

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna BIZJAK

**UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA SPREMLJANJE
KARAKTERISTIK CELIC CHO V BIOPROCESIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR CHO CELLS
CHARACTERISTICS MONITORING IN BIOPROCESSES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za razvoj rekombinantnih učinkovin farmacevtske družbe Lek d.d. v Mengšu.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 15.4.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico imenovana prof. dr. Mojca Narat, za somentorico dr. Ana Schweiger in za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentorica: dr. Ana Schweiger

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Alojz Ihan
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in Imunologijo

Član: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Ana Schweiger
Ljubljana, Lek farmacevtska družba d.d.

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna Bizjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 576.08:579.66:66.098(043)=863
KG bioprocseh/pretočna citometrija/apoptoza/nekroza /celični cikel/celice CHO
AV BIZJAK, Vesna
SA NARAT, Mojca (mentorica)/SCHWEIGER, Ana (somentorica)/
IHAN, Alojz (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2006
IN UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA SPREMLJANJE
KARAKTERISTIK CELIC CHO V BIOPROCSEIH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 76 str., 3 pregl., 17 sl., 5 pril., 31 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Pretočna citometrija je tehnika, ki s svojimi metodami omogoča analizo
biokemijskih in morfoloških celičnih karakteristik. V prvem delu naloge smo
izbrali metode, ki so ustrezale našim kriterijem in se izkazale kot primerne za
spremljanje bioprocseh. V biorektorskih vzorcih smo želeli določiti delež
apoptoze, delež celic v posameznih fazah celičnega cikla in celično viabilnost. Za
določanje deleža apoptoze smo izbirali med metodama AV/PI in TUNEL. Za
določanje celične viabilnosti smo izbirali med metodama TO/PI in AV/PI in
rezultate skušali primerjati z rezultati, dobljenimi s klasično metodo za določanje
celične viabilnosti, ki vključuje uporabo svetlobnega mikroskopa in barvila tripan
modro. Za spremljanje karakteristik celic CHO smo izbrali metodo AV/PI in
metodo za analizo celičnega cikla. Z izbranimi metodami pretočne citometrije smo
spremljali dva bioprocseh. Pretočna citometrija se je s svojimi metodami izkazala
kot primerna za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprocseh.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 576.08:579.66:66.098(043)=863
CX bioprocesses/ flow cytometry/apoptosis/necrosis/cell cycle/CHO cells
AU BIZJAK, Vesna
AA NARAT, Mojca (supervisor)/SCHWEIGER, Ana (co-advisor)/
IHAN, Alojz (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TI APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR CHO CELLS
CHARACTERISTICS MONITORING IN BIOPROCESSES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 76 p., 3 tab., 17 fig., 5 ann., 31 vir.
LA Sl
AL sl/en
AB Flow cytometry is a technique for analysis of biochemical and morphological cells characteristics. In the first part of the study, flow cytometry methods, which corresponded to our criteria, were chosen. Selected methods showed appropriate properties for bioprocess monitoring. Our goal was to measure percentage of apoptosis, cell viability and percentage of cells in different phases of cell cycle in samples taken from bioreactor. AV/PI and TUNEL assay methods for measurement of percentage of apoptosis were used. TO/PI and AV/PI assay methods for measurement of cell viability were used and we tried to compare results of these methods with results of classical method for assessing cell viability, e.g. light microscopy / trypan blue. Two methods of flow cytometry for monitoring of CHO cells characteristics, AV/PI assay method and method for cell cycle analysis, were chosen. In the second part of the study two bioprocesses with suitable flow cytometric methods were monitored. The flow cytometry with its methods showed appropriate performances for CHO cells characteristics monitoring in bioprocesses.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	CILJ RAZISKOVANJA.....	1
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	REKOMBINANTNA BIOTEHNOLOGIJA	3
2.2	CELICE CHO.....	4
2.3	CELIČNI CIKEL.....	5
2.4	NEKROZA IN APOPTOZA	6
2.5	BIOPROCESNA TEHNOLOGIJA.....	8
2.6	SPREMLJANJE IN VODENJE BIOPROCESA	10
2.7	PRETOČNA CITOMETRIJA.....	11
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	SHEMA POTEKA DELA.....	15
3.2	MATERIALI	16
3.2.1	Celična linija	16
3.2.2	Gojišče za rast in gojenje CHO DHFR negativnih celic v bioreaktorju	16
3.2.3	Gojišče za rast in gojenje CHO DHFR negativnih celic	16
3.2.4	Raztopine, pufri in reagenti.....	16
3.2.5	Oprema	19
3.3	METODE	21
3.3.1	Gojenje celic CHO (DHFR negativnih) v bioreaktorju	21
3.3.1.1	Priprava vcepka za bioreaktor	21
3.3.1.2	Spremljanje in vodenje bioprocasa.....	21
3.3.2	Priprava pozitivne in negativne kontrole za metodi AV/PI in TO/PI.	22
3.3.3	Analitske metode	23

3.3.3.1	Direktno štetje s svetlobnim mikroskopom in določanje celične viabilnosti z barvilom tripan modro	23
3.3.3.2	Metoda za določanje celične viabilnosti z barvili Tiazol oranž (TO) in Propidijev jodid (PI) s pretočnim citometrom	24
3.3.3.3	Metoda s fluorescentno označenim proteinom Aneksin V (AV) in barvilom Propidijev jodid (PI) za določanje deleža apoptotičnih celic s pretočnim citometrom	25
3.3.3.4	Metoda TUNEL za določanje deleža apoptotičnih celic s pretočnim citometrom	25
3.3.3.5	Določanje deleža celic v posameznih fazah celičnega cikla s pretočnim citometrom	26
4	REZULTATI.....	27
4.1	IZBIRA NAJUSTREZNEJŠIH METOD PRETOČNE CITOMETRIJE	27
4.1.1	Prikaz nekaterih značilnih točkovnih diagramov in/ali histogramov, ki smo jih dobili z različnimi metodami pretočne citometrije	27
4.1.1.1	Točkovni diagrami za metodo TO/PI	28
4.1.1.2	Točkovni diagrami za metodo AV/PI	30
4.1.1.3	Točkovni diagrami za metodo TUNEL	32
4.1.1.4	Točkovna diagrama in histograma za analizo celičnega cikla	36
4.1.2	Določanje deleža apoptotičnih celic z metodama pretočne citometrije	38
4.1.2.1	Določanje deleža apoptotičnih celic iz bioreaktorja	38
4.1.2.2	Določanje deleža apoptotičnih celic v spin-filtru	40
4.1.3	Določanje celične viabilnosti z metodama pretočne citometrije in direktnim štetjem s svetlobnim mikroskopom	41
4.2	SPREMLJANJE BIOPROCESA Z IZBRANIMI METODAMI	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	50
5.1	RAZPRAVA	50
5.1.1	Izbor metod pretočne citometrije, ki bi bile primerne za spremljanje bioprocsov	50
5.1.1.1	Izbor metode za določanje deleža apoptotičnih celic v bioprocusu	51
5.1.1.2	Izbor metode za določanje deleža živih celic v bioprocusu	54
5.1.2	Spremljanje bioprocsov	56
5.1.2.1	Spremljanje celične viabilnosti in apoptoze	56
5.1.2.2	Spremljanje celičnega cikla	60

5.1.3	Prednosti in slabosti pretočne citometrije za spremljanje bioprocsov	64
5.2	SKLEPI.....	65
6	POVZETEK.....	66
7	VIRI	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz celičnega cikla (Cell cycle, 2005).....	6
Slika 2: Shematski prikaz različnih načinov umiranja celic: apoptoze in nekroze (Blom, 2000).....	7
Slika 3: Primer bioreaktorja s spin-filtrom in nekaterimi drugimi sestavnimi deli. S takim bioreaktorjem je možen perfuzijski bioproces (Bierau in sod., 1998).....	10
Slika 4: Shematski prikaz pretočnega citometra (Brown in Wittwer, 2000).....	12
Slika 5: Točkovni diagrami negativne (A) in pozitivne (B) kontrole in celičnega vzorca iz bioreaktorja (C), ki smo jih dobili z metodo TO/PI z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.	28
Slika 6: Točkovni diagrami negativne (A) in pozitivne (B) kontrole in celičnega vzorca iz bioreaktorja (C), ki smo jih dobili z metodo AV/PI z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.	30
Slika 7: Točkovni diagrami negativne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.....	32
Slika 8: Točkovni diagrami pozitivne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.....	33
Slika 9: Točkovni diagrami pozitivne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.....	34
Slika 10: Prikaz točkovnih diagramov in histogramov dobljenih z analizo celičnega cikla s pretočnim citometrom.	36
Slika 11: Prikaz deleža apoptotičnih celic izmerjenega z metodama AV/PI in TUNEL. ..	39
Slika 12: Delež apoptotičnih celic v bioreaktorju in spin-filtru izmerjenega z metodama AV/PI in TUNEL.	40
Slika 13: Delež živih celic izmerjen z dvema metodama pretočne citometrije in s svetlobnim mikroskopom.	42
Slika 14: Spremljanje karakteristik celic CHO v prvem bioprocusu.....	44
Slika 15: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla v prvem bioprocusu.....	46
Slika 16: Spremljanje karakteristik celic CHO v drugem bioprocusu.....	48
Slika 17: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla v drugem bioprocusu.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Rezultati dobljeni s pretočno citometrijo z metodama AV / PI in TUNEL	38
Pregl. 2: Delež apoptotičnih celic v bioreaktorju in spin-filtru izmerjen z metodama AV/PI in TUNEL	40
Pregl. 3: Rezultati deleža živih celic (celične viabilnosti) dobljenih s pretočno citometrijo z metodama AV/PI, TO/PI in direktnim štejetjem s svetlobnim mikroskopom	41

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati spremljanja celične apoptoze in viabilnosti v prvem bioprocusu	71
Priloga B: Analiza celičnega cikla v prvem bioprocusu	73
Priloga C: Rezultati spremljanja celične apoptoze in viabilnosti v drugem bioprocusu	74
Priloga D: Analiza celičnega cikla v drugem bioprocusu	75
Priloga E: Primer izračuna celične koncentracije in viabilnosti dobljene z direktnim štetjem s svetlobnim mikroskopom s pomočjo barvila tripan modro.	76

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

-	negativno
+	pozitivno
Anti-BrdU mAb	monoklonska protitelesa, ki se vežejo na BrdU
AV	protein aneksin V
Celice CHO	celice iz ovarija kitajskega hrčka
DMEM-F12	Dulbecco modificiran Eagle's medij (gojišče za celice)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetra očetna kislina
FBS	goveji serum
FITC	fluorescin izotiocianat
FL1	Fluorescenčni detektor, ki meri zeleno fluorescenco
FL2	Fluorescenčni detektor, ki meri rumeno fluorescenco
FL3	Fluorescenčni detektor, ki meri rdečo fluorescenco
FSC	Forward Scatter; sipanje svetlobe v smeri vpadlega laserskega žarka
PBS	fosfatni pufer s soljo
PI	propidijev jodid
Pluronic F-68	kopolimer etilenoksida in propilenoksida
pO ₂	parcialni tlak kisika
PS	fosfatidilserin
rcf	relativna centrifugalna sila
SSC	Side Scatter; sipanje svetlobe pravokotno na smer vpadlega laserskega žarka
t	čas
TO	tiazol oranž
TRIS/HCl	tris(hidroksimetil)aminometan z natrijevim kloridom
Triton X-100	detergent, uporabljen za poškodovanje celične membrane
V/dan	volumen brozge v bioreaktorju, ki jo perfuzijska črpalka prečrpa v enem dnevu

SLOVARČEK

APOPTOZA: Z izrazom apoptoza imenujemo poseben način umiranja celic, ki se imenuje tudi celični samomor ali programirana celična smrt. Celico v apoptozi prepoznamo po značilnih morfoloških in biokemijskih spremembah, ki se razlikujejo od celice v nekrozi.

BIOPROCES: Proces pri katerem z uporabo mikroorganizmov ali evkariontskih celic ali njihovih delov pridobimo željen produkt.

BIOREAKTOR: Prostor oziroma posoda, kjer poteka bioproc.

CELIČNI DEBRI: Delci in ostanki razkrojenih celic.

DELOVNI ORGANIZEM: Organizem, ki se uporablja v bioprecesu z namenom pridobivanja zelenih produktov ali biomase.

METODA AV/PI: Metoda pretočne citometrije ali fluorescentne mikroskopije, ki omogoča detekcijo apoptotičnih celic na osnovi fosfolipida fosfatidilserina.

METODA TO/PI: Metoda pretočne citometrije ali fluorescentne mikroskopije, ki omogoča detekcijo nekrotičnih celic.

METODA TUNEL: Metoda pretočne citometrije ali fluorescentne mikroskopije, ki omogoča detekcijo apoptotičnih celic na osnovi fragmentirane DNK.

NEKROZA: Celična smrt, ki je povzročena z različnimi zunanjimi fiziološkimi dejavniki. Celico v nekrozi spoznamo predvsem po poškodovani celični membrani, ki ji sledi liza celične vsebine v zunajcelični prostor.

PERFUZIJSKI BIOPROCES: Bioproc pri katerem z dodajanjem svežega gojišča in odstranjevanjem starega gojišča želimo doseči čim večjo celično koncentracijo. Volumen gojišča v bioreaktorju je ves čas enak.

PRETOK PERFUZIJE: Ta izraz nam pove, koliko starega gojišča se odstrani iz bioreaktorja in koliko svežega gojišča se doda v bioreaktor. Pretok perfuzije označujemo z volumni bioreaktorja na dan (V/dan).

RECIRKULACIJA: S tem izrazom povemo, koliko litrov bioreaktorske brozge se dnevno prečrpa skozi spin-filter z namenom odstranjevanja mrtvih celic iz bioreaktorja in vračanja živih celic nazaj v bioreaktor.

REKOMBINANTNI PROTEIN: Protein, ki ga pridobimo s pomočjo vnesene rekombinantne DNK v gostiteljsko celico.

SPINER: Posebne steklenice različnih velikosti z mešalom, ki se uporabljajo za namnoževanje in gojenje sesalskih celic.

SPIN-FILTER: Poseben filter, ki je nameščen v ali izven bioreaktorja in odstranjuje celični debri in mrtve celice iz bioreaktorja, žive pa vrača nazaj v bioreaktor.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Celice CHO so sesalske celice, ki se pogosto uporabljajo za produkcijo heterolognih sesalskih proteinov. Za industrijski namen se celice gojijo v bioreaktorjih in cilj vsakega bioprocasa je, da se v bioreaktorju doseže čim večja celična koncentracija in čim boljša celična produktivnost. Gojenje sesalskih celic v bioreaktorjih je zelo zahteven proces, ki vključuje tudi spremljanje in vodenje bioprocasa. Za učinkovito vodenje bioprocasa je potrebno pridobiti čimveč podatkov o celičnem stanju v bioreaktorju. S klasičnimi metodami spremljanja karakteristik celic CHO s svetlobnim mikroskopom, dobimo le podatke o celični koncentraciji in celični viabilnosti. Različne metode pretočne citometrije bi lahko pomembno pripomogle h karakterizaciji celic CHO, saj omogočajo, da lahko pridobimo podatke o deležu apoptotičnih celic, celični viabilnosti in odstotku celic v posameznih fazah celičnega cikla. S spremljanjem bioprocasa z različnimi metodami pretočne citometrije, bi lahko dobili več informacij o stanju celic v bioprocasu.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilj te naloge je izmed različnih metod pretočne citometrije izbrati tiste, ki so primerne za spremljanje bioprocsov in jih preizkusiti pri spremljanju konkretnega bioprocasa. Z metodami pretočne citometrije smo želeli spremljati apoptozo, celično viabilnost in celični cikel in tako pridobiti čimveč informacij o karakteristikah celic CHO. Z metodami, ki so se pokazale za primerne, smo nato spremljali dva bioprocasa. Poskušali smo pridobiti čimveč informacij o karakteristikah celic CHO, kar bi v prihodnosti pomagalo pri vodenju bioprocsov, s čimer bi lahko izboljšali celično stanje v bioreaktorju.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Oblikovali smo naslednje hipoteze:

- Pretočna citometrija s svojimi metodami omogoča boljšo karakterizacijo celic CHO v bioprocseh, kot klasična metoda svetlobne mikroskopije in zato lahko pomembno pripomore k spremljanju bioprocsov.
- Metoda AV/PI je primerna za spremljanje deleža apoptotičnih celic v bioprocseh.
- Metoda TUNEL je primerna za spremljanje apoptotičnih celic v bioprocseh.
- Z metodo TO/PI lahko spremljamo celično viabilnost.
- Analiza celičnega cikla pokaže, da se ob dodajanju svežega gojišča v bioreaktor, poveča odstotek celic v S fazi celičnega cikla.

2 PREGLED OBJAV

2.1 REKOMBINANTNA BIOTEHNOLOGIJA

Biotehnologija je veda, ki povezuje naravoslovne in inženirske znanosti. Namen biotehnologije je doseči uporabo organizmov, celic, njihovih delov ali molekularnih analogov v proizvodnji in storitvah. Bioprocen je proces pri katerem z uporabo mikroorganizmov ali evkariontskih celic ali njihovih delov pridobimo željen produkt. Izraz rekombinantna biotehnologija se nanaša na biotehnologijo, kjer izkoriščamo gensko spremenjene organizme. Veda, ki se ukvarja z gensko spremenjenimi organizmi je genski inženiring. Nameni genskih inženirjev so (1) izolacija željenega gena, (2) manipulacija tega gena, (3) uspešen vnos gena v gostiteljsko celico in (4) dobro izražanje v gostiteljski celici. Metode genskega inženiringa se uporabljajo v bazičnih raziskavah in tudi v industriji. Raziskovalci s tehnikami genskega inženiringa želijo odkriti mehanizme podvojevanja genov in njihovega izražanja v prokariontih, evkariontih in virusih. V industriji metode genskega inženiringa omogočajo razvoj ustreznih mikrobnih ali celičnih kultur, ki producirajo komercialno zanimive produkte, kot so: človeški hormoni, citokini, cepiva in industrijski encimi. Organizmi, ki se uporabljajo za pridobivanje željenih produktov, se imenujejo delovni organizmi. Najpogosteje se v biotehnologiji uporabljajo mikroorganizmi (bakterije in kvasovke), za produkcijo evkariontskih proteinov pa so zaradi podobnosti pri sami sintezi najprimernejše sesalske celice. Slabosti bioprocsov s sesalskimi celicami so, da so zaradi občutljivosti celic bioproceni težje prenosljivi na industrijski nivo in da je količina produkta nižja kot pri drugih delovnih organizmih, ker se celice počasneje delijo (Madigan in sod., 2000).

Pri mikroorganizmih in sesalskih celicah gen za rekombinantni protein vnesemo v celico z ustreznim vektorjem. Največkrat za vektor uporabimo plazmid, lahko pa tudi virusni vektor, liposom ali pa za vnos gena uporabimo balistično obstreljevanje tkiva s tujo DNK, ki je adsorbirana na težke kovinske delce. Gen lahko pred vnosom v celico tudi delno modificiramo, da se lažje izraža v gostiteljskem organizmu (Nelson in Cox, 2000). Celice v ustreznih pogojih rastejo in se delijo in dobimo populacijo rekombinantnih celic. S

selekcijo izberemo najbolj produktiven klon, ki se bo nato uporabljal kot delovni organizem za produkcijo željenega produkta. Z izbiro ustreznega gojišča in njegovih dodatkov, izbiro najustreznejše bioreaktorske tehnologije in optimizacijo fizikalnih in kemijskih pogojev v bioreaktorju, poskušamo doseči čim višjo celično koncentracijo. Če smo pri vsem uspešni, dobimo učinkovit in visoko produktiven bioproces (Leelavatcharamas in sod., 1996).

2.2 CELICE CHO

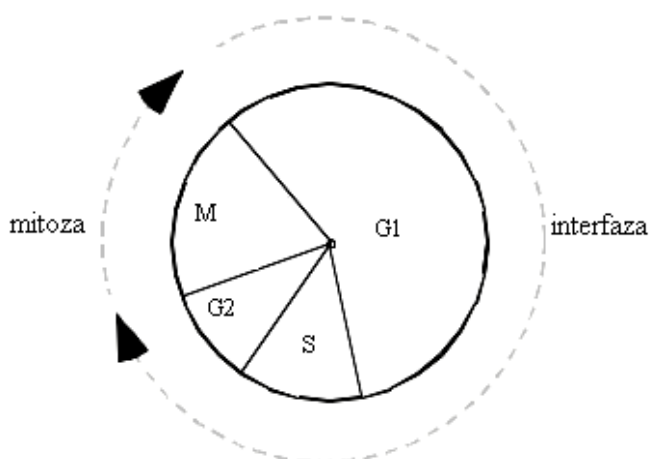
Celice CHO so sesalske celice pridobljene iz ovarija kitajskega hrčka (Puck in sod., 1958) in so najpogosteje uporabljena celična kultura za proizvodnjo sesalskih proteinov (Wurm, 1999). V tem sistemu lahko teoretično sintetiziramo katerikoli sesalski protein v aktivni obliki. Danes v farmacevtski industriji kompleksnejše sesalske proteine večinoma proizvajajo s pomočjo celic CHO, saj ta delovni organizem omogoča pridobivanje proteinov z višjo biološko aktivnostjo in kompleksnejšo biokemično strukturo, kot proizvodnja v bakterijah in kvasovkah. Biološka aktivnost proteina in njegove farmakokinetične karakteristike so tudi rezultat kompleksnih proteinskih sprememb (modifikacij) (postrnlacijski mehanizmi celic), kot so: disulfidni mostički, oligomerizacija, proteolitični procesi, fosforilacija in glikolizacija. Poleg pomembnih postrnlacijskih mehanizmov imajo celice CHO tudi druge pomembne karakteristike. Vnos gena za željen protein v celico CHO je dokaj enostaven in učinkovit, celice v primernem gojišču dobro rastejo v bioreaktorjih, možen pa je tudi prenos bioprocasa v večje merilo za industrijsko proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Pomembna prednost sesalskih celic v primerjavi z mikroorganizmi je večja genetska stabilnost delovnih organizmov, saj sesalske celice ne mutirajo tako hitro kot bakterijske. Slabosti celic CHO in tudi drugih sesalskih celic v primerjavi z drugimi gostiteljskimi organizmi, kot sta pogosto uporabljena bakterija *E.coli* in kvasovka *S. cerevisiae* so: (1) počasnejše razmnoževanje sesalskih celic, (2) nižja produkcija proteinov in (3) težji prenos na industrijski nivo. Za gojenje sesalskih celic potrebujemo kompleksna gojišča in visoko sofisticirano bioreaktorsko tehnologijo, kar poveča stroške bioprocsov (Wurm, 1999).

2.3 CELIČNI CIKEL

Celični cikel je cikel, ki vključuje dogajanje v celici (rast, podvojitev genetskega materiala, delitev jedra in citoplazme) in se začne takoj po delitvi starševske celice ter zaključi po delitvi hčerinske celice (Leelavatcharamas in sod., 1996).

Celični cikel v grobem delimo na obdobje interfaze, ko celica raste in se pripravlja na delitev, in obdobje delitve, ki mu pravimo M faza. Celice večino časa preživijo v interfazi. V interfazi pride do dekonenzacije kromosomov, celične rasti in končno do podvojitve DNK, kar je pogoj za začetek mitoze. Podvojitev dednega materiala je mejnik, ki interfazo razdeli na tri obdobja: G1, S in G2 fazo. V G1 fazi celice rastejo in so metabolno najbolj aktivne. Sledi S faza kjer poteka sinteza DNK dokler se količina DNK ne podvoji. Po S fazi nastopi G2 faza, kjer se sinteza DNK ustavi, nadaljuje pa se celična rast in začne sinteza proteinov, ki so potrebni v mitozu. Ko celica preide preko G2 faze se začne četrto obdobje, to je M faza, ki ji rečemo tudi mitoza. V M fazi poteče delitev jedra in delitev citoplazme in iz ene dobimo dve ločeni celici (Veranič, 2000).

