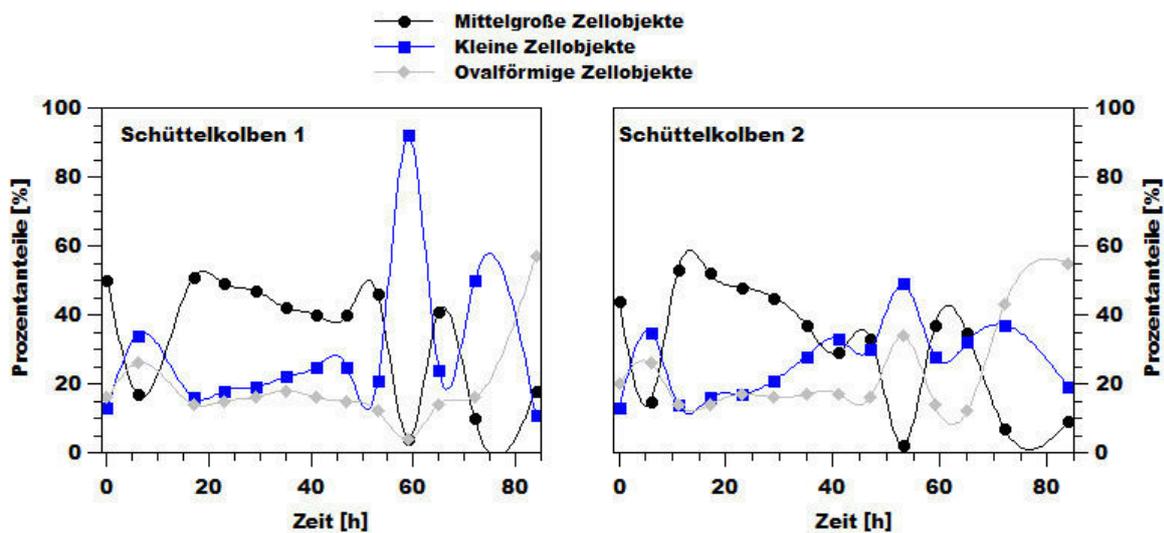


Abb. 11-14: Morphologische Untersuchung der durchgeführten Parallelkultivierung.

In den Graphen sind die Prozentanteile von Zellen unterschiedlicher Größen- und Formgruppen dargestellt. Die Entwicklung von mittelgroßen und runden Zellobjekten, kleinen runden Zellen und mittelgroßen ovalförmigen Zellobjekten ist aufgezeichnet worden. Es ist zu sehen, dass sich die Zellen unterschiedlicher Gruppen in den beiden Schüttelkolben bis zum Messpunkt 41 Stunden sehr ähnlich entwickeln. Der Prozentanteil von kleinen und runden Zellobjekten steigt während der 41 Stunden an und der Anteil der mittelgroßen Zellobjekte sinkt. Diese Tendenz setzt sich ab dem Zeitpunkt des Übergangs zur besseren Begasung in den beiden Schüttelkolben und Änderungen der Einstellungsoptionen ab dem Messpunkt 53 Stunden nicht mehr fort. Zeitversetzt steigt in den beiden Schüttelkolben der Prozentanteil von kleinen runden Zellobjekten, zunächst im Schüttelkolben 2 zum Zeitpunkt 53 Stunden und dann im Schüttelkolben 1 zum Zeitpunkt 59 Stunden. Die Prozentanteile anderer Zellobjekte sinken dabei. Nur die Anzahl von ovalförmigen Objekten im Schüttelkolben 2 steigt von 15 % auf 26 % an.

Anhand des Bildmaterials konnte festgestellt werden, dass die Zelldetektion durch das Graphic Analyzer zu diesen Zeitpunkten etwas fehlerbehaftet war. Zwar wurden die Zellen erkannt, ihre Form und Größe konnten nicht exakt festgehalten werden. Aus den Messungen ab dem Messpunkt 65 geht hervor, dass der Anteil von ovalförmigen mittelgroßen Zellobjekten in den beiden Schüttelkolben zum Ende der Parallelkultivierung ansteigt. Im Schüttelkolben 2 ist ein Anstieg von 12 % bis auf

43 % zum Messpunkt 72 Stunden und dann auf 55 % zum Messpunkt 84 Stunden zu beobachten. Im Schüttelkolben 1 ist solcher Anstieg ab dem Messpunkt 84 Stunden auf einen Anteil von 57 % zu beobachten. Zum Ende der Parallelkultivierung werden die Zellobjekte größer und ovalförmiger. Die einzelnen Zellen überlagern sich bei hohen Zelldichten und werden zum Teil als zusammenhängende Objekte mit hoher Exzentrizität erkannt.

Es konnten keine auffälligen Änderungen der Morphologie und der Größe der Zellen nachgewiesen werden, die als Folge einer besseren Begasung oder des Laktatverbrauchs hätten auftreten können.

12 Publikationsliste

1. **Babitzky A., Lindner P., Scheper T. (2014):** *Cell assessment by atline microscopy*, Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols, 3rd edition, Springer Science (<http://www.springer.com/chemistry/biotechnology/book/978-1-62703-732-7>)
2. **Havlik I., Reardon K.F., Ünal M., Lindner P., Prediger A., Babitzky A., Beutel S., Scheper T. (2013):** *Monitoring of microalgal cultivations with on-line, flow-through microscopy*, Algal Research, Elsevier (www.sciencedirect.com)
3. **Babitzky A., Lindner P., Beutel S., Scheper S. (2011):** *Atline microscopic analysis of suspension cell cultures*, ECCE/ECAB 2011, the first joint European Congress of Chemical Engineering and Applied Biotechnology (Poster). www.tci-uni.hannover.de
4. **Babitzky A., Prediger A., Lindner P., Beutel S., Scheper S. (2011):** *Atline microscopic analysis of suspension cell cultures*, 10. Dresdner Sensor-Symposium 2011 (Poster)
5. **Bonk S., Sandor M., Rüdinger F., Tscheschke B., Prediger A., Babitzky A., Solle D., Beutel S., Scheper T. (2011):** *In-situ microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation*, 22nd European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting on Cell Based Technologies

13 Lebenslauf

Alexander Babitzky

*11.07.1983

in Lwiw (Ukraine)

Berufliche Praxis und Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 04.2011 – 03.2017 | Promotion am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover |
| 01.2010 – 04.2011 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover |
| 10.2007 – 11.2009 | Life Science, Leibniz Universität Hannover

Masterarbeit (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover): Aufbau eines Hochdruckextraktors zur Gewinnung organischer Substanzen aus Gewebe mittels überkritischen Kohlendioxids

Abschluss: Master of Science |
| 10.2005 – 09.2007 | Life Science, Leibniz Universität Hannover

Bachelor-Arbeit (Institut für Virologie, Medizinische Hochschule Hannover): Untersuchungen zur Aktivierung von Major Immediate-Early Promotoren der Cytomegaloviren

Abschluss: Bachelor of Science |

10.2004 – 09.2005 Bachelor-Studiengang Molekulare Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen

05.1999 – 06.2004 Bismarckschule Hannover

Abschluss: Abitur