Eukariotske celice, vzgojene v kultur, se delijo približno na 24 ur, vendar se dolžina ciklusa razlikuje glede na vrsto celic. Za človeške celice naj bi veljalo, da G1 faza traja približno 11 ur, S faza 8 ur, G2 faza 4 ure in M faza 1 uro. Celični cikel oziroma celično delitev sestavljajo štirje usklajeni procesi: celična rast, podvojitev DNA, sinteza proteinov pomembnih za celično delitev in delitev celice. Vsak od teh procesov predstavlja določeno fazo celičnega ciklusa (Cooper, 2000).



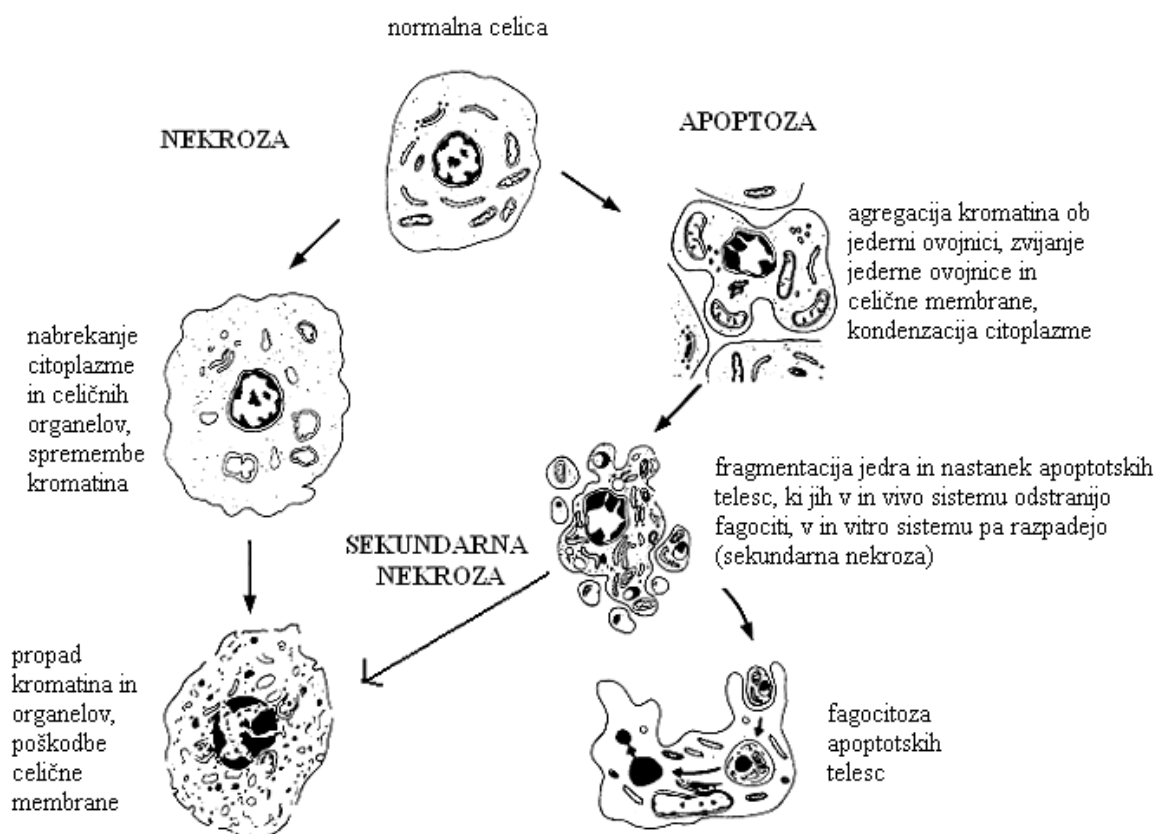
Slika 1: Shematski prikaz celičnega cikla (Cell cycle, 2005).

2.4 NEKROZA IN APOPTOZA

Število celic v tkivu *in vivo* in v bioreaktorju *in vitro* je odvisno od razmerja med delitvami in odmiranjem celic. Poznamo dva načina odmiranja celic. Prvi je nekroza in je povzročen s fiziološkimi dejavniki. Nekroza navadno nastopi ob ekstremnih spremembah okolja, v katerem celice gojimo (sprememba pH, sprememba temperature, prisotnost toksičnih spojin) ali zaradi dejavnikov, ki so v bioreaktorju preveč grobi za celice (pregrobo mešanje in prezračevanje). Med nekrozo se pojavijo poškodbe celične membrane, kar privede do vdiranja vode in ionov v celico. Celični organeli nabreknejo in v končni fazi pride do lize celice. Celična vsebina se sprosti v zunajcelični prostor (Veranič, 2000).

Drugi način odmiranja celic je apoptoza. Apoptoza je poznana kot aktivno celično umiranje, celični samomor ali programirana celična smrt, ki je genetsko natančno vodena. Najpogostejši vzroki za apoptozo celic v bioreaktorjih so: pomanjkanje ustreznih hranil, prevelika koncentracija celičnih metabolitov, neustrezna temperatura, odsotnost seruma in napake v regulaciji celičnega ciklusa (Singh in sod., 1994). Proces apoptoze razdelimo na tri faze. V prvi, indukcijski fazi različni signali usmerijo celico na pot apoptoze. Druga, kontrolna faza je namenjena temu, da se celica odloči ali bo sprožila program apoptoze ali ne (ta je odvisna od jakosti in škodljivosti signala). V tretji fazi, ki je ireverzibilna pa celico zaznamujejo številne morfološke in biokemijske spremembe, ki so značilne za apoptozo

(Veranič, 2000). Zgodnji znak apoptoze je dehidracija celice. Celica izgubi vodo iz citoplazme in citoplazma se zgošča. Celica postane manjša in nagubana. V zgodnji fazi apoptoze se spremenijo tudi karakteristike celične membrane. Fosfolipid fosfatidilserin (PS), ki je normalno prisoten na notranji strani celične membrane, se v zgodnji apoptozi prenese na zunanjo stran celične membrane. V apoptozi pride do kondenzacije citoplazme, fragmentacije jedra, kondenzacije jedrnega kromatina, porušitve mitohondrijskega membranskega potenciala, denaturacije in fragmentacije DNK in v končni fazi do razpada celice na apoptotska telesa, ki jih v *in vivo* sistemu odstranijo fagociti s fagocitozo (Darzynkiewicz in sod., 1997). V *in vitro* sistemu pa membrana apoptotskih telesc sčasoma razpade in ta pojav je poznan pod imenom sekundarna nekroza (Milner in sod., 1996).



Slika 2: Shematski prikaz različnih načinov umiranja celic: apoptoze in nekroze (Blom, 2000).

2.5 BIOPROCESNA TEHNOLOGIJA

Bioprocena tehnologija predstavlja postopek aerobne ali anaerobne gojitve prokariotskih ali evkariotskih celic v bioreaktorjih z eksperimentalnim ali komercialnim namenom. Uporabi mikroorganizmov, evkariotskih celic ali celičnih delcev za pridobivanje željenega produkta pravimo bioproc, posoda, kjer vse skupaj poteka pa se imenuje bioreaktor. Za uspešen bioproc pa ni dovolj le bioreaktor, temveč potrebujemo kompleksnejši sistem, ki nam omogoča ustrezno vodenje in spremljanje bioprocena. Bioreaktor je le del bioreaktorskega sistema, kamor sodijo še: mešalo, sterilizator zraka in prezračevalnik, podnožje bioreaktorja z motorjem, ki poganja mešalo, merilec pritiska, merilec temperature, črpalke za dovajanje svežega gojišča v bioreaktor in črpalke za odvajanje brozge, številni senzorji in elektrode, ki omogočajo kontrolo fizikalnih in kemijskih pogojev v bioreaktorju. Vsak bioreaktorski sistem je sestavljen nekoliko drugače in njegovi sestavni deli so odvisni od vrste in zahtevnosti bioprocena.

Bioreaktor z enkratnim polnjenjem

V bioreaktorju z enkratnim polnjenjem poteka zaprt bioproc. V gojišče na začetku bioprocena dodamo vcep in počakamo, da je bioproc končan. Bioreaktorji z enkratnim polnjenjem se uporabljajo tudi za kultivacijo sesalskih celic, vendar imajo številne slabosti: nizka koncentracija celic, izraba gojišča, ki ji sledi celična smrt in posledično nizka produktivnost. Zato so inženirji razvili še druge bioreaktorske tehnologije (Pavko, 1996).

Bioreaktor z dohranjevanjem

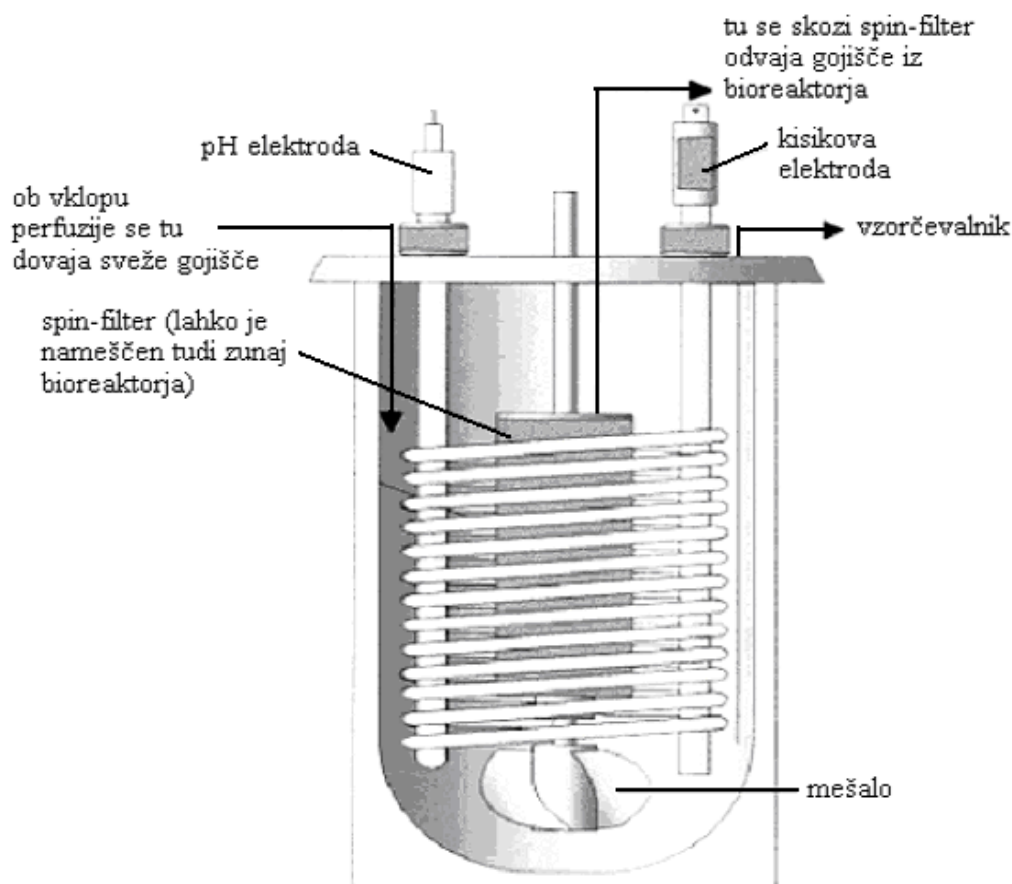
V tem bioreaktorju poteka polzaprt bioproc. Pri kultivaciji celic v bioreaktorju z dohranjevanjem lahko povečamo število celic in podaljšamo bioproc, ker pred izrabo gojišča dodajamo novega. Vendar to ne gre v nedogled, ker se s tem večja volumen v bioreaktorju, črpalke, ki bi odvajala gojišče iz bioreaktorja pri tem sistemu ni (Pavko, 1996).

Bioreaktor z neprekinjenim polnjenjem

Tu poteka kontinuirani bioproces. Pri tem bioreaktorskem sistemu imamo dve črpalki. Prva dovaja sveže gojišče v bioreaktor in s tem omogoči, da imajo celice dovolj hrane. Druga črpalka pa odvaja gojišče iz bioreaktorja in volumen brozge v bioreaktorju je ves čas konstanten. Celice na ta način vzdržujemo v uravnoteženem fiziološkem stanju in pri stalni hitrosti rasti. Težavi, ki se pojavljata pri gojenju evkariontskih celic v tem bioreaktorju sta, da se z odstranjevanjem gojišča iz sistema odstranjuje tudi delovni organizem in večje tveganje kontaminacije (Pavko, 1996).

Perfuzijski bioreaktor s spin-filtrom

Perfuzijski bioreaktor je izboljšana različica bioreaktorja z neprekinjenim polnjenjem in je zelo uporaben za kultivacijo sesalskih celic. Perfuzijski bioproces začnemo enako kot zaprt bioproces. V izbrano gojišče dodamo vcepek in počakamo, da se celice namnožijo. Pri tem vestno spremljamo celično število in izrabo gojišča. Ko se celice dovolj namnožijo in je gojišče že izrabljeno, začnemo s perfuzijo. Črpalka, ki je del perfuzijskega bioreaktorskega sistema, začne dovajati sveže gojišče, kar pomeni novo hrano za celice. Na začetku perfuzije je dovajanje svežega gojišča manjše, ko pa se število celic v bioreaktorju poveča in kakovost gojišča pade, povečamo pretok perfuzije in s tem v bioreaktor dovedemo več svežega gojišča. Del perfuzijskega bioreaktorskega sistema je tudi črpalka, ki odvaja bioreaktorsko brozgo (žetev), da je volumen v bioreaktorju ves čas enak. V žetvi je željen produkt, ki ga je potrebno izolirati in očistiti v zaključnih procesih. Pomemben del perfuzijskega bioreaktorskega sistema je spin-filter, ki je nameščen pred črpalko, ki oddvaja žetev iz bioreaktorja. Celice se ujamejo v spin-filter, ki deluje tako, da žive celice zadrži in vrne v bioreaktor, mrtve celice in celični debris, ki imajo drugačne membranske karakteristike od živih celic, pa izloči iz bioreaktorskega sistema. Tako izpopolnjen perfuzijski sistem omogoča zadosten vnos svežega gojišča, odstranjevanje izrabljenega gojišča, zadrževanje živih celic v bioreaktorju in odstranjevanje mrtvih celic iz bioreaktorja. V perfuzijskem bioreaktorju lahko dosežemo najvišje število celic, najvišjo produktivnost in najdaljšo življensko dobo bioprocesa (Leelavatcharamas in sod., 1999).



Slika 3: Primer bioreaktorja s spin-filtrom in nekaterimi drugimi sestavnimi deli. S takim bioreaktorjem je možen perfuzijski bioproces (Bierau in sod., 1998).

2.6 SPREMLJANJE IN VODENJE BIOPROCESA

Pri bioprocusu vedno poteka spremljanje in beleženje fizikalnih (temperatura, pritisk, pretok, viskoznost), kemijskih (pH, koncentracija kisika in ogljikovega dioksida, koncentracija metabolitov) in bioloških (koncentracija celic, celična viabilnost) parametrov v bioreaktorju. Spremljanje bioprocasa omogočajo senzorji, elektrode in sonde, ki so del bioreaktorskega sistema. Če so nameščeni v bioreaktorju, temu pravimo »online« spremljanje. »Semi online« spremljanje je, če so merilni instrumenti nameščeni izven bioreaktorja, a se vzorec vrne v bioreaktor. Poznamo tudi off-line spremljanje, pri katerem operater vzame vzorec iz bioreaktorja in ga kasneje analizira. Fizikalni parametri se večinoma spremljajo »online«, kemijski »online« in »off-line« in biološki »off-line«.

Spremljanje bioprocasa je nujno za kontrolo pogojev v bioreaktorju in uspešno vodenje bioprocasa.

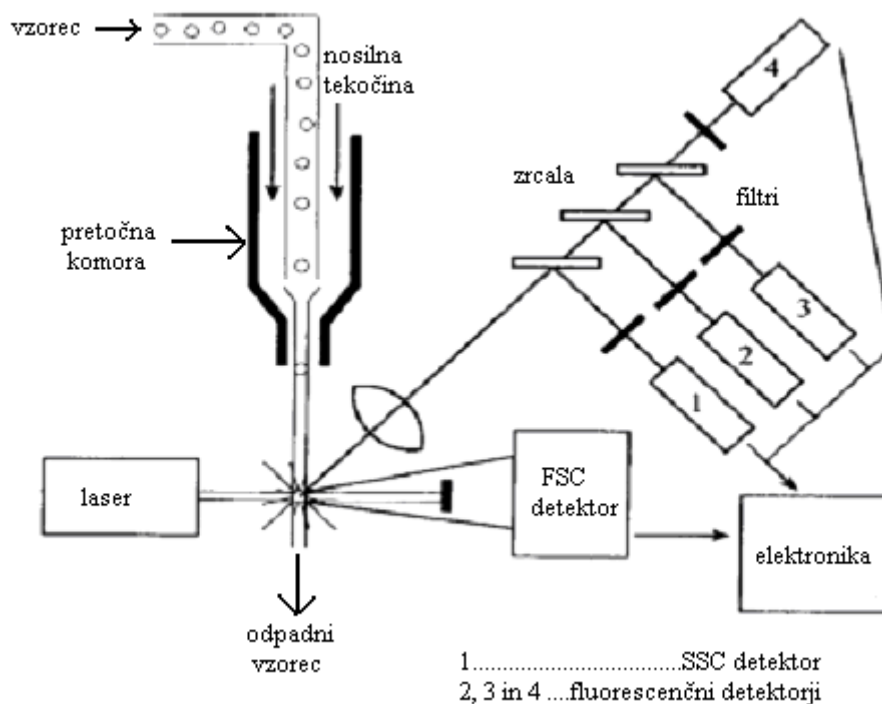
2.7 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je tehnika s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam da zanesljivo podobo o fizikalnih in biokemičnih lastnostih celic. Svetlobni žarek zadane ob celico, se odbije, lomi, ali pa se absorbira v fluorokromih, če smo jih predhodno vezali na celice in celica s fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine (Kotnik in sod, 2001).

Fotodetektor FSC (Forward Scatter) detektira svetlobo, ki jo celica sipa v smeri laserskega žarka in količina sprejete svetlobe je povezana z velikostjo celice. Fotodetektor SSC (Side Scatter) detektira razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je povezana z granuliranostjo celice (Shapiro, 2003). Granuliranost celice je posledica količine in lastnosti membranskih struktur celice (lizosomov, endoplazmatskega retikuluma, fagosomov, citoplazemske in jederne membrane). Poleg fotodetektorjev FSC in SSC ima pretočni citometer tudi fluorescenčne detektorje (FL1, FL2 ...), ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Preko sistema filtrov in zrcal posamezen fluorescenčni fotodetektor prejme svetlobo določene valovne dolžine in izmeri signal, ki ga oddaja fluorokrom. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne, ki jih izmerimo, obdelamo z ustreznimi računalniškimi programi in prikažemo v obliki točkovnih diagramov in/ali histogramov. O celicah dobimo podatke o njihovi velikosti in granuliranosti in o vrstah in moči fluorescenčnih signalov. Celice lahko razvrstimo glede na posamezne lastnosti (Ihan, 1999).

Glavni sestavni deli pretočnega citometra so: vir svetlobe, pretočni sistem za regulacijo toka nosilne tekočine skozi ustrezno svetlobo, optični sistem za fokusiranje in usmerjanje svetlobe, elektronika, ki omogoča merjenje intenzitete svetlobnega signala in spreminjanje

svetlobnega signala v električnega ter računalniški sistem z ustreznimi programi za analizo dobljenih podatkov (Givan, 2001).



Slika 4: Shematski prikaz pretočnega citometra (Brown in Wittwer, 2000)

Pretočna citometrija ima več možnosti uporabe v bioloških in medicinskih znanostih in se uporablja tako v raziskovalne, kot v diagnostične namene. Vse več se uporablja tudi za identifikacijo, karakterizacijo, spremljanje in kontrolo delovnih organizmov v bioprocseh. S pomočjo pretočne citometrije lahko pridobimo več informacij o delovnem organizmu v bioprocusu, kar omogoča lažjo optimizacijo in vodenje bioprocesa (Leelavatcharamas in sod., 1996). Pretočna citometrija s svojimi tehnikami med drugim omogoča merjenje in določevanje deleža apoptotičnih celic, merjenje in določevanje mrtvih celic in analizo celičnega cikla. Metode pretočne citometrije izkoriščajo morfološke in biokemijske spremembe celic, ki so značilne za apoptozo, nekrozo ali določeno fazo celičnega cikla. S številnimi tehnikami pretočne citometrije dobimo več podatkov o stanju celic v preiskovanem vzorcu.

Obstaja več metod pretočne citometrije za določanje deleža apoptotičnih celic v celičnih vzorcih. Najbolj specifični metodi za določanje deleža apoptotičnih celic sta metodi AV/PI in TUNEL (Overbeeke in sod., 1998).

Z metodo AV/PI lahko določamo celice, ki so v zgodnji apoptozi. Protein AV se veže na fosfolipid fosfatidilserin (PS). V živi celici je PS prisoten na notranji strani celične membrane, ko pa celica sproži apoptozo se PS prenese na zunanjo stran membrane. AV ima visoko afiniteto do PS. Za merjenje apoptoze s pretočnim citometrom mora biti AV označen s fluorokromom. AV prodre tudi v nekrotične celice, ker imajo le te poškodovano membrano in se veže na PS, ki je na notranji strani celične membrane. Za razlikovanje apoptotičnih in nekrotičnih celic se uporabi PI, ki prodre v nekrotične celice v apoptotične pa ne. Po končani obdelavi celičnega vzorca se na žive celice ne veže nič (ostanejo neoznačene), na mrtve (nekrotične) celice se vežeta AV in PI (so AV in PI pozitivne), na apoptotične celice se veže AV (so AV pozitivne). S to metodo lahko določimo delež živih, apoptotičnih in mrtvih celic (VybrantTM Apoptosis Assay Kit #2, 2001).

Z metodo TUNEL (terminal deoxynucleotidiltransferase dUTP nick and labeling) lahko določamo celice, ki so v pozni apoptozi. V poznejši fazi apoptoze pride o fragmentacije jederne DNK. V programu apoptoze se aktivirajo encimi imenovani endonukleaze, ki razrežejo DNK na manjše fragmente, ki so dolgi od 50-300 baznih parov in imajo izpostavljene 3'OH proste konce. Metoda vključuje uporabo encima terminalne deoksinukleotidil transferaze, ki deluje tako, da dodaja označene nukleotide (Br-dUTP) na 3'OH proste konce DNK fragmentov. Nastane polinukleotidni rep Br označenih nukleotidov. Po dodatku s fluorokromom označenih protiteles (FITC/ anti-BrdUTMAb), ki se vežejo na polinukleotidni rep, je omogočena detekcija fragmentirane DNK s pretočnim citometrom (Apo-BrdUTM Kit, 2005).

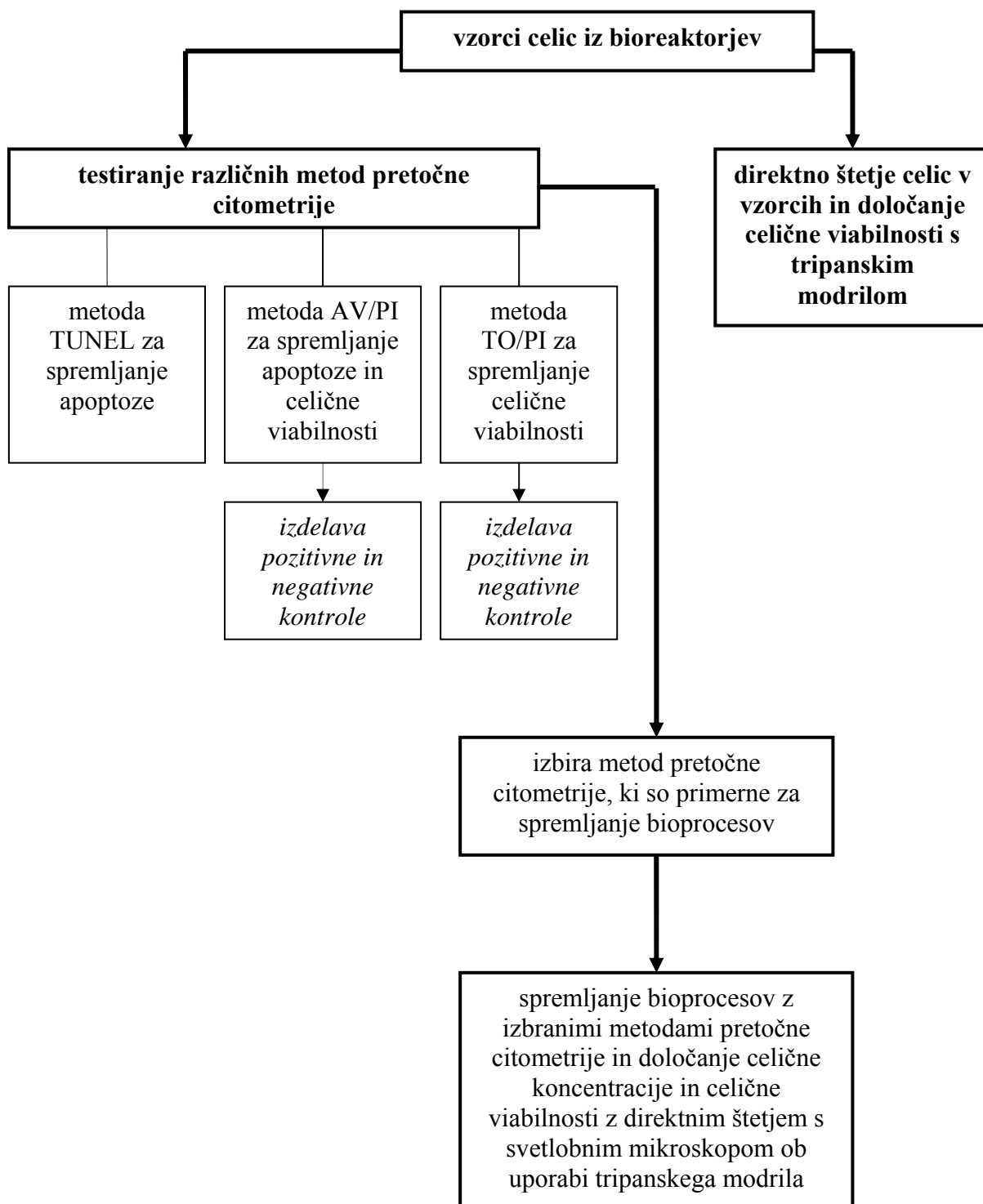
Za določanje celične viabilnosti s pretočnim citometrom se lahko uporabi že opisana metoda AV/PI ali pa metoda, ki vključuje uporabo dveh fluorescentnih barvil barvil TO in PI. Obe barvili se vežeta na jederno DNK. Celična membrana je propustna za barvilo TO in zato TO vstopa tako v žive kot v mrtve celice, vendar v različni meri. Membrana živih celic je nepropustna za barvilo PI, ki lahko vstopa samo v celice s poškodovano membrano

(nekrotične celice). Kombinacija obeh barvil omogoča, da s pretočno citometrijo lahko ločimo med živimi in mrtvimi celicami in tako določimo celično viabilnost (BD Cell Viability Kit, 2002).

Za analizo celičnega cikla se navadno uporabljajo različni detergenti, ki poškodujejo celično membrano kar omogoči vstop fluorescentnega barvila v celice in vezavo barvila na jederno DNK. Metoda za določanje v kateri fazi celičnega cikla je celica, temelji na merjenju količine jederne DNK, ki se razlikuje glede na fazo celičnega cikla. Količino DNK določimo s pomočjo fluorescenčnega barvila PI, ki se veže na DNK. Količina vezanega PI je sorazmerna količini DNK. Celice v G1 fazi imajo eno kopijo DNK in zato celice v G2 in M fazi, ki imajo dve kopiji DNK, oddajajo dvakrat več fluorescence, kot celice v G1 fazi. Celice, ki so v S fazi celičnega cikla pa tekom S faze sintetizirajo DNK, zato se fluorescenca v S fazi s časom povečuje. Jakost fluorescence celic, ki so v S fazi, je večja od fluorescence celic G1 faze in manjša od fluorescence celic, ki so v G2 ali M fazi celičnega cikla. Jakost fluorescence lahko merimo s pretočnim citometrom (Ormerod, 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



3.2 MATERIALI

3.2.1 Celična linija

Uporabili smo CHO celice: CHO DHFR negativne (ATCC številka CRL-9096). V gojišču brez seruma rastejo suspenzijsko. Te celice nimajo funkcionalnega gena za encim dihidrofolat reduktazo (so DHFR-). Po transfekciji celic s funkcionalnim ekspresijskim vektorjem za DHFR, se lahko v posebnih gojiščih selekcionirajo celične linije, ki so s transfekcijo pridobile funkcionalen DHFR gen.

3.2.2 Gojišče za rast in gojenje CHO DHFR negativnih celic v bioreaktorju

Gojišče smo pripravili iz mešanice, ki jo je za farmacevtsko družbo Lek d.d. pripravilo podjetje Sigma. Dodali smo mu še nekatere aminokislino in vitamine. Gojišče je brez seruma. Gojišče je pripravljeno s posebno čisto vodo, ki jo dobimo z napravo za pripravo demineralizirane vode. Podrobne sestave gojišča nismo napisali, ker sodi med zaupne informacije farmacevtske družbe Lek d.d.

3.2.3 Gojišče za rast in gojenje CHO DHFR negativnih celic

Celice smo gojili v gojitvenih posodicah v gojišču DMEM-F12 (Cambrex), ki je vsebovalo 10 % FBS (Cambrex). Celice se zaradi prisotnosti FBS pritrdijo na dno gojitvene posodice in jih je pred analizo s pretočnim citometrom potrebno tripsinizirati. Te celice so nam služile kot negativna kontrola v poskusih merjenja deleža apoptotičnih celic z metodo AV/PI in celične viabilnosti z metodo TO/PI.

3.2.4 Raztopine, pufri in reagenti

Vse vodne raztopine smo pripravili s posebno čisto vodo.

- 10 x pufer PBS (Gibco)
- NOSILNA TEKOČINA BD FACS Flow™ (BD Biosciences)
- 0,4 % TRIPAN BLUE (Gibco)
- 70 % ETANOL (iz 96 % Etanola; Merck)

Za analizo apoptoze smo uporabljali naslednje reagente:

- 1 % PARAFORMALDEHID, pH=7,4

Za pripravo 10 ml smo zatehtali 0,1 g paraformaldehida (Sigma) in ga raztopili v 0,5 ml vode. Za lažje raztapljanje smo dodali kapljico 1M NaOH. Raztopino smo 3 min segrevali v termobloku pri 80 °C. Nato smo raztopini dodali 9,5 ml 10 x PBS in dobro premešali. Tako pripravljen 1 % paraformaldehid smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

- APO-BRDU™ KIT (BD, kataloška številka 556405)

Kit vsebuje: 0,30 ml FITC označenih Anti-BrdU mAb
30 ml PI/RNaza vezavnega pufra (5 µg/ml PI in 200 µg/ml RNaze)
0,60 ml reakcijskega pufra
120 ml pufra za spiranje A
120 ml pufra za spiranje B

Te raztopine in reagente smo shranili v temi pri 4 °C.

0,48 ml Br-dUTP (54,7 µg/ml)
5 ml negativne kontrole v 70 % etanolu
5 ml pozitivne kontrole v 70 % etanolu
0,045 TdT encima (200 µg/ml v 50 % glicerolu)

Zadnje 4 komponente kita smo shranili v temi pri -20 °C.

Ob vsaki uporabi APO-BRDU kita smo pripravili:

DNK vezavna raztopina (ta količina zadostuje za en vzorec)

Odpipetirali smo 10 µl reakcijskega pufra, 0,75 µl TdT encima, 8 µl Br-dUTP in 32,25 µl destilirane vode.

Raztopina protiteles za označevanje DNK (ta količina zadostuje za en vzorec)

Odpipetirali smo 5 µl FITC označene Anti-BrdU mAb in 95 µl pufra za spiranje A.

- DELOVNA RAZTOPINA KAMPTOTECINA S KONCENTRACIJO 1mM

Za 1 ml delovne raztopine smo zatehtali 3,4 mg Kamptotecna (Sigma) in ga raztopili v 1 ml dimetilsulfoksida (DMSO). Raztopino smo shranili pri sobni temperaturi.

- VYBRANT™ APOPTOSIS ASSAY KIT #2 (Molecular Probes, Kataloška številka V-13241)

Kit vsebuje: 250 µl raztopine Alexa Fluor 488 aneksina V
100 µl propidijevega jodida s koncentracijo 1 mg/ml
15 ml 5x Aneksin vezavnega pufra

Vse komponente kita smo shranili v temi pri 4 °C.

Iz raztopin in reagentov, ki so v kitu smo pripravili:

1x Aneksin vezavni puffer (ABB)

Odpipetirali smo 1 ml 5 x ABB in mu dodali 4 ml VRT vode. Ta količina ABB je zadostovala za 3 vzorce. Vedno smo pripravili svežo raztopino.

Delovno raztopino PI s koncentracijo 100 µg/ml

Odpipetirali smo 5µl PI s koncentracijo 1 mg/ml in mu dodali 45 µl 1 x ABB. Tako pripravljen PI je zadostoval za več vzorcev je lahko shranjen v temi pri 4 °C.

Za analizo celične viabilnosti smo uporabljali naslednjo reagente:

- PBS z 0,2 % PLURONIC F-68 in 1mM EDTA

200 ml omenjene raztopine smo pripravili tako, da smo zatehtali 74 mg EDTA (Sigma) in zatehto prenesli v 200 ml merilni valj, dodali 4 ml 10 % Pluronic F-68 (Sigma) in dopolnili z 10x pufrom PBS (Gibco) do 200 ml. Dobro smo premešali in prefiltrirali skozi filter, ki ima premer por 0,2 µm. Raztopino smo shranili pri 4 °C.

- BD CELL VIABILITY KIT (BD Biosciences, kataloška številka 349483)

Kit vsebuje: Tiazol oranž (TO) s koncentracijo 42 µM
Propidijev jodid s koncentracijo 4,3 mM

Komponente kita smo shranili v temi pri 4 °C.

Za analizo celičnega cikla smo uporabljali naslednje reagente:

- 0,1M TRIS/HCl z 0,1 % TRITON X-100 in 2mM MgCl₂, pH=7,4

Za pripravo 500 ml smo zatehtali 7,88 g Tris/HCl (Merck) in 0,203 g MgCl₂·6H₂O(Merck). Zatehto smo prenesli v 500 ml čašo in dodali 0,5 ml Tritona X-100 (Merck) in približno 400 ml VRT vode. Dobro smo premešali in izmerili pH, ki smo ga z 1M NaOH uravnali na 7,4. Vsebino čaše smo prelili v 500 ml bučko in jo z vodo dopolnili do oznake 500 ml. Raztopino smo prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,2 µm in shranili pri 4 °C.

- DELOVNA RAZTOPINA PI S KONCENTRACIJO 1mg/ml

Za 1 ml delovne raztopine PI smo zatehtali 1 mg PI (Sigma) in ga raztopili v 1 ml vode. Shranili smo ga v temi pri 4 °C.

- DELOVNA RAZTOPINA RIBONUKLEAZE A (RNazaA) S KONCENTRACIJO 10mg/ml

RNazo A (Sigma, R5500) smo segreli na sobno temperaturo. Za pripravo 1 ml smo zatehtali 10 mg RNaze A in jo raztopili v 1 ml vode. Raztopino smo odpipetirali v epico in epico prenesli za 15 minut v termoblok, ki smo ga predhodno ogreli na 100 °C. S segrevanjem uničimo DNazo. Raztopino smo nato razdelili v manjše epice in shranili pri -20 °C.

3.2.5 Oprema

- CO₂ inkubator (Binder)
- Vodna kopel (Julaba)
- Analitska tehtnica (Mettler Toledo)
- pH meter 713 (Metrohm)
- Centrifuga za analitske vzorce do 50 ml: 5810R (Eppendorf)
- Svetlobni mikroskop CH 20 (Olympus)
- Termoblok (Biometra)
- Vibro-mix mešalo (Tehtnica)

- Izboljšan hemocitometer: Neubauerjeva komora (Blau Brand)
- Celuloza-acetatni filtri: premer por je 0,2 μm (Sartorius)
- Vakumska črpalka (Millipore)
- Mikrobiološka komora Iskra PIO M12 (Iskra)
- Gojitvene posodice: s površinami 25 cm^2 , 150 cm^2 in 175 cm^2 za gojenje celic (Corning and Costar)
- Spinner: posebna steklenica z volumnom 1 liter za gojenje celic (Integra Biosciences)
- Spinerska ploščad (Integra Biosciences)
- Biorektorski sistem:
 - *Bioreaktor (BBI Systems Biostat B5) s totalnim volumnom 6,6 l, delovnim volumnom 5 l, razmerje višina proti širine je 2,2:1. Bioreaktor ima mešalo, ki ima po svoji osi nameščene trikrat po dve lopatici, ki so obrnjene za 90° in prstanast prezračevalnik (perforirani prstan). V bioreaktorju je nameščen termometer (Pt100), pH elektroda (Mettler-Toledo) in pO₂ elektroda (Mettler-Toledo).
 - *Spin-filter (Sartorius BBI System ESF 200G). Premer spin-filtra je 85 mm, višina je 292 mm in volumen je 1,65 l.
- Pretočni citometer FASC Calibur (Becton Dickinson)
- Epruvete za pretočni citometer (BD Falcon)
- Računalniški programi:
 - *CELL Quest: program za akvizicijo in analizo podatkov, dobljenih s pretočnim citometrom (FASC Calibur)
 - *WinMDI 2.8: program za analizo podatkov, dobljenih s pretočnim citometrom in izris histogramov (Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, ZDA)
 - *Cylchred 1.0.2: program za analizo celičnega cikla (Michael Ormerod, Terry Hoy, University of Cardiff, UK)

3.3 METODE

3.3.1 Gojenje celic CHO (DHFR negativnih) v bioreaktorju

3.3.1.1 Priprava vcepka za bioreaktor

Celice smo odmrznili in prenesli v gojitveno posodico s površino 150 cm². Celicam smo dodali 25 ml svežega gojišča, ki smo ga predhodno ogreli na 37 °C. Inkubacija celic je potekala v CO₂ inkubatorju pri 36,5 °C in 5 % CO₂. Ko so se celice namnožile do koncentracije 8 x 10⁵ celic/ml, smo vsebino gojitvene posodice razdelili v tri gojitvene posodice s površino 175 cm² in v vsako dodali 30 ml gojišča. Ko so celice v gojitvenih posodicah zopet dosegle omenjeno koncentracijo, smo vsebino gojitvenih posodic prenesli v 9 gojitvenih posodic in v vsako dodali 30 ml gojišča. Ko je bila koncentracija celic v gojitvenih posodicah zopet 8 x 10⁵ celic/ml, smo vsebino gojitvenih posodic prenesli v literski spinner in dodali gojišče do 1 litra. Inkubacija celic v spinnerju je prav tako potekala v CO₂ inkubatorju, kjer smo namestili ploščad, ki omogoča mešanje vsebine stekleničke s 50 obrati na minuto. Ko so celice v spinnerju dosegle koncentracijo 1 x 10⁶ celic/ml, je bil vcepek pripravljen za prenos v 6,6 l bioreaktor.

Pred prenosom vcepka smo sterilni bioreaktor napolnili s 4 l gojišča in nastavili ustrezne željene parametre na vrednosti, ki omogočajo optimalne pogoje za rast celic (T=37 °C, pH=7, pO₂=50 % in mešanje= 80 rpm).

3.3.1.2 Spremljanje in vodenje bioprocasa

Celice so nekaj dni rasle v bioreaktorju, brez vklopljene perfuzije. Ko je koncentracija celic narasla na najmanj 1 x 10⁶ celic/ml in je koncentracija glukoze v gojišču padla pod 2 g/l, smo vklopili perfuzijo s pretokom 0,144 volumnov bioreaktorja/dan (V/dan). Recirkulacija skozi spin-filter je bila 50 l/dan. Pretok perfuzije smo povečali za 50 % vsakič, ko je koncentracija glukoze padla pod kritično mejo in so se celice dovolj namnožile. Končni pretok perfuzije je bil največ 4 V/dan in od tu naprej ga nismo več večali. Za spremljanje bioprocasa smo jemali vzorce iz bioreaktorja vsak dan in določali

koncentracijo živih in celokupnih celic z barvanjem s tripanskim modrilom in štetjem s hemocitometrom z mikroskopom, kot tudi odstotek živih, mrtvih in apoptotičnih celic z metodo AV/PI s pretočnim citometrom in odstotek celic v različnih fazah celičnega cikla (G1,S,G2/M) s pretočnim citometrom. Tako kot vedno, pri vsakem bioprocesu, je potekalo tudi vsakodnevno merjenje optične gostote, merjenje koncentracije metabolitov (glukoza, laktat, glutamin in glutamat) in osmolarnosti, da smo lahko zagotovili dobre pogoje za rast, namnoževanje in produktivnost celic z reguliranjem pretoka perfuzije. Spremljanje fizikalnih in kemičnih pogojev v bioreaktorju omogoča poseben regulatorni sistem, ki izvaja meritve temperature in vrednosti pH vsake 4 ure in omogoča avtomatsko regulacijo teh parametrov.

3.3.2 Priprava pozitivne in negativne kontrole za metodi AV/PI in TO/PI.

Pri uvajanju metod AV/PI in TO/PI iz omenjenih komercialnih kitov, smo pripravili tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za dobro negativno kontrolo smo potrebovali čimveč živih celic, za dobro pozitivno kontrolo za metodo AV/PI smo potrebovali čimveč apoptotičnih in mrtvih celic in za dobro pozitivno kontrolo za metodo TO/PI smo potrebovali čimveč mrtvih celic.

Celice smo odmrznili in jih prenesli v dve gojitveni posodici s površino 150 cm². V obe gojitveni posodici smo dodali 25 ml toplega gojišča DMEM-F12/10 % FBS. Sledila je inkubacija celic v CO₂ inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. Celice smo inkubirali 5 dni, tretji dan pa smo jim zamenjali gojišče. Celice se zaradi FBS pritrdijo na podlago gojitvene posodice, tako da smo staro gojišče lahko odpipetirali in v gojitveno posodico dodali 25 ml svežega in toplega gojišča. Peti dan smo celice tripsinizirali, da so se odlepile od podlage gojitvene posodice, in prešteli s svetlobnim mikroskopom (Core techniques, 1998). Tripsiniziranim celicam smo dodali toliko gojišča, da je bila koncentracija celic v vsaki gojitveni posodici 1 x 10⁶ celic/ml. Vsebino gojitvenih posodic smo dobro premešali in po 2 ml celične kulture prenesli v 9 manjših gojitvenih posodic s površino 25 cm². V manjše gojitvene posodice smo dodali še 2 ml svežega gojišča in tako dosegli celično koncentracijo 5 x 10⁵ celic/ml. V tri gojitvene posodice s celicami, ki so služile za

pozitivno kontrolo za metodo AV/PI smo dodali 15 μ l delovne raztopine induktorja apoptoze kamptotecina (Ishaque in Al-Rubeai, 1998). Ostalih 6 gojitvenih posodic s celicami je bilo namenjenih negativni kontroli. Tri gojitvene posodice smo namenili negativni kontroli za metodo AV/PI in tri za negativno kontrolo za metodo TO/PI. Vse gojitvene posodice smo inkubirali še 24 ur v CO₂ inkubatorju. Naslednji dan smo celice ponovno tripsinizirali, prešteli in jim dodali toliko svežega gojišča DMEM-F2 (brez FBS), da je bila koncentracija celic v vseh 9 gojitvenih posodica 5 x 10⁵ celic/ml. Sledila je priprava vzorcev z metodama AV/PI in TO/PI in analiza s pretočnim citometrom.

Pozitivno kontrolo za metodo s TO/PI, kjer smo želeli čimveč mrtvih celic, smo pripravili tako, da smo vzorec iz bioreaktorja z visoko koncentracijo celic (12 x 10⁶ celic/ml) starali teden dni v zaprti, sterilni epruveti. Nato smo vzorec obdelali in obarvali z barvili TO in PI ter opravili analizo s pretočnim citometrom.

3.3.3 Analitske metode

3.3.3.1 Direktno štetje s svetlobnim mikroskopom in določanje celične viabilnosti z barvilom tripan modro

Barvilo tripan modro omogoča ločevanje med živimi in mrtvimi (nekrotičnimi) celicami. Mrtve celice imajo poškodovano membrano in barvilo vdre v mrtvo celico, ki se obarva modro. Žive in tudi apoptotične celice ostanejo neobarvane.

Vzorci s celicami smo mešali s tripanskim barvilom v volumskem razmerju 1:1 (običajno 0,5 ml vzorca in 0,5 ml barvila). Če je bila koncentracija celic v vzorcu prevelika, smo celice najprej ustrezno redčili s pufrom PBS (npr. desetkrat) in nato pripravili mešanico z barvilom. Z obračanjem smo vsebino mikrocentrifugirke nežno premešali in vzorec inkubirali 5 minut. Nato smo obarvan vzorec nanесли na hemocitometer in celice prešteli s svetlobnim mikroskopom. Najprej smo prešteli žive in nato še celokupne celice. Celično koncentracijo in odstotek živih celic (celična viabilnost) smo izračunali po naslednjih enačbah (Freshney, 2000):

Koncentracija živih celic v vzorcu = število prešteti živih celic x 2 x R / 0,0009ml

Koncentracija celokupnih celic v vzorcu = število prešteti celokupnih celic x 2 x R / 0,0009ml

Pri čemer je: 2 je redčitev vzorca zaradi dodanega barvila, 0,0009 volumen tekočine nad števnim kvadratom, R je redčitev vzorca)

Odstotek živih celic = število prešteti živih celic/ število celokupnih celic

3.3.3.2 Metoda za določanje celične viabilnosti z barvili Tiazol oranž (TO) in Propidijev jodid (PI) s pretočnim citometrom

Za določanje deleža živih in mrtvih (nekrotičnih) celic smo uporabili BD Cell viability kit in izvajali test po navodilih proizvajalca.

Za izvedbo testa potrebujemo od 5×10^5 do 1×10^6 celic. Celice iz vzorca smo najprej prešteli s svetlobnim mikroskopom. Nato smo odvzeli ustrezen volumen vzorca, ki je vseboval 2×10^6 celic in ga prenesli v epruvete, ki so namenjene analizi vzorcev s pretočnim citometrom. Epruvete z vzorcem smo centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300g, t = 5min) in odlili supernatant. Celice smo resuspendirali v 4 ml pufra PBS in ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Nato smo celice resuspendirali v 2 ml pufra PBS, 0,2 % Pluronic F68, 1mM EDTA in dodali 4 μ l TO in 2 μ l PI, dobro premešali in 5 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Sledila je analiza vzorca s pretočnim citometrom. Izvor svetlobe je bil argonski laser, ki obratuje pri 488 nm. Uporabili smo naslednje detektorje: FSC, SSC, FL1 in FL3. (BD Cell Viability Kit, 2002).

3.3.3.3 Metoda s fluorescentno označenim proteinom Aneksin V (AV) in barvilom Propidijev jodod (PI) za določanje deleža apoptotičnih celic s pretočnim citometrom

To smo določevali z Vybrant™ Apoptosis Assay kitom #2 in izvajali test po navodilih proizvajalca.

Za analizo potrebujemo približno 2×10^6 celic. Celice smo najprej prešteli s svetlobnim mikroskopom, odpipetirali primeren volumen vzorca in centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300g, t = 5min). Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 4 ml pufra PBS. Vzorec smo ponovno centrifugirali, odstranili supernatant in celicam dodali 1 ml 1 x ABB pufra. Vzorec smo dobro premešali in odpipetirali 100 μ L vzorca in mu dodali 5 μ L AV in 1 μ L PI. Sledila je 15 minutna inkubacija v temi pri sobni temperaturi in nato analiza s pretočnim citometrom z argonskim laserjem pri 488 nm in detektorji, SSC, FL1 in FL3 (Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #2, 2001).

3.3.3.4 Metoda TUNEL za določanje deleža apoptotičnih celic s pretočnim citometrom

Za merjenje fragmentirane DNK smo uporabili APO-BRDU™ KIT in izvajali test po navodilih proizvajalca. V kitu sta že pripravljene pozitivna in negativna kontrola. Za analizo smo potrebovali približno 2×10^6 celic. Celice smo prešteli s svetlobnim mikroskopom in odpipetirali potrebni volumen vzorca. Vzorec smo najprej centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300g, t = 5min) in odlili supernatant. Celice smo resuspendirali v 1 ml 1 % (v/v) paraformaldehidu in epruveto prenesli na led za 60 min. Rezultati kasnejše analize so pokazali, da je ta čas inkubacije prekratek. Ugotovili smo, da je potrebno celice fiksirati v paraformaldehidu čez noč pri 4 °C. Po fiksaciji celic smo vzorec centrifugirali, odlili supernatant in celice dvakrat sprali v 4 ml pufra PBS. Po zadnjem centrifugiranju smo odlili pufer PBS in celicam ob mešanju na vibracijskem mešalu po kapljicah dodajali 2 ml ledeno mrzlega 70 % etanola. Vzorce smo najmanj 30 minut inkubirali na ledu. Nato smo 1 ml pozitivne, 1 ml negativne kontrole in fiksiran vzorec centrifugirali in vsakega posebej dvakrat sprali s pufrom za spiranje A. Po zadnjem centrifugiranju smo odlili supernatant in celice resuspendirali v 50 μ l DNK vezavne

raztopine (vsebuje TdT encim in Br-dUTP nukleotide) in 60 minut inkubirali v vodni kopeli, ki smo jo predhodno ogreli na 37 °C. Nato smo celice dvakrat sprali z 1 ml pufra za spiranje B in odlili supernatant. V vzorce smo dodali 0,1 ml raztopine z označenimi protitelesi in jih 30 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Nato smo vzorcem dodali še 0,5 ml PI/RNAza vezavnega pufra in sledila je ponovna 30 minutna inkubacija v temi pri sobni temperaturi. Tako pripravljene vzorce so bili narejeni za analizo s pretočnim citometrom, ki je potekala z argonskim laserjem pri 488 nm in detektorji: FSC, SSC, FL1 in FL3 (Apo-BrdUTM Kit, 2005).

3.3.3.5 Določanje deleža celic v posameznih fazah celičnega cikla s pretočnim citometrom

Za analizo celičnega cikla potrebujemo približno 2×10^6 celic. Celice smo najprej prešteli in odpipetirali ustrezen volumen vzorca. Vzorec smo centrifugirali (pogoji centrifugiranja: rcf = 300g, t = 5min) in odstranili supernatant. Celice smo dvakrat sprali v 4 ml pufra PBS. Po zadnjem centrifugiranju smo odstranili supernatant. Celice smo resuspendirali v 1 ml pufra 0,1M TRIS/HCl, 0,1 % TRITON X-100, 2mM MgCl₂ in vzorcem dodali 20 µl encima RNAze in 10 µl PI. Vzorec smo dobro premešali in 20 minut inkubirali v temi pri sobni temperaturi. Sledila je analiza s pretočnim citometrom z argonskim laserjem pri 488 nm in detektorji: FSC, SSC in FL3.

4 REZULTATI

Praktični del diplomskega dela je bil razdeljen in izveden v dveh delih. V prvem delu smo želeli ugotoviti oziroma izbrati metode pretočne citometrije, ki bi lahko bile primerne za spremljanje bioprocsov. V drugem delu smo z izbranimi metodami spremljali bioproces. Vsi bioprocеси so potekali v 6,6 l laboratorijskem bioreaktorju s 5 l delovnim volumnom pri temperaturi 37 °C, pH 7, $pO_2=50\%$ in mešanju 80 obratov mešala na minuto.

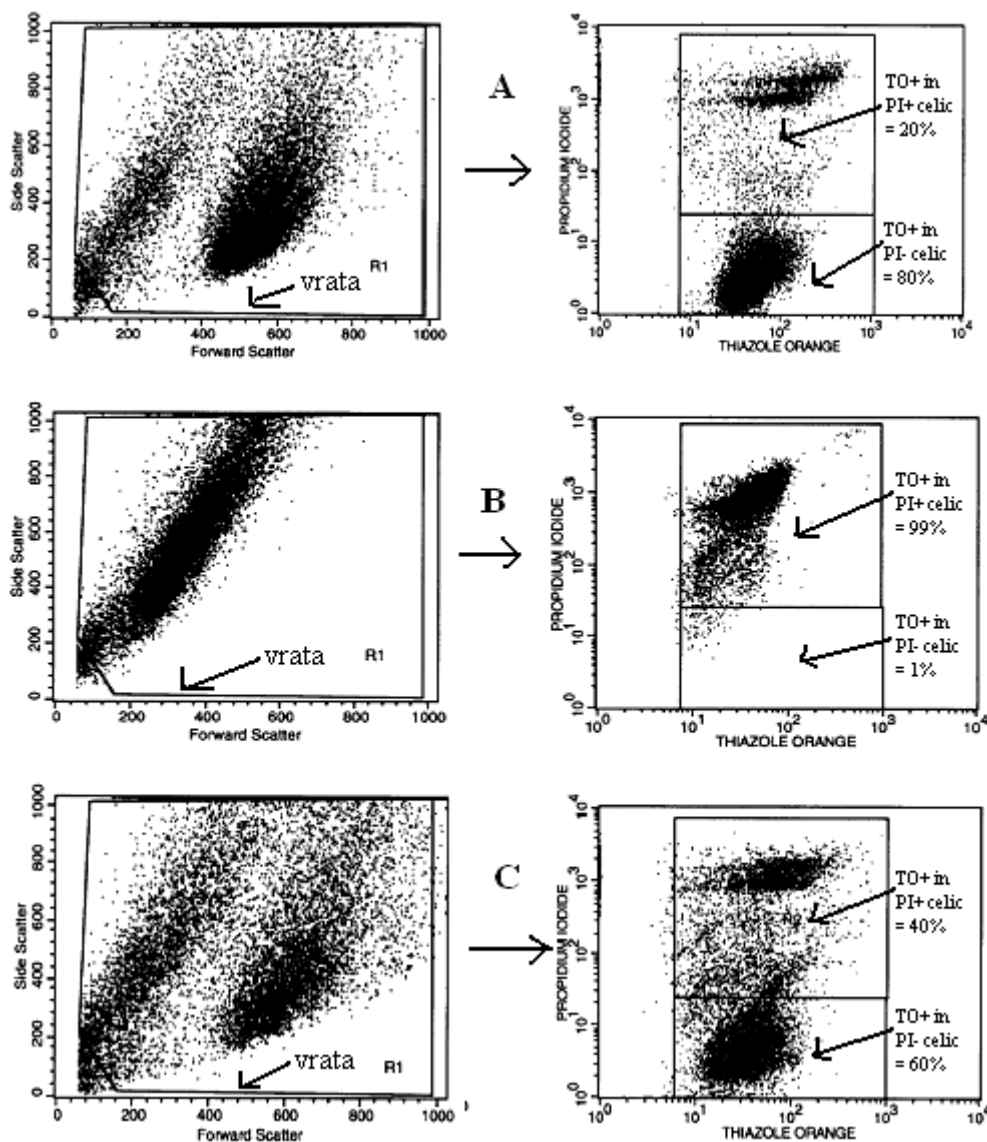
Za prvi del diplomskega dela smo odvezemali vzorce iz bioreaktorja več dni, vendar ne vsak dan, vsi vzorci so bili odvzeti iz istega bioprocеса. Odvzeli smo tudi dva vzorca iz spin-filtra in v teh vzorcih določili delež apoptoze. V drugem delu diplomskega dela je potekalo spremljanje bioprocеса. Prvi bioproces smo spremljali od samega začetka in do njegovega konca. Drugi bioproces pa smo začeli spremljati 15. dan in ga spremljali do njegovega konca. Iz obeh bioreaktorjev smo odvezemali vzorce vsak dan. V vseh vzorcih smo prešteli celice in določili celično viabilnost s svetlobnim mikroskopom in barvilom tripan modro in analizirali celične karakteristike (delež apoptotičnih celic, celično viabilnost, delež celic v posameznih fazah celičnega cikla) z izbranimi metodami pretočne citometrije.

4.1 IZBIRA NAJUSTREZNEJŠIH METOD PRETOČNE CITOMETRIJE

4.1.1 Prikaz nekaterih značilnih točkovnih diagramov in/ali histogramov, ki smo jih dobili z različnimi metodami pretočne citometrije

Vse teste, kjer smo uporabljali komercialne kite, smo izvajali po navodilih proizvajalcev. Rezultati testov so točkovni diagrami, ki jih izriše računalniški program na podlagi meritev s pretočnim citometrom. S točkovnimi diagrami in/ali histogrami je v tej nalogi prikazanih nekaj posameznih primerov. S točkovnim diagramom smo prikazali pozitivne in negativne kontrole metod AV/PI, TO/PI in TUNEL. Prikazali smo tudi po en primer rezultatov dobljenih na celičnih vzorcih iz bioreaktorja z različnimi metodami pretočne citometrije. Vse ostale rezultate smo uredili v tabele in izrisali ustrezne grafikone.

4.1.1.1 Točkovni diagrami za metodo TO/PI

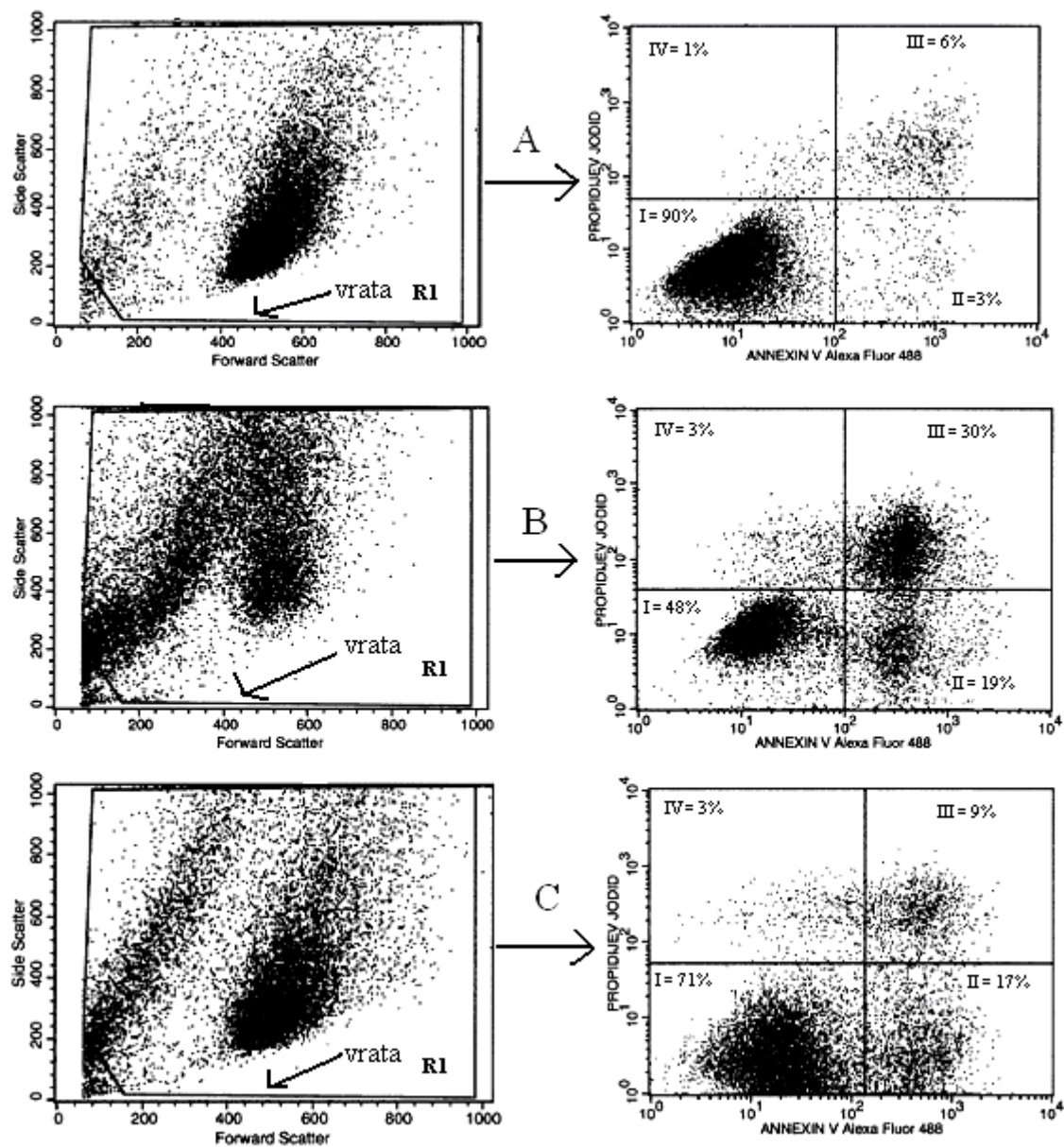


Slika 5: Točkovni diagrami negativne (A) in pozitivne (B) kontrole in celičnega vzorca iz bioreaktorja (C), ki smo jih dobili z metodo TO/PI z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.

Levo so na sliki prikazani točkovni diagrami, ki prikazujejo podatke dobljene s FSC in SSC detektorjema. Diagram FSC/SSC nam omogoča razločevanje med celicami različnih velikosti in granularnosti. Ti diagrami so pomembni, ker na njih lahko ustvarimo regijo (R1) in tako izberemo dogodke (celice), ki jih želimo v nadaljni analizi. Z uporabo izbrane regije (R1) kot vrata analize, smo iz nadaljne analize želeli odstraniti celični debri, ki se

nahaja se v levem spodnjem kotu diagrama. Jasna meja med celičnim debrijem in celicami, na naših diagramih, na žalost ni bila dobro vidna. Napako zaradi tega smo poskušali zmanjšati na ta način, da smo vrata pri vsaki analizi postavili na isto mesto. Na diagramih FSC/SSC sta vidni tudi dve različni celični populaciji. Pokazalo se je, da levi »oblak« dogodkov (celic) v grobem predstavlja mrtve celice, desni »oblak« dogodkov v grobem predstavlja žive celice. Žive in mrtve celice se razlikujejo po velikosti in granularnosti, kar lahko zaznamo na FSC/SSC diagramu in grobe informacije o celični viabilnosti lahko dobimo tudi na FSC/SSC diagramih. Ko smo z računalniškim programom CELL Quest določili vrata analize, smo izrisali diagrame Tiazol oranž/Propidijev Jodid (prikazani so desno na sliki), ki prikazujejo podatke dobljene z detektorjema FL1 in FL3 (fluorescentni detektorji). Ta točkovni diagram nam je dal podrobnejše informacije o celični viabilnosti v vzorcih. Na diagramih Tiazol oranž/Propidijev jodid sta prav tako vidni dve celični populaciji. Celice, ki so TO in PI + so mrtve celice. Celice, ki so TO+ in PI- so žive celice. Izračun deleža živih in mrtvih celic je opravil računalniški program CELL Quest. S točkovnega diagrama (TO/PI) negativne kontrole (A) je razvidno, da so bile v vzorcu prevladovale žive celice. S točkovnega diagrama (TO/PI) pozitivne kontrole (B) je razvidno, da so v vzorcu prevladovale mrtve celice. Delež živih celic na točkovnem diagramu (TO/PI) celičnega vzorca iz bioreaktorja (C) pa se je nahajal nekje vmes med pozitivno in negativno kontrolo.

4.1.1.2 Točkovni diagrami za metodo AV/PI

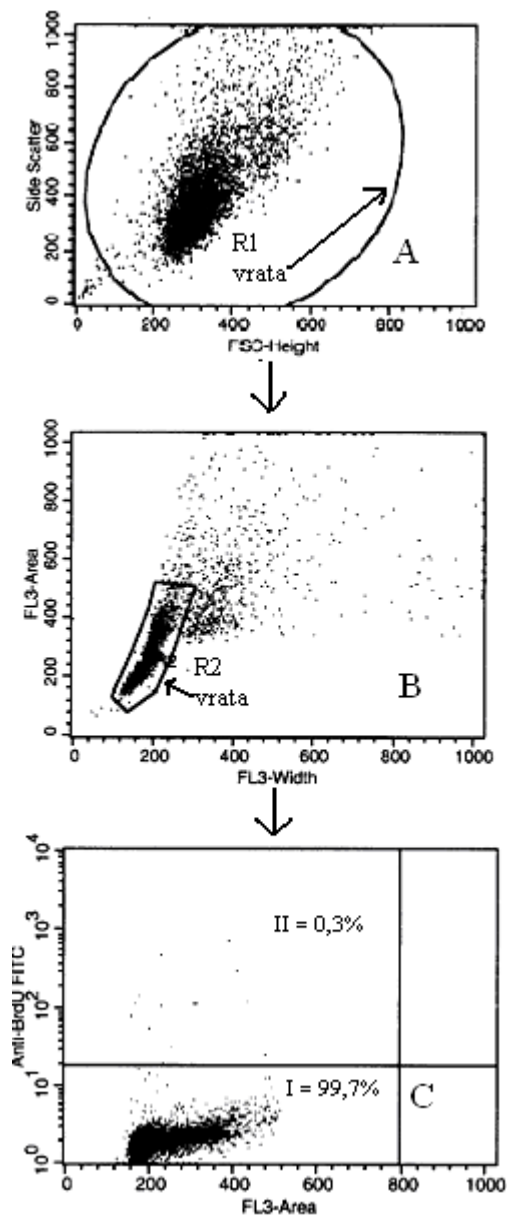


Slika 6: Točkovni diagrami negativne (A) in pozitivne (B) kontrole in celičnega vzorca iz bioreaktorja (C), ki smo jih dobili z metodo AV/PI z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.

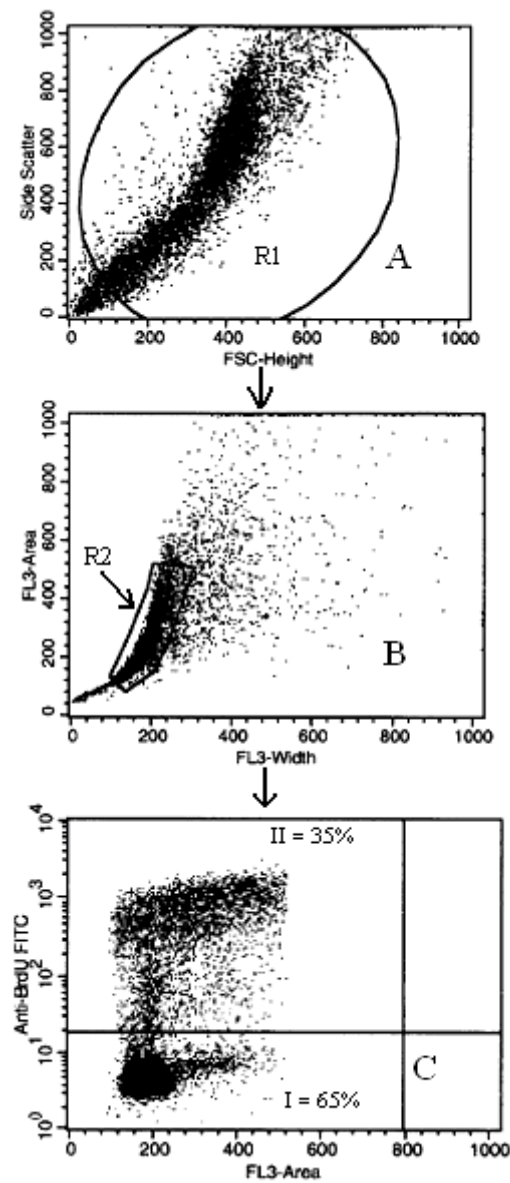
Levo so na sliki prikazani točkovni diagrami, ki prikazujejo podatke dobljene s FSC in SSC detektorjema. Na diagramu smo s postavitvijo vrat (R1) zopet želeli izločiti celični debri in izbrati celice, ki smo jih želeli prikazati na desnih diagramih. Na teh diagramih sta v grobem vidni tudi populaciji mrtvih (levo) in živih (desno) celic. Ko smo z računalniškim programom CELL Quest določili vrata analize, smo izrisali diagrame

Aneksin V/Propidijev jodid (na sliki so prikazano desno), ki prikazuje podatke dobljene z detektorjema FL1 in FL3 (fluorescentni detektorji). Iz njih smo razbrali podatke o deležu živih, apoptotičnih in mrtvih celic v vzorcu. Izračun deležev živih, apoptotičnih in mrtvih celic je opravil računalniški program CELL Quest. Točkovne diagrame Aneksin V/Propidijev jodid smo razdelili na štiri kvadrante. V kvadrantu I so AV in PI negativne celice, ki predstavljajo žive celice. V kvadrantu II so AV pozitivne in PI negativne celice, ki predstavljajo apoptotične celice. Kvadrant III zajema AV in PI pozitivne celice, ki so mrtve celice. V kvadrantu IV so AV negativne in PI pozitivne celice in so tudi mrtve celice. Kot celokupne mrtve celice smo upoštevali vsoto deležev celic iz kvadratov III in IV. S točkovnega diagrama negativne kontrole (A) je razvidno, da so v vzorcu prevladovale žive celice. S točkovnega diagrama pozitivne kontrole (B), kjer smo inducirali apoptozo je razvidno, da se je delež živih celic zmanjšal, povečal pa se je delež apoptotičnih in mrtvih celic. Delež živih celic na točkovnem diagramu celičnega vzorca iz bioreaktorja (C) pa se je nahajal nekje vmes med pozitivno in negativno kontrolo: delež apoptotičnih in mrtvih celic je bil v celičnem vzorcu iz bioreaktorja večji kot pri negativni kontroli in manjši kot pri pozitivni kontroli.

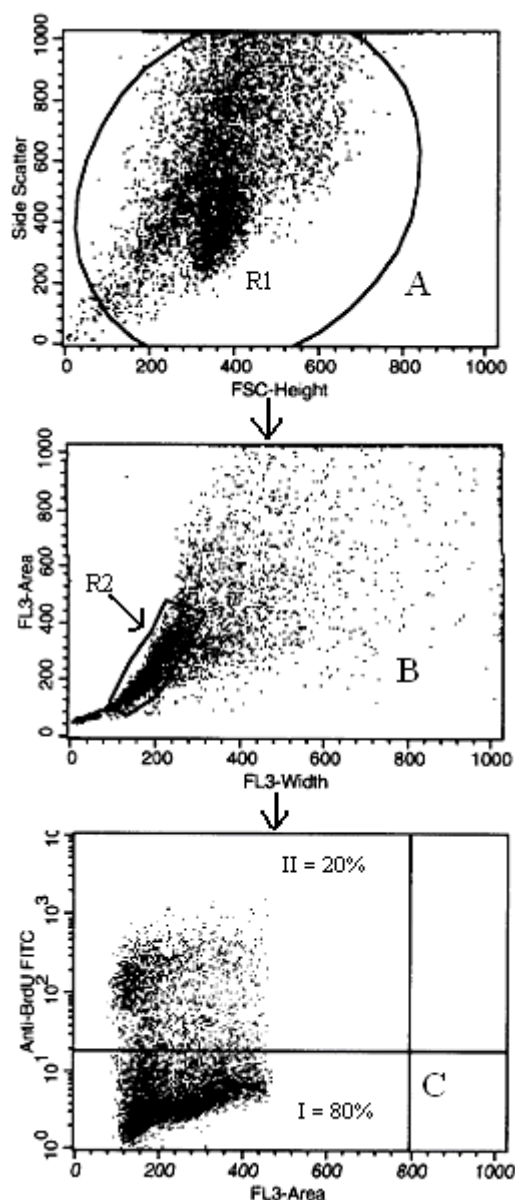
4.1.1.3 Točkovni diagrami za metodo TUNEL



Slika 7: Točkovni diagrami negativne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.



Slika 8: Točkovni diagrami pozitivne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.

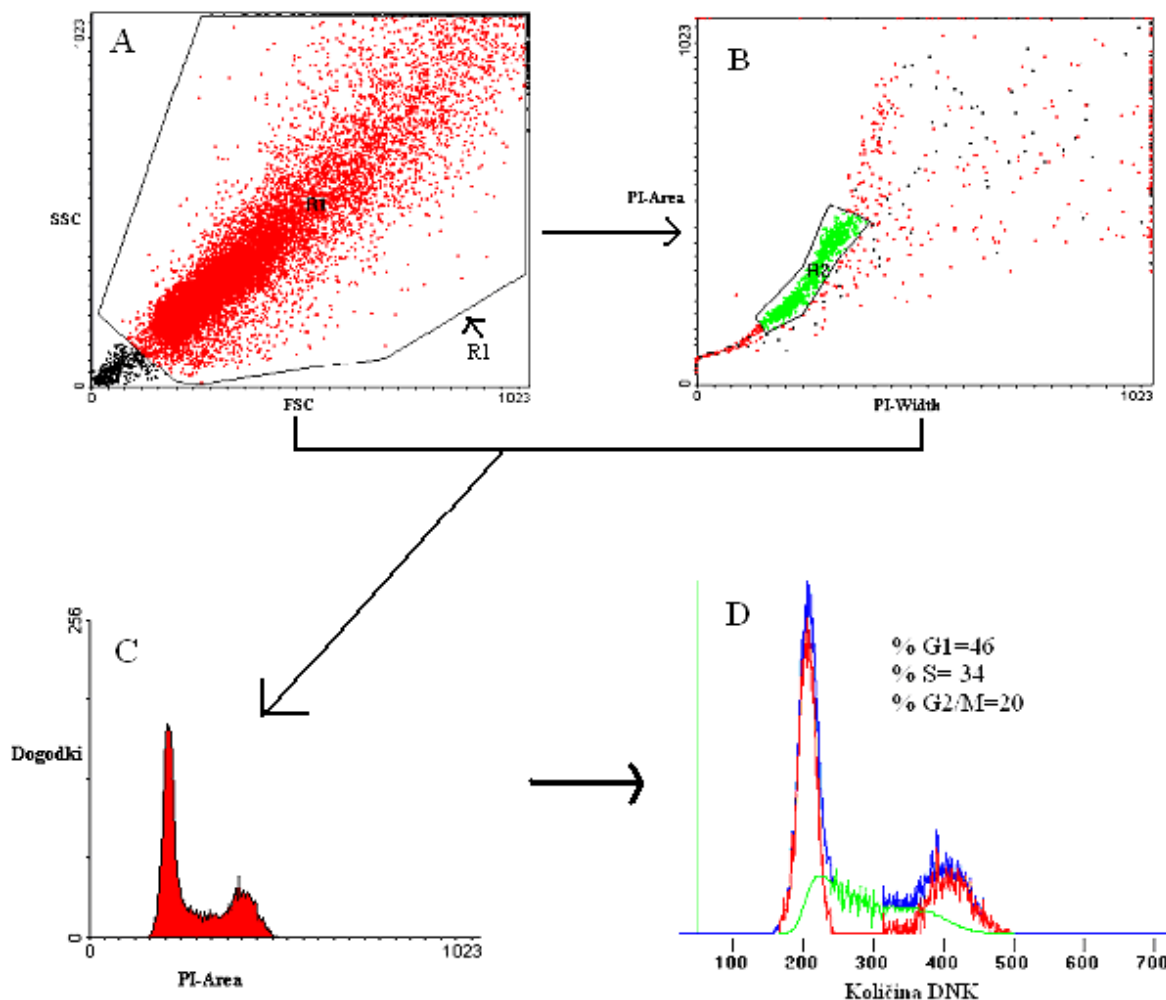


Slika 9: Točkovni diagrami pozitivne kontrole dobljeni z metodo TUNEL z različnimi detektorji s pretočnim citometrom.

Na slikah 7, 8 in 9 so prikazani točkovni diagrami negativne, pozitivne kontrole in celičnega vzorca iz bioreaktorja, ki smo jih dobili z metodo TUNEL. Točkovni diagrami označeni s črko A so FSC/SSC diagrami. S postavitvijo vrat (R1) smo iz analize izločili celični debris. Diagrami označeni s črko B (FL3 Width/ FL3 Area) nam omogočijo postavitev vrat (R2), ki iz analize izločijo celične skupke in tudi celični debris. Za izris diagramov označenih s črko C smo uporabili vrata, ki so kombinacija vrat (R1+R2). Na točkovnih diagramih označenih s črko C, sta pomembna dva kvadranta. V kvadrantu I se

nahajajo PI pozitivne in Anti-BrdU negativne celice, ki predstavljajo neapoptotične celice. V kvadrantu II se nahajajo PI in Anti-BrdU pozitivne celice, ki predstavljajo celice, ki so v pozni apoptozi (imajo fragmentirano DNK). Odstotke neapoptotičnih in apoptotičnih celic smo dobili z računalniškim programom CELL Quest. S točkovnega diagrama negativne kontrole (slika 7, točkovni diagram C) je razvidno, da so bile v vzorcu prevladovale žive celice. S točkovnega diagrama pozitivne kontrole (slika 8, točkovni diagram C), kjer je bila apoptoza inducirana, je razvidno, da se je delež neapoptotičnih celic zmanjšal, povečal pa se je delež apoptotičnih celic. Delež neapoptotičnih in apoptotičnih celic na točkovnem diagramu celičnega vzorca iz bioreaktorja (slika 9, točkovni diagram C) se je nahajal med pozitivno in negativno kontrolo.

4.1.1.4 Točkovna diagrama in histograma za analizo celičnega cikla



Slika 10: Prikaz točkovnih diagramov in histogramov dobljenih z analizo celičnega cikla s pretočnim citometrom.

Na točkovnem diagramu označenem s črko A so prikazani podatki FSC/SSC detektorjev. Z oznako R1 so označena vrata (zanimale se nas celice znotraj vrat). Na diagramu B (PI-Width/PI-area) smo postavili še ena vrata (R2), da bi iz nadaljne obdelave izločili celične skupke in tudi celični debri. Za izris histograma C smo uporabili kombinirana vrata analize (R1+R2). Točkovna diagrama A, B in histogram C smo narisali in obdelali s pomočjo računalniškega programa WinMDI Version 2.5. Histogram C prikazuje razporeditve celic v različnih fazah celičnega cikla. Prvi stolpec na histogramu predstavlja celice v G1 fazi,

drugi (nižji) stolpec predstavlja celice, ki so v G2/M fazi in del med stolpcema prikazuje celice v S fazi celičnega cikla. Podatke tega histograma smo prenesli v računalniški program Cylthead, ki je podatke matematično obdelal in podal deleže celic v različnih fazah celičnega cikla, ki so prikazani na histogramu označenemu s črko D. Iz slednjega je razvidno, da je bilo v izmerjenem vzorcu največ celic (46 %) v G1 fazi, v S fazi je bilo 34 % celic in najmanj celic (20 %) je bilo v G2/M fazi celičnega cikla.

4.1.2 Določanje deleža apoptotičnih celic z metodama pretočne citometrije

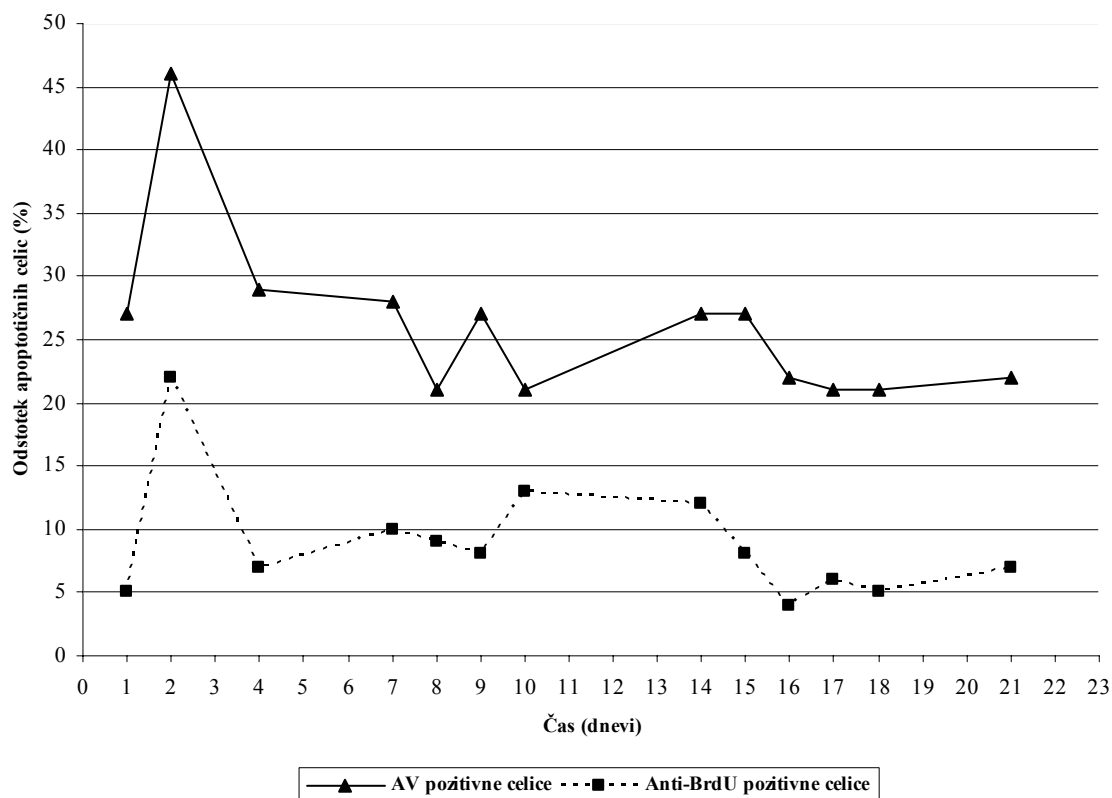
Delež apoptotičnih celic v celičnih vzorcih smo določali z dvema metodama pretočne citometrije: AV/PI in TUNEL. Rezultate smo dobili iz točkovnih diagramov, katere smo dobili z meritvami s pretočnim citometrom in obdelavo z računalniškim programom CELL Quest. Rezultati smo uredili in prikazali v preglednicah in grafično.

4.1.2.1 Določanje deleža apoptotičnih celic iz bioreaktorja

Rezultati v spodnji preglednici so dobljeni z metodama AV/PI in TUNEL s pretočnim citometrom. Vsi vzorci, katerih rezultati so prikazani so bili odvzeti iz istega bioprocesa.

Pregl. 1: Rezultati dobljeni s pretočno citometrijo z metodama AV / PI in TUNEL

Čas (dnevi)	Metoda AV/PI (Vybrant™ Apoptosis Assay kit)			Metoda TUNEL (Apo-BrdU™ kit)	
	Žive celice [AV-, PI -] (%)	Apoptotične celice [AV+, PI -] (%)	Mrtve celice [AV+, PI+ in AV -, PI+] (%)	Neapoptotične celice [Anti-BrdU -] (%)	Apoptotične celice [Anti-BrdU +] (%)
1	47	27	26	95	5
2	35	46	19	78	22
4	49	29	22	93	7
7	45	28	27	90	10
8	51	21	28	91	9
9	55	27	18	92	8
10	50	21	29	87	13
14	57	27	16	88	12
15	52	27	21	92	8
16	52	22	26	96	4
17	62	21	17	94	6
18	54	21	25	95	5
21	52	22	26	93	7



Slika 11: Prikaz deleža apoptotičnih celic izmerjenega z metodama AV/PI in TUNEL.

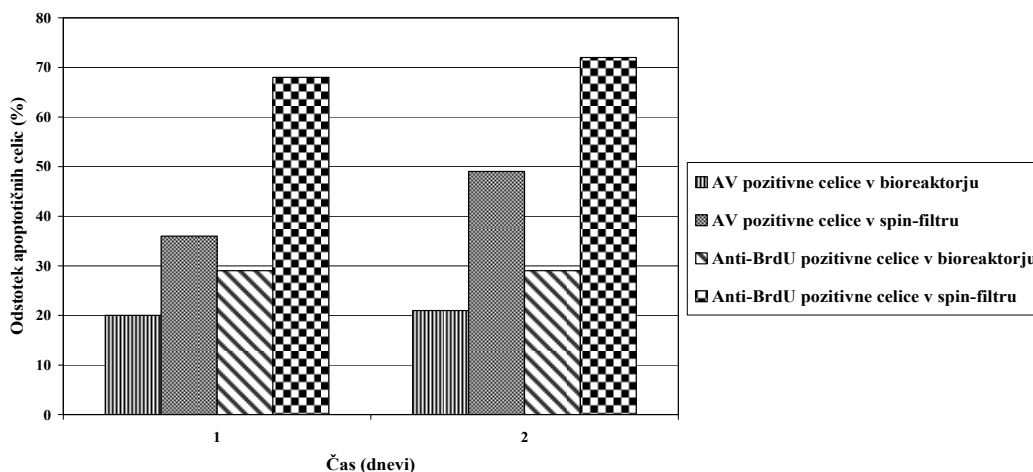
Z metodo AV/PI smo dobili višje deleže apoptotičnih celic kot z metodo TUNEL. Deleži apoptotičnih celic izmerjeni z metodo TUNEL so bili pri istih vzorcih precej nižji. Rezultati obeh metod večinoma po trendu ujemajo (delež apoptotičnih celic istočasno narašča oziroma pada pri obeh metodah), vendar ne ob vseh dnevih vzorčenja. Predvsem je zanimiv 2. dan vzorčenja, ko je delež apoptotičnih celic močno narasel. Ta dan je v bioreaktorju prišlo do zamašitve spin-filtra in z obema metodama smo uspešno zaznali porast v deležu apoptotičnih celic. 3. dan vzorčenja smo zamenjali spin-filter in delež apoptotičnih celic izmerjen z obema metodama je močno padel.

4.1.2.2 Določanje deleža apoptotičnih celic v spin-filtru

Rezultati v spodnji preglednici in histogramu so dobljeni z metodama AV/PI in TUNEL s pretočnim citometrom. Dva dni zapored smo odvzeli celični vzorec iz spin-filtra in za primerjavo tudi iz bioreaktorja.

Pregl. 2: Delež apoptotičnih celic v bioreaktorju in spin-filtru izmerjen z metodama AV/PI in TUNEL

	Vzorec odvzet iz bioreaktorja	Vzorec odvzet iz spin-filtra	Vzorec odvzet iz bioreaktorja	Vzorec odvzet iz spin-filtra
	Metoda AV/PI (Vybrant™ Apoptosis Assay kit)		Metoda TUNEL (Apo-BrdU™ kit)	
Čas (dnevi)	Apoptotične celice [AV + in PI -] (%)		Apoptotične celice [Anti-BrdU +] (%)	
1	20	36	29	68
2	21	49	29	72



Slika 12: Delež apoptotičnih celic v bioreaktorju in spin-filtru izmerjenega z metodama AV/PI in TUNEL.

V vzorcih odvzetih iz bioreaktorja smo z obema metodama izmerili nižji delež apoptotičnih celic kot v vzorcih odvzetih iz spin-filtra. S tem smo dokazali, da se apoptotične celice odstranjujejo iz bioreaktorja skozi spin-filter. Delež Anti-BrdU pozitivnih celic (pozno apoptotične celice) je bil v spin-filtru in bioreaktorju višji od AV pozitivnih celic (zgodnje apoptotične celice).

4.1.3 Določanje celične viabilnosti z metodama pretočne citometrije in direktnim štejetjem s svetlobnim mikroskopom

Celično viabilnost smo določali z metodama TO/PI in AV/PI s pretočnim citometrom. Rezultate smo dobili iz točkovnih diagramov, ki smo jih dobili z meritvami s pretočnim citometrom in obdelavo z računalniškim programom CELL Quest. Celično viabilnost smo določali tudi s svetlobnim mikroskopom z uporabo tripanskega modrila. Rezultate smo uredili in prikazali v preglednicah in grafično. Vsi vzorci, katerih rezultati so prikazani v spodnji preglednici so bili odvzeti iz istega bioprocesa.

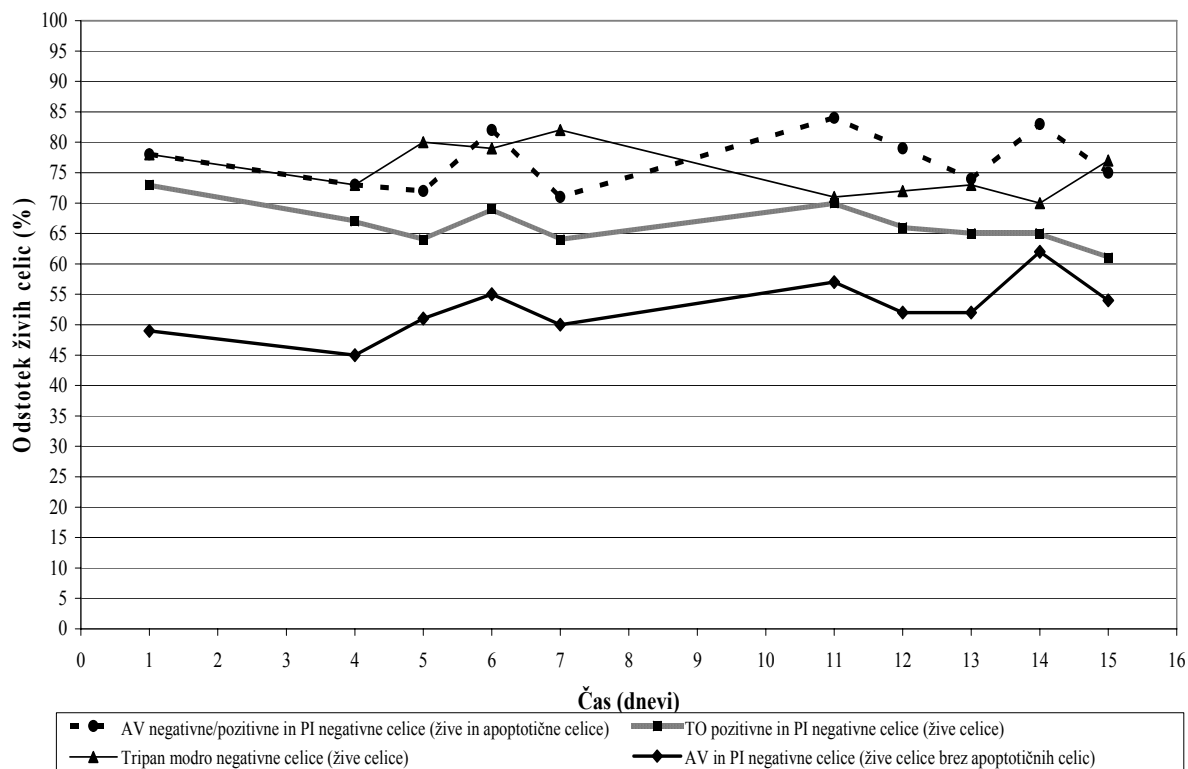
Pregl. 3: Rezultati deleža živih celic (celične viabilnosti) dobljenih s pretočno citometrijo z metodama AV/PI, TO/PI in direktnim štejetjem s svetlobnim mikroskopom

Čas (dnevi)	Metoda AV/PI (Vybrant™ Apoptosis Assay kit)				Metoda TO/PI (BD Cell Viability kit)		Direktno štejetje (Tripan modro)
	Žive celice ¹ (%)	Mrtve celice ² (%)	Apoptotične celice ³ (%)	Vsota živih in apoptotičnih celic (%)	Žive celice ⁴ (%)	Mrtve celice ⁵ (%)	Žive celice ⁶ (%)
1	49	22	29	78	73	27	78
4	45	27	28	73	67	33	73
5	51	28	21	72	64	36	80
6	55	18	27	82	69	31	79
7	50	29	21	71	64	36	82
11	57	16	27	84	70	30	71
12	52	21	27	79	66	34	72
13	52	26	22	74	65	35	73
14	62	17	21	83	65	35	70
15	54	25	21	75	61	39	77

¹Žive celice so AV- in PI-. ²Mrtve celice so AV+, PI+ in AV-, PI+. ³Apoptotične celice so AV+ in PI-.

⁴Žive celice so TO+ in PI-. ⁵Mrtve celice so TO+ in PI+.

⁶Žive celice so tripan modro-.



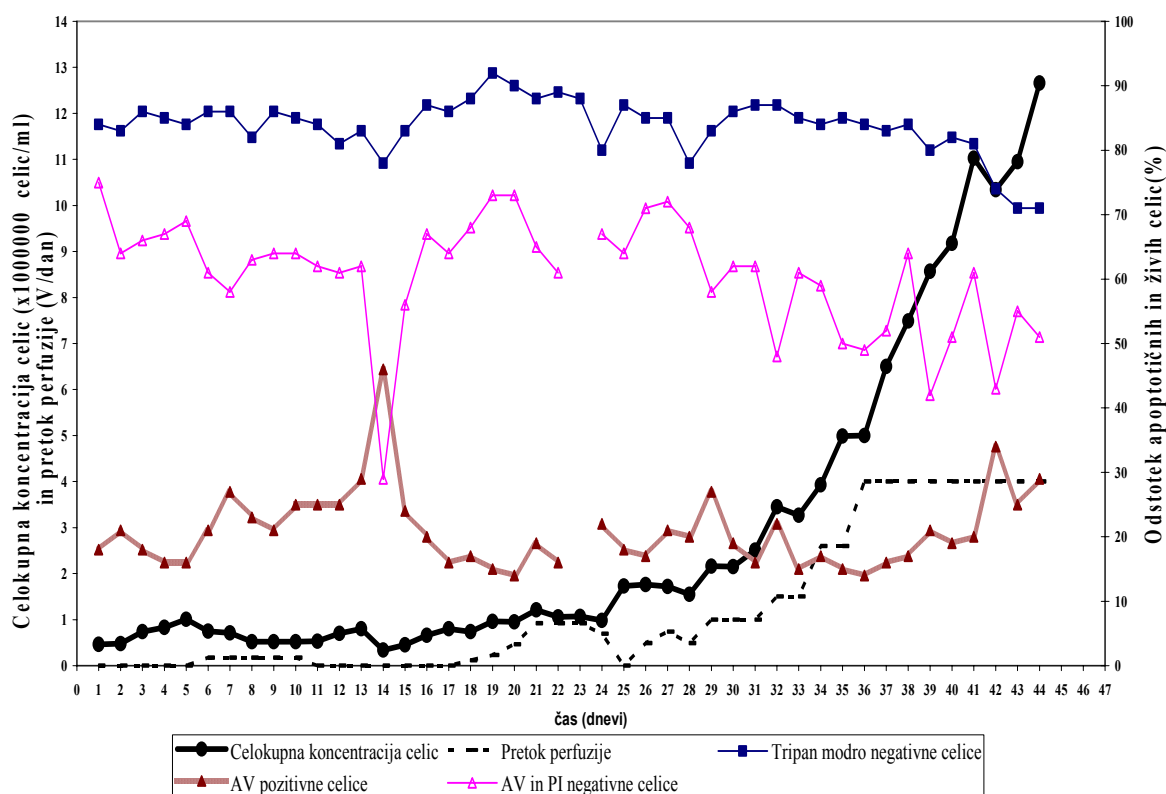
Slika 13: Delež živih celic izmerjen z dvema metodama pretočne citometrije in s svetlobnim mikroskopom.

Obe metodi pretočne citometrije (TO/PI in AV/PI) sta večinoma pokazali na podobne trende v celični viabilnosti (delež živih celic istočasno narašča oziroma pada). Z metodo TO/PI smo izmerili nekoliko nižji delež živih celic kot z metodo AV/PI. Pri metodi AV/PI sta na sliki 13 prikazani dve krivulji. Ena krivulja prikazuje vsoto živih in apoptotičnih celic in smo jo narisali zato, da nam je omogočila primerjavo celične viabilnosti z metodo TO/PI in direktnim štetjem, ker s slednjima dvema metodama ne moremo razlikovati med apoptotičnimi in živimi celicami. Apoptotične celice ti dve metodi prepoznata kot žive. Druga krivulja pa prikazuje dejansko žive celice (brez apoptotičnih), ki smo jih izmerili z metodo AV/PI. Deleži živih celic, ki smo jih dobili s svetlobnim mikroskopom in barvilom tripan modro so večinoma ravni obratni, kot deleži živih celic, ki smo jih izmerili z metodami pretočne citometrije. To se je pokazalo skoraj ob vseh dnevih vzorčenja, razen od prvega do tretjega dne, ko je celična viabilnost izmerjena z vsemi tremi metodami padla.

Za najboljšo in najuporabnejšo metodo pretočne citometrije, za spremljanje deleža apoptotičnih in živih celic, se je izkazala metoda AV/PI, zato smo jo uporabili v nadaljevanju za spremljanje bioprocsov. Za spremljanje bioprocsov s pretočnim citometrom smo uporabili tudi metodo za analizo celičnega cikla s PI, ki je predhodno nismo posebej testirali. Poleg metod pretočne citometrije smo za merjenje celične viabilnosti uporabili tudi direktno štetje s svetlobnim mikroskopom in uporabo barvila tripan modro.

4.2 SPREMLJANJE BIOPROCESA Z IZBRANIMI METODAMI

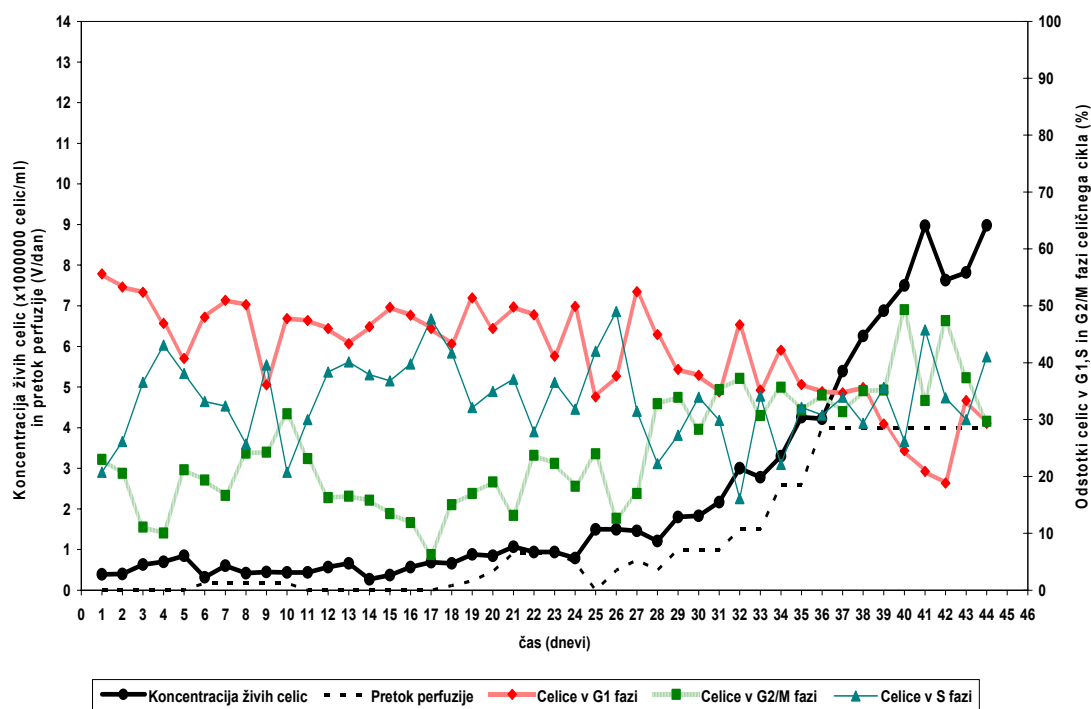
Z izbranimi metodami pretočne citometrije (metoda AV/PI in metoda za analizo celičnega cikla) in svetlobnim mikroskopom smo spremljali dva bioprocesa. Prvi bioprocес smo spremljali od začetka do konca, drugi bioprocес pa smo začeli spremljati 15. dan in ga spremljali do njegovega konca. Iz obeh bioreaktorjev obeh bioprocesov smo odvzemali in analizirali vzorce vsak dan. Rezultate meritev smo uredili v grafe in tabele. Tabele so prikazane v prilogah.



Slika 14: Spremljanje karakteristik celic CHO v prvem bioprocесu.

Celična koncentracija prvega bioprocesa v 24 dnevih bioprocesa ni presegla 2×10^6 celic/ml. Celice so se te dni slabo rastle. Po 24. dnevu pa se je celična rast izboljšala in celice so 44. dan bioprocesa dosegle koncentracijo $12,7 \times 10^6$ celic/ml. Celična viabilnost, ki smo jo določili s pomočjo svetlobnega mikroskopa in barvila tripan modro, je bila prvih 13 dni bioprocesa dokaj konstanta in se je nahajala med 81 in 86 %. 14. dan je celična

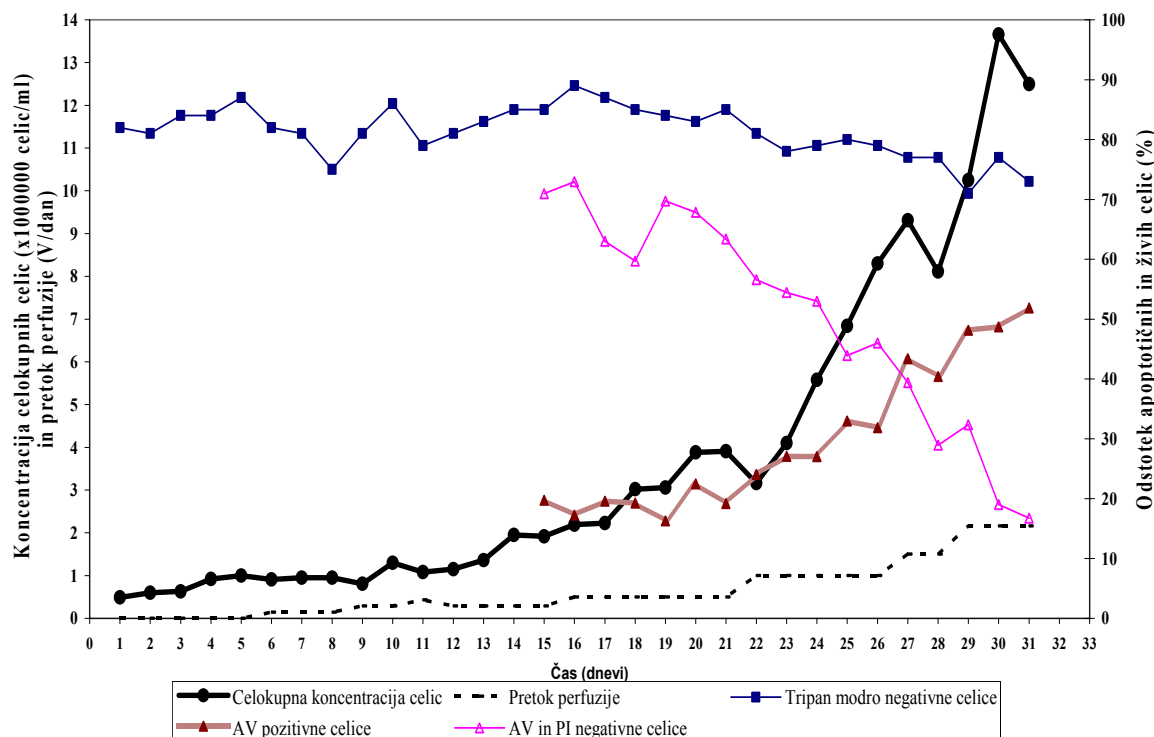
viabilnost padla na 78 %, nato pa se je do 23. dneva odstotek živih celic povečeval in včasih celo presegel 90 %. Celična viabilnost je 24. in 28. dan zopet padla, nato pa se je do 41. dneva nahajala med 81 in 87 %. 41. dan je odstotek živih celic padel pod 75 % in se ni več povišal do ustavitve bioprocesa. Odstotek živih celic (določen z metodo AV/PI) je od 1. do 13. dneva bioprocesa padel iz 75 na 62 %, odstotek apoptotičnih celic je istočasno narasel iz 18 na 29 %. 14. dan bioprocesa se je celična viabilnost močno padla (iz 62 na 29 %), prišlo pa je do velikega porasta apoptotičnih celic (iz 29 % na 46 %). Že 15. dan bioprocesa se je stanje celic v bioreaktorju močno izboljšalo. Odstotek apoptotičnih celic je padel na 24 %, celična viabilnost določena z metodo AV/PI je narasla na 56 %. Do 20. dneva je odstotek apoptotičnih celic padel na 14 %, celična viabilnost določena z metodo AV/PI se je povečala na 73 %. V bioprocusu je bilo 19. in 20. dan najboljše stanje celic v bioreaktorju (visoka celična viabilnost določena z obema metodama in nizek odstotek apoptoze). Od 21. dneva naprej se je odstotek apoptotičnih celic nahajal med 15 in 27 %, 42. dan je delež odstotek apoptotičnih celic dosegel 34 %, zadnji dan bioprocesa pa je bilo v bioreaktorju 29 % apoptotičnih celic. Celična viabilnost določena z metodo AV/PI je od 21. dneva bioprocesa izmenično padala in naraščala, zadnji dan bioprocesa pa je bilo v bioreaktorju 51 % živih celic (slika 14 in priloga A).



Slika 15: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla v prvem bioprocesu.

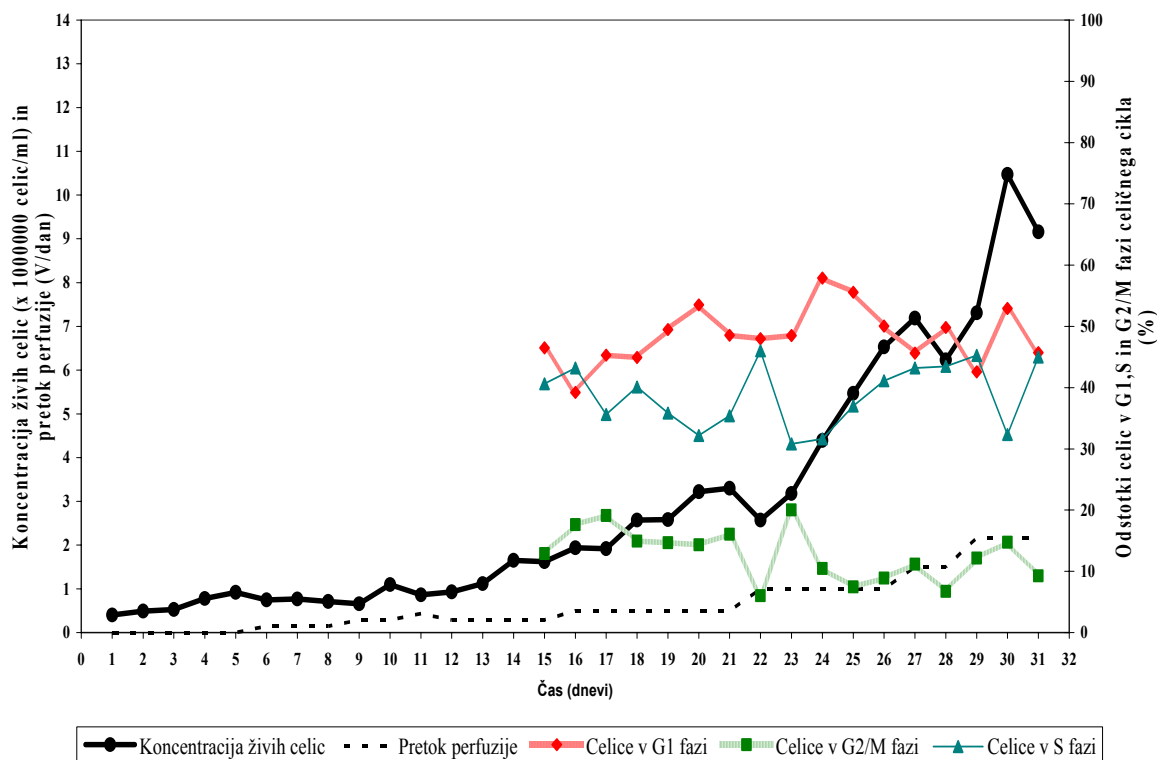
Po inokulaciji celic v prvi bioreaktor je S faza celičnega cikla narasla iz 21 na 43 %. Kasneje se je povečal delež celic v G2/M fazi in celice so se v prvih petih dneh malo namnožile. Iz 5. na 6. dan smo vključili perfuzijo in povečal se je delež celic v G1 fazi celičnega cikla, odstotek celic v S in G2/M fazi cikla pa je padel. V tem bioprocesu je odstotek celic v S fazi, ko smo povečevali pretok perfuzije večinoma padal, naraščal pa je odstotek celic v G2/M fazi. Vedno, ko je narasel odstotek celic v S fazi, se je naslednji dan, povečal odstotek celic v G2/M fazi. Ko smo prvič vklopili perfuzijo (iz 5. na 6. dan) se je povečal delež celic v G1 fazi, delež celic v S in G2/M fazi pa je padel. Ob drugem vklopu perfuzije (iz 17. na 18. dan) (vmes smo jo zaradi slabe rasti celic izključili), se je malo povečal delež celic v G1 fazi in ob nadaljnih večanjih pretoka pa je naraščal delež G2/M faze. Perfuzijo smo zaradi slabe celične rasti zopet izključili in ponovno vključili iz 25. na 26. dan in do 36. dneva večali pretok. Tu je narasel delež G2/M faze iz 13 % (26. dan) na 34 % (36. dan). Do konca bioprocesa je G2/M faza dvakrat presegla 45 %. Iz grafikona je razvidno, da ob močnem porastu koncentracije živih celic, naraste tudi G2/M faza. Od začetka do konca bioprocesa je razviden porast celic v G2/M fazi celičnega cikla. Odstotek celic v G1 fazi se je od začetka do konca bioprocesa zmanjšal za 29 %, odstotek celic v S

fazi pa je dokaj enakomerno naraščal in padal. Rezultati so pokazali, da so celice od 28. dneva naprej bolje rasle, saj smo dosegli višje celične koncentracije. Iz 27. na 28. dan je močno narasel delež celic v G2/M fazi celičnega cikla in do 39. dneva ostal na približno enaki vrednosti. V prvih 20. dnevih bioprocesa celicam ni uspelo dovolj zrasti, kljub temu, da je bil odstotek celic v S fazi podoben kot ob koncu bioprocesa, odstotek celic v G2/M fazi pa se je precej spreminjal in je le enkrat dosegel 30 %, drugače pa se je nahajal nekje med 6 in 24 %. Ko so 28. dan celice začele z intenzivno rastjo, pa je delež celic v G2/M fazi samo enkrat padel pod 30 % (slika 15 in priloga B).



Slika 16: Spremljanje karakteristik celic CHO v drugem bioprocesu.

V prvih 14 dnevih bioprocesa drugem bioprocesu je celična koncentracija dosegla skoraj 2×10^6 celic/ml. 21. dan bioprocesa je bilo v bioreaktorju $3,9 \times 10^6$ celic/ml. Do 30. dneva bioprocesa so se celice namnožile do $13,6 \times 10^6$ celic/ml, 31. dan pa smo v bioreaktorju prešteli $12,5 \times 10^6$ celic/ml. Celična viabilnost, določena s tripanskim modrilom, se je prvih štirinajst dni nahajala med 75 in 87 %. Celična viabilnost je med 5. in 8. dnevom padala in v teh dnevih tudi ni prišlo do povečanja celične koncentracije, nato pa je po 9. dnevu bioprocesa celična viabilnost naraščala. Od 15. do 25. dneva bioprocesa se je celična viabilnost nahajala med 79 in 89 %, 26. dan bioprocesa je celična viabilnost padla na 77 % in do ustavitve bioprocesa ni več presegla 80 %. 15. dan smo začeli drugi bioproces spremljati tudi z metodo AV/PI. Celična viabilnost določena z metodo AV/PI je bila 15. dan 71 %, 16. dan 73 %, nato je do 19. dneva padla na 60 %, 20. dan narasla na 70 %, od 20. dneva naprej pa je odstotek živih celic padal in 31. dan bioprocesa dosegel le 17 %. 15. dan je bilo v bioreaktorju 20 % apoptotičnih celic in odstotek apoptotičnih celic je bil do 19. dneva bioprocesa skoraj konstanten. Odstotek apoptotičnih celic se je 20. dan povečal na 22 % in je naraščal do 31. dneva, ko je bilo v bioreaktorju 52 % apoptotičnih celic, kar je zelo veliko (slika 16 in priloga C).



Slika 17: Delež celic v posameznih fazah celičnega cikla v drugem bioprocisu

Odstotek celic v G1 fazi se je gibal med 39 % in 58 % in je bil prvi in zadnji dan spremljanja popolnoma enak. Odstotek S faze se je gibal med 31 % in 46 % in nikdar ni padel pod 30 %. S faza v drugem bioprocisu zajema dokaj visoke vrednosti ves čas spremljanja bioprocisa. Odstotek celic v G2/M fazi se je nahajal med 6 % in 20 %. Celice so v drugem bioprocisu v kratkem času dosegle visoko koncentracijo, toda odstotek celic v G2/M fazi je bil ves čas nizek in tudi ko se je rastna krivulja viabilnih celic začela strmo vzpenjati, se % celic v G2/M fazi ni izrazito povečal, izrazito pa se povečal % celic v S fazi. Če se je odstotek celic v S fazi znižal, se je povečal odstotek celic v G2/M fazi. Ob večanju pretoka perfuzije smo opazili predvsem porast celic v S fazi celičnega cikla (slika 17 in priloga D).

Z izbranimi metodami pretočne citometrije (metoda AV/PI in metoda za analizo celičnega cikla) smo uspešno spremljali dva bioprocisa in pridobili informacije o deležu apoptotičnih celic, celični viabilnosti in odstotki celic v različnih fazah celičnega cikla.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izbor metod pretočne citometrije, ki bi bile primerne za spremljanje bioprocsov

S pretočno citometrijo smo želeli spremljati količino živih in apoptotičnih celic v bioprocusu. Informacije o teh celičnih karakteristikah so pomembne zato, ker le žive celice lahko sintetizirajo željen protein (Singh in sod., 1994). Če bi imeli v bioprocusu veliko mrtvih in apoptotičnih celic, bi v bioprocusu pridobili manj željenega produkta kot v bioprocusu z visokim deležem živih celic. Odločili smo se tudi za analizo celičnega cikla s pretočnim citometrom. Informacije o deležu celic v posameznih fazah celičnega cikla so pomembne, ker so celice v različnih fazah celičnega cikla različno produktivne. Če bi z ustreznimi bioprocensnimi pogoji lahko regulirali delež celic v želeni fazi celičnega cikla, bi lahko, z ustreznim vodenjem bioprocusa, pridobili več zelenega produkta (Leelavatcharamas in sod., 1999).

Pred začetkom merjenja s pretočnim citometrom smo si postavili kriterije na podlagi katerih smo izbrali metode, ki bi lahko bile uporabne za spremljanje bioprocusa. Kriteriji za izbor metod so bili: (1) rezultate meritev želimo dobiti na dan vzorčenja, (2) enostavnost priprave vzorca, (3) preglednost točkovnih diagramov in število informacij na točkovnih diagramih in (4) dostopna cena. Za spremljanje bioprocusa je pomembno, da rezultate dobimo na dan vzorčenja. V primeru, da rezultati pokažejo na slabo stanje celic v bioreaktorju, bi tako včasih lahko še pravočasno ukrepali s spremembo fizikalnih in kemijskih parametrov bioprocusa. Mnoge metode pretočne citometrije pri pripravi in obdelavi vzorcev zahtevajo dolgo fiksacijo in je zato pri teh metodah analiza vzorcev s pretočnim citometrom možna najhitreje en dan po vzorčenju, kar pa je za učinkovito spremljanje in vodenje bioprocusa lahko prepozno.

5.1.1.1 Izbor metode za določanje deleža apoptotičnih celic v bioprocseh

Spremljanje deleža apoptotičnih celic je smiselno, ker apoptotične celice predstavljajo velik problem v biotehnologiji, saj niso več zmožne proteinske sinteze. Mrtve in apoptotične celice nič ne pripomorejo k celični produkciji željenih proteinov. Za spremljanje deleža apoptotičnih celic smo uporabili metode pretočne citometrije. Apoptotične celice je nemogoče prepoznati s svetlobnim mikroskopom, ki ga uporabljamo za rutinsko celično štetje in določanje celične viabilnosti, saj apoptotične celice prepoznamo kot žive. Poleg pretočne citometrije obstajajo tudi druge tehnike, ki omogočajo prepoznavanje apoptotičnih celic. Za izvedbo drugih tehnik nismo imeli ustrezne opreme, vendar jih bom vseeno omenila. Ena teh je fluorescentna mikroskopija. Tako kot pri pretočni citometriji, tudi tu biokemijske in morfološke spremembe celic v apoptozi prepoznamo z barvanjem s fluorescentnimi barvili oziroma fluorescentno označenimi proteini in preiskovanjem z mikroskopom. Apoptozo lahko prepoznamo tudi z uporabo elektronskega mikroskopa, ki z večjimi povečavami omogoča prepoznavanje apoptotičnih celic na osnovi morfoloških sprememb, ki so značilne za apoptozo, vendar je priprava vzorcev za elektronski mikroskop veliko zahtevnejša.

Za spremljanje deleža apoptotičnih celic smo uporabili dve metodi pretočne citometrije. Prva metoda omogoča določanje deleža celic v zgodnji apoptozi in vključuje uporabo proteina AV in barvila PI. Meritve smo izvedli z Vybrant™ Apoptosis Assay kitom #2.

Druga metoda omogoča določanje odstotka celic v pozni apoptozi in se imenuje TUNEL. Za metodo TUNEL smo uporabili Apo-BrdU™ komercialni kit.

Za metodo AV/PI smo posebej izdelali tudi negativno in pozitivno kontrolo, za metodo TUNEL pa sta negativna in pozitivna kontrola del komercialnega kita. Za negativno kontrolo smo želeli čimveč živih celic, za pozitivno kontrolo pa čimveč apoptotičnih in mrtvih celic. Rezultati pozitivne in negativne kontrole za metodo AV/PI so pokazali, da je po inkubaciji celic z induktorjem apoptoze kamptotecinom delež apoptotičnih celic narasel iz 3 na 19 % (slika 6). Pri negativni kontroli za metodo TUNEL je bilo v vzorcu 0,2 % apoptotičnih celic, medtem ko je bilo pri pozitivni kontroli v vzorcu 37 % apoptotičnih celic (sliki 7 in 8). Rezultati meritev pozitivne in negativne kontrole so pokazali, da smo z

obema metodama zaznali višji delež apoptotičnih celic pri vzorcih, ki so izpostavljeni induktorju apoptoze, kot smo pričakovali.

Kot je razvidno iz rezultatov smo pri uporabi metode AV/PI dobili večje deleže apoptoze, čeprav sta bile obe metodi izvedeni na istih vzorcih (slika 11). Deleži apoptoze izmerjeni z metodo TUNEL so pri istih vzorcih nižji. Že pred meritvami smo pričakovali razlike, saj metoda AV/PI omogoča merjenje celic v zgodnji apoptozi, metoda TUNEL pa merjenje celic v pozni apoptozi. Prav tako vsaka metoda meri druge karakteristike apoptotičnih celic. Tu velja omeniti tudi to, da je bioproces potekal s pomočjo perfuzije in spin-filtra. Celice v pozni apoptozi so manjše in bolj poškodovane od celic v zgodnji apoptozi in obstaja možnost, da so se pozno apoptotične celice v večji meri odstranjevale iz bioreaktorja skozi spin-filter, kar bi pojasnilo nižji delež pozno apoptotičnih celic v bioreaktorju. To smo želeli preveriti tako, da smo odvzeli vzorce iz spin-filtra in bioreaktorja nekega drugega bioprocesa in izmerili delež apoptoze v bioreaktorju in spin-filtru z obema metodama pretočne citometrije. Rezultati vzorcev iz tega bioprocesa so pokazali, da je v bioreaktorju več pozne, kot zgodnje apoptoze (slika 12). V spin-filtru so prevladovali mrtve in apoptotične celice, kar kaže na to, da spin-filter dobro odstranjuje mrtve in tudi apoptotične celice iz bioreaktorja. Delež pozne apoptoze, je bil v spin-filtru precej višji od deleža zgodnje apoptoze, vendar je bil delež pozno apoptotičnih celic višji tudi v bioreaktorju. Na podlagi teh rezultatov ne moremo trditi, da se pozno apoptotične celice v večji meri odstranjujejo skozi spin-filter kot zgodnje apoptotične celice. Obstaja pa tudi možnost, da je visok delež zgodnje apoptotičnih celic posledica slabega okolja za celice v spin-filtru, kjer se celice zadržijo približno 1 uro. V spin-filtru so slabši pogoji za celice in obstaja možnost, da se program apoptoze sproži v samem spin-filtru (zadrževalni čas celic v spin-filtru je približno 1 ura), ker tam celicam primanjkuje hranil in kisika. Če je temu tako, bi take celice zaznali kot celice v zgodnji apoptozi, saj se je program apoptoze sprožil šele pred kratkim. Če je visok delež zgodnje apoptotičnih celic v spin-filtru tudi posledica slabih pogojev v spin-filtru, bi lahko bila razlaga, da spin-filter v večji meri odstranjuje pozno apoptotične celice ustrezna. Vzorci iz spin-filtrov se tekom bioprocesa vsakodnevno štejejo pod svetlobnim mikroskopom in s pomočjo tripanskega modrila se določi delež živih celic v spin-filtru. Z metodami pretočne citometrije smo pokazali, da je večina celic, ki so v spin-filtru in se pod svetlobnim mikroskopom kažejo

kot žive, apoptotičnih celic. Spin-filter torej dobro opravlja selekcijo med živimi, apoptotičnimi in mrtvimi celicami.

Iz grafa, ki prikazuje deleže apoptoze v bioreaktorju izmerjene z metodama AV/PI in TUNEL (slika 11) je dobro viden tudi vpliv zamašitve spin-filtra. Drugi dan je namreč v bioreaktorju prišlo do zamašitve spin-filtra, tako da je bilo odstranjevanje mrtvih in apoptotičnih celic iz bioreaktorja onemogočeno. Pri obeh metodah se je delež apoptotičnih celic v bioreaktorju povečal. Ko smo zamenjali spin-filter je nov spin-filter apoptotične celice hitro odstranil iz sistema in obe metodi sta pokazali hiter padec deleža apoptotičnih celic v bioreaktorju. Iz tega lahko zaključimo, da bi ob pomembnih pozitivnih in negativnih spremembah v bioprocusu, obe metodi pokazali na spremembo v deležu apoptotičnih celic in dali pomembno informacijo o stanju celic v bioreaktorju.

Kljub temu, da se rezultati obeh metod po trendu večinoma ujemajo (delež apoptotičnih celic večinoma istočasno narašča oziroma pada pri obeh metodah) (slika 11) in sta pozitivna in negativna kontrola pri obeh metodah pokazali na primernost obeh metod za naše celične vzorce, pa metoda TUNEL ni zadostila kriterijem primernosti za spremljanje bioprocusa, ki smo si jih postavili na samem začetku. Rezultati prvih meritev z metodo TUNEL so pokazali, da v bioreaktorju ni apoptotičnih celic, istočasno pa so rezultati metode AV/PI pokazali kar visok delež apoptotičnih celic v bioreaktorju. Sklepali smo, da moramo pogoje izvedbe testa optimizirati. Pokazalo se je, da je potrebno podaljšati čas fiksacije v paraformaldehidu. Fiksacija v paraformaldehidu je namenjena temu, da se zamrežijo majhni fragmenti DNK znotraj celice in tako jim preprečimo, da bi iz celice med spiranjem ušli. Ker je bila fiksacija v prvih poskusih prekratka, ni prišlo do ustrezne zamrežitve in fragmentirana DNK je tekom obdelave vzorca ušla iz celic, zato je bil rezultat metode TUNEL lažno negativen. Po nekaj poskusih smo ugotovili, da moramo vzorce v paraformaldehidu fiksirati čez noč, kar nam je onemogočilo, da bi vzorce izmerili s pretočnim citometrom na dan vzorčenja. Slabost metode TUNEL je tudi, da je priprava vzorcev veliko zamudnejša od priprave vzorcev za metodo AV/PI, kjer je priprava vzorca hitra in traja le okoli 30 minut. Priprava vzorca za metodo TUNEL pa zahteva najmanj 4 ure. Dodatna prednost metode AV/PI je tudi to, da nam poleg odstotka apoptotičnih celic istočasno posreduje tudi odstotek živih oziroma mrtvih celic, česar z metodo TUNEL ne

dobimo. Kit za izvedbo metode TUNEL je tudi precej dražji od kita za izvedbo metode AV/PI.

Zaradi večje časovne in cenovne ekonomičnosti, podatkov o apoptozi in celični viabilnosti hkrati in enostavnosti izvedbe metode, smo se odločili, da za spremljanje apoptoze v bioreaktorju uporabimo metodo AV/PI.

5.1.1.2 Izbor metode za določanje deleža živih celic v bioprocesu

Določanje deleža živih celic v bioreaktorju je pomemben del spremljanja bioprocasa. Večinoma se za določanje celične viabilnosti uporablja direktno štetje s svetlobnim mikroskopom ob uporabi barvila tripan modro. Poleg te klasične in tudi najbolj pogosto uporabljene metode smo poskušali določiti delež živih celic še z dvema metodama pretočne citometrije. Uporabili smo metodo, ki vključuje uporabo dveh fluorescentnih barvil TO in PI. Metodo smo izvedli s komercialnim kitom BD Cell Viability kit. Da bi preverili zanesljivost metode smo izdelali tudi pozitivno in negativno kontrolo. Za negativno kontrolo, kjer smo želeli večinoma žive celice, smo uporabili celice, ki smo jih gojili v prisotnosti seruma (FBS), kar celicam omogoča boljšo rast in višjo celično viabilnost, kot gojišča brez seruma. V vzorcu negativne kontrole smo izmerili 20 % mrtvih celic. To je nižje od najnižje vrednosti dobljene v vzorcih iz bioreaktorja, kjer smo celice gojili v gojiščih brez seruma. V teden dni starem celičnem vzorcu, ki je služil za pozitivno kontrolo, kjer smo želeli čimveč mrtvih celic, smo izmerili 99 % mrtvih celic (slika 5). Rezultat pozitivne in negativne kontrole je pokazal, da metoda TO/PI pokaže na spremembe v celični viabilnosti pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem.

Celično viabilnost smo določali tudi z metodo AV/PI, ki smo jo že uporabili za določanje deleža apoptotičnih celic in vključuje uporabo proteina AV in barvila PI. S to metodo lahko določimo delež apoptotičnih celic, delež živih celic in mrtvih celic. Z eno samo meritvijo dobimo podatke o odstotku živih, apoptotičnih in mrtvih celic v vzorcu.

Apoptotične celice se z metodo TO/PI barvajo kot žive celice in tudi ob uporabi svetlobnega mikroskopa in barvila tripan modro se apoptotične celice ne ločijo od živih

celic. Tripan modro ne prodre v apoptotične celice in celice izgledajo žive, vemo pa, da bodo v kmalu mrtve. Da smo lahko naredili primerjavo vseh treh metod, smo k živim celicam, ki smo jih določili z metodo AV/PI prišteli tudi apoptotične celice (tako bi celična viabilnost izgledala pod svetlobnim mikroskopom in pri metodi TO/PI s pretočno citometrijo).

Rezultati so pokazali, da se celična viabilnost dobljena s tremi različnimi metodami razlikuje glede na posamezno metodo (slika 13). Ob primerjavi obeh metod pretočne citometrije smo ugotovili, da metoda s TO/PI poda nekoliko nižji odstotek živih celic, kot metoda z AV/PI. Pri obeh metodah pa celična viabilnost istočasno narašča in istočasno pada. Časovno obe metodi vzameta približno enako časa.

S spremljanjem celične viabilnosti s svetlobnim mikroskopom in barvilom tripan modro smo presenetljivo dobili drugačne rezultate, kot z obema metodama pretočne citometrije (slika 13). Rezultati so kazali ravno nasprotno trende: ko, npr. sedmi dan odstotek živih celic pri metodi AV/PI in metodi TO/PI naraste, le ta pri metodi s tripanskim modrilom pade. Tak trend se je kazal skoraj ob vseh dnevih vzorčenja, razen od prvega do tretjega dne, kjer je celična viabilnost pri vseh treh metodah padla. Dobre razlage za ta pojav pravzaprav nimamo. Verjetno ima pomemben vpliv eksperimentalna napaka. Obstaja možnost, da prihaja do razlik zaradi eksperimentalnih napak obeh metod in dejstva, da absolutne razlike v celični viabilnosti med posameznimi dnevi niso velike. Nekateri viri navajajo, da je določanje celične viabilnosti s pretočno citometrijo bolj natančno in objektivno, kot z mikroskopijo (Al-Rubeai in sod., 1997). Z direktnim štetjem preštejemo veliko manj celic kot jih preštejemo na pretočnem citometru in je zato natančnost mikroskopije veliko manjša. Dodatno napako vnašamo tudi pri redčenju vzorca za štetje z mikroskopom. Po drugi strani pa se ravno metoda s tripanskim modrilom pogosto uporablja in predstavlja zlati standard za določanje celične viabilnosti pri delu s celičnimi kulturami.

Glede na to, da smo z obema metodama pretočne citometrije dobili podobne informacije o naraščanju oziroma padanju celične viabilnosti, smo se odločili, da za spremljanje bioprocesa uporabimo metodo AV/PI, ker nam ponuja več informacij o karakteristikah

celic CHO hkrati. Za spremljanje bioprocasa smo uporabili tudi štetje s svetlobnim mikroskopom in določanje celične viabilnosti z barvilom tripan modro, saj se rezultati, dobljeni z metodami pretočne citometrije in direktnim štetjem se preveč razlikujejo, da bi direktno štetje lahko izločili. Poleg tega je za vsako od metod pretočne citometrije, ki smo jih uporabili v tem diplomskem delu, celice potrebno prešteti, saj potrebujemo neko določeno število celic, da metode sploh lahko izvedemo. Če celice obarvamo še s tripanskim modrilom, nam to vzame samo 5 minut dodatnega časa.

5.1.2 Spremljanje bioprocsov

Za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprocseh smo torej izbrali naslednje metode pretočne citometrije: za spremljanje deleža apoptotičnih in živih celic metodo z uporabo proteina AV in barvila PI ter, za spremljanje deleža celic v G1, S in G2/M fazi celičnega cikla, metodo z uporabo detergenta in barvila PI. Poleg omenjenih metod pretočne citometrije smo za spremljanje bioprocsov uporabili tudi direktno štetje s svetlobnim mikroskopom in tako določili celično koncentracijo v bioreaktorju. Uporabili smo barvilo tripan modro in ob štetju celic s svetlobnim mikroskopom določili delež živih celic v vzorcih iz bioreaktorja.

5.1.2.1 Spremljanje celične viabilnosti in apoptoze

V prvem bioprocasu je bila začetna koncentracija celic v bioreaktorju $0,46 \times 10^6$ celic/ml. Celična koncentracija je prvih 24 dni zelo počasi naraščala. To je razvidno iz rastne krivulje kjer koncentracija celic v 24 dnevih ne preseže 2×10^6 celic/ml. V relativno dobrem perfuzijskem bioprocasu bi morali v 24 dnevih vzgojiti nekaj čez 5×10^6 celic/ml. Tudi, ko smo iz 5. na 6. dan vklopili perfuzijo in so celice s tem dobile sveža in nova hranila, se koncentracija celic praktično ni povečevala. Perfuzijo smo iz 10. na 11. dan ustavili in iz bioreaktorja odvzeli 2 l gojišča ter dodali 2 l svežega gojišča in s tem na žalost odstranili tudi nekaj celic. Celična koncentracija se je 12. in 13. dan povečala za 3×10^5 celic/ml, kar je relativno malo. Domnevali smo, da je nekaj narobe z gojiščem, zato smo 13. dan odstranili še 3,5 l gojišča in ga nadomestili z na novo pripravljenim gojiščem.

Celice so do 24. dneva še vedno počasi rastle, kasneje pa se je rast celic v bioreaktorju izboljšala (slika 14 in priloga A).

Celična viabilnost, ki smo jo določili s pomočjo svetlobnega mikroskopa in barvila tripan modro, je bila prvih 13 dni bioprocasa dokaj konstanta in se je nahajala med 81 in 86 %. 14. dan je celična viabilnost padla na 78 %, nato pa se je do 23. dneva odstotek živih celic povečeval in včasih celo presegel 90 %. Celična viabilnost je 24. in 28. dan zopet padla, nato pa se je do 41. dneva nahajala med 81 in 87 %. 41. dan je odstotek živih celic padel pod 75 % in se ni več povečal do ustavitve bioprocasa. Za celično viabilnost, določeno z barvilom tripan modro, velja da je stanje celic v bioreaktorju dobro, ko je v njem nad 80 % živih celic, kritična meja pa je 70 % živih celic. Razlog, da je celična viabilnost zadnje dni bioprocasa padala, je verjetno v starosti celic in bioprocasa. Če pogledamo naše rezultate o celični viabilnosti, bi lahko celo trdili, da je bila viabilnost dobra, vendar v 45 dnevih bioprocasa na žalost nismo dosegli zadostne celične koncentracije. V prejšnjih bioprocseh smo v istem času vzgojili nad 20×10^6 celic/ml (slika 14 in priloga A).

Celično viabilnost in odstotek apoptotičnih smo spremljali tudi z metodo AV/PI s pretočnim citometrom. Tu so odstotki živih celic nižji kot pri metodi s tripanskim modrilom, saj metoda AV/PI omogoča tudi določanje apoptotičnih celic, ki jih tripansko modrilo ne obarva in jih pod mikroskopom prepoznamo kot žive celice. Celična viabilnost, ki smo jo določili z metodo AV/PI se je iz dneva v dan veliko bolj spreminjala, kot viabilnost določena s tripanskim modrilom. Razlog za večje spremembe v odstotku živih celic je v tem, da z metodo AV/PI hkrati določamo odstotek živih, apoptotičnih in mrtvih celic. Če npr. v bioreaktorju pade odstotek živih celic, naraste odstotek apoptotičnih in/ali mrtvih celic. Celična viabilnost se je iz prvega na drugi dan bioprocasa zmanjšala za 11 %, odstotek apoptotičnih in mrtvih celic pa se je povečal (slika 14 in priloga A). To je razumljivo, saj smo celice prenesli v bioreaktor, kar predstavlja spremembo okolja za celice (močnejše mešanje, prezračevanje, otežen prenos kisika do celic, itd...). Celična viabilnost je v bioreaktorjih navadno nižja kot v gojitvenih posodicah ali spinnerjih. Razlog za gojenje celic v bioreaktorju je, da le tako lahko pridemo do visokih celičnih koncentracij in posledično lahko pridobimo večjo količino proteinov. Odstotek živih celic, ki smo ga določili z metodo AV/PI je od 1. do 13. dneva bioprocasa padel iz 75 na 62 %, odstotek

apoptotičnih celic je istočasno narasel iz 18 na 29 %. 14. dan bioprocresa se je celična viabilnost močno padla (iz 62 na 29 %), prišlo pa je tudi do velikega porasta apoptotičnih celic (iz 29 na 46 %). Dan prej smo opravili zamenjavo gojišča in obstaja možnost, da so bile celice 14. dan v slabem stanju, ker gojišče ni bilo primerno ogreto. Bioreaktor s svojo termoregulacijo omogoča ogrevanje gojišča na primerno temperaturo, vendar zaradi velike količine svežega gojišča tega verjetno ni zmožal dovolj hitro. Hladno gojišče predstavlja velik stres za celice in to se je verjetno pokazalo v naraščanju apoptoze in padanju celične viabilnosti (celična viabilnost določena z metodama AV/PI in tripanskim modrilom je padla). Že 15. dan bioprocresa se je stanje celic v bioreaktorju močno izboljšalo saj je odstotek apoptotičnih celic je padel , celična viabilnost določena z metodo AV/PI pa je narasla. Do 20. dneva se je delež apoptotičnih celic v bioreaktorju nižal, delež živih celic določen z metodo AV/PI pa se je povišal. V bioprocusu je bilo 19. in 20. dan najboljše stanje celic v bioreaktorju (visoka viabilnost določena z obema metodama in nizek odstotek apoptoze). Kljub temu se koncentracija celic v bioreaktorju ni veliko povečala. Od 21. dneva naprej je bil delež apoptotičnih celic dokaj ustaljen, razen 29. in 42. dan, ko smo zopet izmerili porast v deležu apoptotičnih celic. Zadnji dan bioprocresa pa je bilo v bioreaktorju 29 % apoptotičnih celic. Celična viabilnost določena z metodo AV/PI je od 21. dneva bioprocresa izmenično padala in naraščala, zadnji dan bioprocresa pa je bilo v bioreaktorju 51 % živih celic. Kljub izmeničnemu padanju in naraščanju celične viabilnosti določene z metodo AV/PI je iz grafikona vidno, da se je celična viabilnost s starostjo bioprocresa počasi nižala. Z metodo, ki vključuje uporabo tripanskega modrila nismo opazili tako velikih nihanj v celični viabilnosti, kot pri metodi AV/PI. Kljub temu se iz grafikona lahko razbere, da je celična viabilnost določena s tripanskim modrilom zadnje dneve (42., 43. in 44. dan) dosegla najnižjo vrednost v celotnem bioprocusu. Bioprocres smo iz 44. na 45. dan zaključili, ker je bil bioprocres že star, celice pa se še vedno niso dovolj namnožile (slika 14 in priloga A).

V drugem bioprocusu je bila začetna celična koncentracija v bioreaktorju $0,49 \times 10^6$ celic/ml. Po petih dneh bioprocresa so se celice namnožile do koncentracije 1×10^6 celic/ml in takrat smo vklopili perfuzijo. Po vklopu perfuzije je celična koncentracija nekoliko padla, saj se skozi spin-filter izloči tudi nekaj živih celic. Štirinajsti dan bioprocresa se je celična koncentracija dvignila na skoraj 2×10^6 celic/ml, kar je veliko prej, kot pri prvem

bioprocusu, ko smo tako koncentracijo celic prešteli šele 29. dan bioprocesa. 21. dan bioprocesa smo v bioreaktorju prešteli $3,9 \times 10^6$ celic/ml, 22. dan je koncentracija celic zaradi povečanega pretoka perfuzije ponovno padla, nato pa so se celice dobro namnoževale. 27. dan bioprocesa smo imeli v bioreaktorju $9,3 \times 10^6$ celic/ml, isti dan smo povečali pretok perfuzije in koncentracija celic je ponovno padla. 29. in 30. dan je koncentracija celic narasla do koncentracije $13,6 \times 10^6$ celic/ml. 31. dan drugega bioprocesa se je koncentracija celic v bioreaktorju, zmanjšala na $12,5 \times 10^6$ celic/ml in smo bioprocus ustavili (slika 16 in priloga C).

Celična viabilnost, določena s tripanskim modrilom, se je prvih štirinajst dni nahajala med 75 in 87 %. Celična viabilnost med 5. in 8. dnevom padala in v teh dnevih tudi ni prišlo do povečanja celične koncentracije, nato pa je po 9. dnevu bioprocesa celična viabilnost naraščala, počasi pa je začela naraščati tudi celična koncentracija. Od 10. do 25. dneva bioprocesa se je celična viabilnost nahajala med 79 in 89 %, 26. dan bioprocesa pa je padla na 77 % in do ustavitve bioprocesa ni več preseгла 80 %. 15. dan smo začeli drugi bioprocus spremljati tudi z metodo AV/PI s pretočnim citometrom. Celična viabilnost določena z metodo AV/PI je bila 15. dan 16. dan okoli 70 %, nato je do 19. dneva padla na 60 %, 20. dan narasla na 70 %, od 20. dneva naprej pa je odstotek živih celic večinoma padal. Zadnji dan bioprocesa je bilo z metodo AV/PI v bioreaktorju določenih le še 17 % živih celic. Od 15. do 19. dneva je bil delež apoptotičnih celic dokaj konstanten. Odstotek apoptotičnih celic je od 20. dan povišal in je naraščal do 31. dneva, ko je bilo v bioreaktorju 52 % apoptotičnih celic, kar je zelo veliko. Na grafikonu sta krivulji živih (AV in PI negativne celice) in apoptotičnih (AV pozitivne celice) skoraj zrcalni. Bioprocus smo 31. dan ustavili. Razlog za ustavitev bioprocesa ni bila celična koncentracija, ki je bila v primerjavi s prvim bioprocusom višja, temveč v padanju odstotka živih celic in naraščanju odstotka apoptotičnih celic ter penjenju gojišča, kar je slabo vplivalo na kakovost celic (slika 16 in priloga C).

Rezultati, dobljeni z metodo pretočne citometrije, kažejo na slabo stanje celic v drugem bioprocusu. Pri drugem bioprocusu smo imeli velike težave s penjenjem gojišča, česar nismo mogli zmanjšati. Obstaja možnost, da je prav penjenje gojišča vplivalo na

naraščanje odstotka apoptotičnih celic in padanje odstotka živih celic v bioreaktorju, saj je znano, da penjenje gojišča slabo vpliva na celično viabilnost (Ozturk, 1996).

S spremljanjem prvega bioprocesa z metodo AV/PI nismo dobili tako slabih rezultatov o celični viabilnosti in apoptozi, če pa so bili rezultati že slabi, se je stanje celic dokaj hitro izboljšalo. Izjema so bili dnevi proti koncu bioprocesa, ko so bile celice že precej stare (slika 14). Glede na večjo koncentracijo celic pri drugem bioprocusu kot v prvem, kjer je bila rast celic izjemno slaba, bi lahko pri drugem bioprocusu pričakovali boljšo celično viabilnost in nižji delež apoptotičnih celic, vendar rezultati kažejo na slabše celično stanje prav v drugem bioprocusu (sliki 14 in 16).

Celična viabilnost določena s tripanskim modrilom se je ob spremljanju obeh bioprocsov nahajala v približno enakem številčnem območju kljub temu, da so celice v prvem bioprocusu slabo rastle, v drugem bioprocusu je bila celična rast dobra in kljub temu, da sta celična viabilnost in apoptoza določeni z metodo AV/PI v drugem bioprocusu pokazali na izredno nizek delež dejansko živih celic v bioreaktorju. Rezultati, dobljeni z metodo pretočne citometrije, so presenetljivo pokazali na slabšo celično stanje celic v drugem bioprocusu kot v prvem. Rezultati celične viabilnosti s tripanskim modrilom so v našem primeru lahko zavajajoči, saj bi na podlagi njih lahko domnevali, da so celice v drugem bioprocusu dokaj dobre. Šele, če bi naredili teste za ovrednotenje celične produktivnosti, bi se verjetno pokazalo, da je količina željenega proteina, glede na dokaj visoko celično koncentracijo, prenizka. Glede na stanje celic v drugem bioprocusu, kot smo ga dokazali z metodami pretočne citometrije, bi težko pričakovali, da bi v tem bioprocusu dobili dovolj produkta, ker mrtve in apoptotične celice niso več sposobne sinteze željenega proteina.

5.1.2.2 Spremljanje celičnega cikla

Z metodo pretočne citometrije smo spremljali tudi odstotek celic v posameznih fazah celičnega cikla pri prvem in drugem bioprocusu. V bioprocusu je za čimvečjo sintezo zelenega proteina najbolje, da je največ celic v G1 ali S fazi celičnega cikla (odvisno v kateri od omenjenih faz se uporabljen promotor najmočneje izraža) (Boer in sod, 2004). Z

dobrim vodenjem bioprocasa, predvsem ustrezno regulacijo pretoka perfuzije, je možno vplivati na delež celic v želeni fazi celičnega cikla (Leelavatchamaras in sod., 1999). Pri prvem bioprocasu smo celični cikel spremljali od začetka do konca bioprocasa, pri drugem bioprocasu, pa smo s spremljanjem celičnega cikla začeli 15. dan bioprocasa.

Po inokulaciji celic v prvi bioreaktor je S faza celičnega cikla narasla iz, kar je prvo znamenje celične aktivnosti. Kasneje se je povečal delež celic v G2/M fazi in celice so se v prvih petih dnevih malo namnožile. Iz 5. na 6. dan smo vključili perfuzijo in povečal se je delež celic v G1 fazi celičnega cikla, odstotek celic v S in G2/M fazi cikla pa je padel. To je v nasprotju s tem, kar so poročali Leelavatchamaras in sod., 1999, ko so ob vklopu perfuzije in nadaljnih večanjih pretoka perfuzije zaznali močan porast celic v S fazi. V našem bioprocasu je odstotek celic v S fazi, ko smo povečevali pretok perfuzije večinoma padal, naraščal pa je odstotek celic v G2/M fazi. Ker smo pretok perfuzije povečali vedno zvečer, obstaja možnost, da so celice že prešle iz S v G2/M fazo celičnega cikla. Vedno, ko je narasel odstotek celic v S fazi, se je naslednji dan, povečal odstotek celic v G2/M fazi celičnega cikla (slika 15 in priloga B).

Ko smo prvič vklopili perfuzijo (5. dan) se je povečal delež celic v G1 fazi, delež celic v S in G2/M fazi pa je padel. Ob drugem vklopu perfuzije (vmes smo jo zaradi slabe rasti celic izključili), se je malo povečal delež celic v G1 fazi in ob nadaljnih večanjih pretoka pa je naraščal delež G2/M faze. Perfuzijo smo zaradi slabe celične rasti zopet izključili in ponovno vključili 25. dan in do 36. dneva večali njen pretok. Tu je narasel delež G2/M faze iz 13 % (26. dan) na 34 % (36. dan). Do konca bioprocasa je G2/M faza dvakrat preseгла 45 %. Iz grafikona je razvidno, da ob močnem porastu koncentracije živih celic, naraste tudi G2/M faza, kar je razumljivo, saj se v tej fazi celice razdelijo. Od začetka do konca bioprocasa je razviden porast celic v G2/M fazi celičnega cikla. Odstotek celic v G1 fazi se je od začetka do konca bioprocasa zmanjšal za 29 %, odstotek celic v S fazi pa je dokaj enakomerno naraščal in padal. Rezultati so pokazali, da so celice od 28. dneva naprej bolje rasle, saj smo dosegli višje celične koncentracije. Iz 27. na 28. dan je močno narasel delež celic v G2/M fazi celičnega cikla in do 39. dneva ostal na približno enaki vrednosti. Zanimivo je tudi to, da v prvih 20. dnevih bioprocasa celicam ni uspelo dovolj zrasti, kljub temu, da je bil odstotek celic v S fazi podoben kot ob koncu bioprocasa, odstotek celic v

G2/M fazi pa se je precej spreminjal in je le enkrat dosegel 30 %, drugače pa se je nahajal nekje med 6 in 24 %. Ko so 28. dan celice začele z intenzivno rastjo, je delež celic v G2/M fazi samo enkrat padel pod 30 %. Če primerjamo vrednosti odstotkov celic v G1, S in G2/M fazi celičnega cikla številčno večinoma ves čas prevladujejo celice v G1 fazi, kar je razumljivo, saj je to najdaljša faza celičnega cikla, sledi ji S faza in na koncu G2/M faza. Vendar se te faze med sabo izmenjujejo in lahko se zgodi, da tudi S in G2/M faza številčno presežeta delež celic v G1 fazi in to se je proti koncu našega prvega bioprocesa tudi večkrat zgodilo (slika 15 in priloga B).

Drugi bioprocseh smo s pretočno citometrijo spremljali le 16 dni, s spremljanjem pa smo začeli 15. dan bioprocesa. Iz grafikona je razvidno, da smo s spremljanjem celičnega cikla v drugem bioprocseh zaznali manjše spremembe v nihanju odstotkov G1, S in G2/M faze celičnega cikla, kot v prvem bioprocseh (slika 17 in priloga D). Odstotek celic v G1 fazi se je gibal med 39 in 58 % in je bil prvi in zadnji dan spremljanja popolnoma enak. Odstotek celic v S fazi se je gibal med 31 in 46 % in nikdar ni padel pod 30 %, kar smo velikokrat zaznali pri spremljanju prvega bioprocesa. Odstotek celic v S fazi v drugem bioprocseh zajema dokaj visoke vrednosti ves čas spremljanja bioprocesa. Odstotek celic v G2/M fazi je bil v drugem bioprocseh precej nižji od prvega bioprocesa in se je gibal med 6 in 20 %. Celice so v drugem bioprocseh v krajšem času dosegle večjo koncentracijo kot v prvem, zato je zanimivo, da je odstotek celic v G2/M fazi nižji in tudi, ko se rastna krivulja viabilnih celic strmo vzpenja, se G2/M faza ne več izrazito, izrazito pa se več S faza. Če se je odstotek celic v S fazi znižal, se je povišal odstotek celic v G2/M fazi. Ob večanju pretoka perfuzije smo opazili predvsem porast celic v S fazi celičnega cikla (slika 17 in priloga D).

Odstotek celic v S ali G2/M fazi celičnega cikla se ob povečanju pretoka perfuzije poveča, ker celice dobijo sveže gojišče, kar povzroči ugodnejše okolje in celice se lažje množijo.

Analiza celičnega cikla je zanimiva predvsem iz dveh razlogov:

Prvi razlog za analizo je, da želimo dobro celično delitev in z analizo celičnega cikla lahko spremljamo v kakšnih pogojih (FI, KE) bi dobili višji odstotek S ali G2/M faze celičnega cikla. Nekateri viri (Leelavatchamaras in sod.,1999) poročajo, da je s povečevanjem pretoka perfuzije možno vzdrževati delež celic v S fazi na nekem %, ki je najugodnejši za dobro celično delitev in produkcijo. Ko odstotek celic v S fazi celičnega cikla pade pod izbran %, enostavno lahko povečamo pretok perfuzije in S faza naj bi se ponovno dvignila. Namen vzdrževanja S faze na dovolj visoki ravni je predvsem doseči čimboljše razmnoževanje celic in tudi produktivnost, kar s povečanim pretokom perfuzije omogoča sveže gojišče. Tudi izrazito povečanje G2/M faze pomeni, da se celice delijo, vendar pa je celična produktivnost tu večinoma slabša.

Drugi razlog za analizo celičnega cikla je, da so celice v različnih fazah celičnega cikla različno produktivne. Za učinkovit bioproc es je pomembna tako koncentracija celic, kot celična produktivnost, saj sta le ti med seboj povezani (več celic pomeni več produkta). Za izražanje rekombinantnih proteinov se uporabljajo promotorji, ki so najbolj aktivni v G1 fazi celičnega cikla ali pa taki, ki so najbolj aktivni v S fazi. Če je promotor 1. tipa, se največ proteina sintetizira, ko je celica v G1 fazi, če pa je 2. tipa, se največ proteina sintetizira, ko je celica v S fazi. V bioproc esu želimo torej vzdrževati visok % celic v G1 oziroma S fazi, kar je odvisno od tipa uporabljenega promotorja, saj bomo tako omogočili, da bodo celice sintetizirale več željenega proteina (Boer in sod, 2004). Odstotek celic v željeni fazi celičnega cikla je možno delno regulirati s pretokom perfuzije in tudi drugimi okoljskimi pogoji, vendar je prej potrebno narediti optimizacijo bioproc esa. Potrebno je ugotoviti, v kateri fazi celičnega cikla se večinoma nahajajo celice ter v kakšnih deležih in kako s spremembami fizikalnih in kemijskih parametrov bioproc esa lahko vzdržujemo čimveč celic v željeni fazi celičnega cikla .

5.1.3 Prednosti in slabosti pretočne citometrije za spremljanje bioprocsov

Pomembna prednost pretočne citometrije je, da je analiza vzorca hitra in da aparatura omogoča analizo zelo velikega števila celic v vzorcu, kar zagotavlja objektivnejše rezultate. Poleg tega metode pretočne citometrije omogočajo, da lahko dokaj hitro dobimo več informacij o različnih karakteristikah (viabilnost, apoptoza, celični cikel in produktivnost) celic v vzorcu. Za analizo s pretočnim citometrom je zelo pomembno, kako pripravimo celične vzorce, saj je rezultat meritev v veliki meri odvisen od natančnosti pri pripravi vzorcev. Težavnost in zamudnost priprave vzorcev za analizo s pretočnim citometrom je odvisna od uporabljene metode. Priprava vzorcev za večino metod, ki smo jih uporabili je bila enostavna in hitra. Zelo pomembna prednost pretočne citometrije v primerjavi z mikroskopom je, da je rezultat meritve manj odvisen od izvajalca.

V primerjavi z alternativnimi metodami je pretočna citometrija hitrejša, zagotavlja objektivnejše rezultate, sodi med občutljivejše metode in s svojimi metodami ponuja veliko možnosti za različne analize celičnih karakteristik (Darzynkiewicz in sod., 1997).

Pretočna citometrija ima tudi nekatere slabosti. Predvsem se pojavlja problem ločevanja celic od celičnega debrija. Na FSC/SSC točkovnem diagramu smo želeli izločiti celični debri in velikokrat (še zlasti pri vzorcih iz bioreaktorjev) nismo dobili jasne meje med celicami in celičnim debrijem (sliki 5 in 6). To smo delno rešili tako, da smo za vse vzorce za isto metodo vedno uporabljali ista vrata analize. Problem v pretočni citometriji predstavljajo tudi celični skupki, saj jih detektor zazna kot en dogodek (eno celico) in lahko dobimo zavajajoče rezultate. Vzorce je priporočljivo pred analizo s pretočnim citometrom na hitro pregledati s svetlobnim mikroskopom, da ocenimo prisotnost celičnih skupkov, ki se jih lahko znebimo s filtracijo skozi posebne filtre. Pod mikroskopom se celični debri jasno razlikuje od celice in celični skupek se takoj prepozna kot več celic. Tretja slabost pretočne citometrije je bolj praktične narave: aparatura zahteva dokaj zamudno čiščenje in se včasih ne izplača analizirati le en vzorec, če obstajajo tudi druge metode za analizo vzorca. Meritev enega vzorca vzame npr. le 15 sekund, čiščenje aparature pa traja lahko tudi 40 minut. Praktičnost pretočne citometrije tako pride do izraza pri analizi velikega števila vzorcev.

5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo:

- Pretočna citometrija s svojimi metodami omogoča boljšo karakterizacijo celic CHO celic v bioprocseh, kot klasična metoda svetlobne mikroskopije, saj s pretočno citometrijo, poleg celične viabilnosti, lahko uspešno določamo tudi delež apoptotičnih celic in deleže celic v posameznih fazah celičnega cikla. Za dober bioproces je pomembno pridobiti čimveč informacij o karakteristikah delovnega organizma, da lahko potem z vodenjem bioprocasa izboljšamo stanje in posledično tudi produktivnost delovnega organizma.
- Metoda AV/PI se je zaradi svoje praktičnosti izkazala kot primerna metoda za spremljanje deleža apoptoze v bioreaktorju.
- Metoda TUNEL se je zaradi težavne in dolgotrajne obdelave vzorcev izkazala, kot neprimerna za spremljanje bioprocsov.
- Metoda TO/PI je primerna metoda za določanje celične viabilnosti, ki pa je nismo uporabili za spremljanje bioprocasa, saj smo celično viabilnost določili z metodo AV/PI.
- Analiza celičnega cikla je pokazala, da se ob dodajanju svežega gojišča poveča odstotek celic v S ali G2/M fazah celičnega cikla.
- Z metodo AV/PI in analizo celičnega cikla smo uspešno spremljali dva bioprocasa in s tem dokazali uporabnost in primernost obeh metod v praksi.

6 POVZETEK

Pretočna citometrija je tehnika, ki s svojimi metodami omogoča analizo biokemijskih in morfoloških celičnih karakteristik. V prvem delu naloge smo izbrali metode, ki so ustrezale našim kriterijem in se izkazale kot primerne za spremljanje bioprocsov. V bioreaktorskih vzorcih smo želeli določiti delež apoptoze, delež celic v posameznih fazah celičnega cikla in celično viabilnost. Za določanje deleža apoptoze smo izbirali med metodama AV/PI in TUNEL. Za določanje celične viabilnosti smo izbirali med metodama TO/PI in AV/PI in rezultate skušali primerjati z rezultati, dobljenimi s klasično metodo za določanje celične viabilnosti, ki vključuje uporabo svetlobnega mikroskopa in barvila tripan modro. Za spremljanje karakteristik celic CHO smo izbrali metodo AV/PI in metodo za analizo celičnega cikla. Z izbranimi metodami pretočne citometrije smo spremljali dva bioprocesa. Pretočna citometrija se je s svojimi metodami izkazala kot primerna za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprocseh.

7 VIRI

Al-Rubeai M., Welzenbach K., Lloyd D. R., Emery A. N. 1997. A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. *Cytotechnology*, 24: 161-168.

APO-BRDU™ KIT. Product information. 2005. San Jose, BD Biosciences: 6 str.

<http://www.bdbiosciences.com>

BD Cell Viability Kit. Product information. 2002. San Jose, BD Biosciences: 4 str.

<http://www.bdbiosciences.com>

Bierau H., Perani A., Al-Rubeai M., Emery A. N. 1998. A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with Hybridomas modified for inhibited apoptotic response. *Journal of Biotechnology*, 62: 195-207.

Blom W.M. 2000. Cell death in rat hepatocytes. Apoptosis-inducing and-protective mechanisms. Amsterdam, Center for Drug Research. (2002)

<http://www.imm.ki.se/sft/> (januar 2006): 2 str.

Boer L., Gray P. P., Sunstrom N. A. 2004. Enhanced productivity of G1 phase Chinese hamster ovary cells using GADD153 promoter. *Biotechnology Letters*, 26: 61-65.

Brown M., Wittwer C. 2000. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46, 8(B): 1221-1229.

Cell cycle. 2005. Morris, University of Minnesota Morris. (2005)

<http://www.morris.umn.edu/~gouchv/CellBio/lectures/cytokinesis/cytokinesis.html> (januar 2006): 13 str.

Cooper G. M. 2000. The cell: a molecular approach. 2nd ed. Washington DC, ASM Press: 571-607.

Core techniques. 1998. V: Cell & tissue culture: laboratory procedures. Vol. 1. Doyle A., Griffiths J. B., Newell D. G. (eds.). New York, John Wiley and Sons: 4.1.

Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry, 27: 1-20.

Freshney R. L. 2000. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4th ed. New York, Wiley-Liss: 577 str.

Givan A. L. 2001. Flow cytometry: First principles. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons: 273 str.

Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 7-18.

Ishaque A., Al-Rubeai M. 1998. Use of intracellular pH and annexin-V flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by *bcl-2* over-expression in hybridoma cell culture. Journal of Immunological Methods, 221: 43-57.

Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škobrne M., Wraber B. 2001. Imunologija. Priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-17.

Leelavatcharamas V., Emery A. N., Al-Rubeai M. 1996. Monitoring the proliferative capacity of cultured animal cells by cell cycle analysis. V: Flow cytometry applications in cell culture. Al-Rubeai M., Emery A. N. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 1-15.

Leelavatcharamas V., Emery A. N., Al-Rubeai M. 1999. Use of cell cycle analysis to characterise growth and interferon- γ production in perfusion culture of CHO cells. Cytotechnology, 30: 59-69.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 243-381.

Milner A. E., Wang H., Gregory C. D. 1996. Analysis of apoptosis by flow cytometry. V: Flow cytometry applications in cell culture. Al-Rubeai M., Emery A. N. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 193-209.

Nelson D. L., Cox M. M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 1119-1150.

Ormerod M. G. 2000. Analysis of DNA-general methods. V: Flow cytometry. 3rd ed. Ormerold M. G. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 83-96.

Overbeeke R., Steffens-Nakken H., Vermes I., Reutelingsperger C., Haanen C. 1998. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis, 3: 115-121.

Ozturk S. S. 1996. Engineering challenges in high density cell culture systems. Cytotechnology, 22: 3-16.

Pavko A. 1996. Masne bilance in načini vodenja bioprocsov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 425-428.

Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A. 1958. Genetic of somatic mammalian cells. Journal of Experimental Medicine, 108: 945-56.

Shapiro H., M. 2003. Practical flow cytometry. 4th ed. New York, John Wiley and Sons: 681 str.

Singh R. P., Al-Rubeai M., Gregory C. D., Emery A. N. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. Biotechnology and Bioengineering, 44: 720-726.

Veranič P., Pšeničnik M., Romih R., Sterle M., Kralj M. 2000. Osnove celične biologije z navodili za vaje. 4. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 53-58.

Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #2. Product information. 2001. Carlsbad, Molecular Probes: 3 str.

<http://www.probes.com>

Wurm F. M. 1999. Chinese hamster ovary cells, Recombinant protein production. V: Encyclopedia of bioprocess technology. Vol. 1. Fermentation, biocatalysis and bioseparation. Flickinger M. C., Drew S. W. (eds.). New York, John Wiley and Sons: 570-580.

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Mojci Narat za vse nasvete, kritike in pregled diplomskega dela.

Hvala recenzentu prof. dr. Alojzu Ihanu za pregled diplomskega dela.

Hvala podjetju Lek d.d., ki mi je omogočilo izvedbo diplomskega dela in celotni ekipi Razvoja rekombinantnih učinkovin za vso moralno podporo.

Hvala Igorju Dabižljeviču, Sandiju Seljaku in Milanu Bijelacu za vzorce iz bioreaktorjev.

Še posebej hvala moji somentorici dr. Ani Schweiger za vso strokovno pomoč tekom laboratorijskega dela in za nasvete pri pisanju diplomskega dela.

HVALA.

Priloga A: Rezultati spremljanja celične apoptoze in viabilnosti v prvem bioprocusu

Čas (dnevi)	Celokupna koncentracija celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Koncentracija živih celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Tripan modro neg. celice (%)	AV/PI neg. celice (%)	AV poz. in PI neg. celice (%)	AV in PI poz. Celice (%)	Pretok Perfuzije (V/dan)
1	0,46	0,39	84	75	18	7	0
2	0,48	0,40	83	64	21	15	0
3	0,74	0,63	86	66	18	16	0
4	0,83	0,70	85	67	16	17	0
5	1,01	0,85	84	69	16	15	0
6	0,75	0,32	86	61	21	18	0,173
7	0,71	0,60	86	58	27	15	0,173
8	0,52	0,42	82	63	23	14	0,173
9	0,52	0,45	86	64	21	15	0,173
10	0,52	0,44	85	64	25	11	0,173
11	0,53	0,44	84	62	25	13	0,00
12	0,70	0,57	81	61	25	14	0,00
13	0,80	0,66	83	62	29	9	0,00
14	0,34	0,27	78	29	46	25	0,00
15	0,45	0,37	83	56	24	20	0
16	0,66	0,57	87	67	20	13	0
17	0,80	0,69	86	64	16	20	0
18	0,74	0,66	88	68	17	15	0,115
19	0,96	0,88	92	73	15	12	0,23
20	0,95	0,85	90	73	14	13	0,46
21	1,21	1,07	88	65	19	16	0,92
22	1,06	0,94	89	61	16	23	0,92
23	1,07	0,94	88	/	/	/	0,92
24	0,98	0,79	80	67	22	11	0,69
25	1,73	1,50	87	64	18	18	0
26	1,76	1,50	85	71	17	12	0,49
27	1,72	1,46	85	72	21	7	0,74
28	1,55	1,21	78	68	20	12	0,49
29	2,16	1,80	83	58	27	15	1
30	2,15	1,83	86	62	19	19	1
31	2,51	2,17	87	62	16	22	1
32	3,45	3,00	87	48	22	30	1,5
33	3,27	2,78	85	61	15	24	1,5
34	3,93	3,30	84	59	17	24	2,6
35	4,99	4,26	85	50	15	35	2,6
36	5,00	4,22	84	49	14	37	4
37	6,5	5,39	83	52	16	32	4
38	7,49	6,26	84	64	17	19	4
39	8,57	6,88	80	42	21	37	4
40	9,18	7,50	82	51	19	30	4
41	11,03	8,97	81	61	20	19	4
42	10,34	7,63	74	43	34	23	4
43	10,95	7,82	71	55	25	20	4
44	12,66	8,98	71	51	29	20	4

Priloga B: Analiza celičnega cikla v prvem bioprocusu

Čas (dnevi)	Celokupna koncentracija celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Koncentracija živih celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Tripán modro neg. celice (%)	Celice v G1 fazi (%)	Celice v S fazi (%)	Celice v G2/M fazi (%)	Pretok Perfuzije (V/dan)
1	0,46	0,39	84	56	21	23	0
2	0,48	0,4	83	53	26	21	0
3	0,74	0,63	86	52	37	11	0
4	0,83	0,7	85	47	43	10	0
5	1,01	0,85	84	41	38	21	0
6	0,75	0,32	86	48	33	19	0,173
7	0,71	0,6	86	51	32	17	0,173
8	0,52	0,42	82	50	26	24	0,173
9	0,52	0,45	86	36	40	24	0,173
10	0,52	0,44	85	48	21	31	0,173
11	0,53	0,44	84	47	30	23	0,00
12	0,7	0,57	81	46	38	16	0,00
13	0,8	0,66	83	43	40	17	0,00
14	0,34	0,27	78	46	38	16	0,00
15	0,45	0,37	83	50	37	13	0
16	0,66	0,57	87	48	40	12	0
17	0,8	0,69	86	46	48	6	0
18	0,74	0,66	88	43	42	15	0,115
19	0,96	0,88	92	51	32	17	0,23
20	0,95	0,85	90	46	35	19	0,46
21	1,21	1,07	88	50	37	13	0,92
22	1,06	0,94	89	48	28	24	0,92
23	1,07	0,94	88	41	37	22	0,92
24	0,98	0,79	80	50	32	18	0,69
25	1,73	1,5	87	34	42	24	0
26	1,76	1,5	85	38	49	13	0,49
27	1,72	1,46	85	52	31	17	0,74
28	1,55	1,21	78	45	22	33	0,49
29	2,16	1,8	83	39	27	34	1
30	2,15	1,83	86	38	34	28	1
31	2,51	2,17	87	35	30	35	1
32	3,45	3	87	47	16	37	1,5
33	3,27	2,78	85	35	34	31	1,5
34	3,93	3,3	84	42	22	36	2,6
35	4,99	4,26	85	36	32	32	2,6
36	5	4,22	84	35	31	34	4
37	6,5	5,39	83	35	34	31	4
38	7,49	6,26	84	36	29	35	4
39	8,57	6,88	80	29	36	35	4
40	9,18	7,5	82	25	26	49	4
41	11,03	8,97	81	21	46	33	4
42	10,34	7,63	74	19	34	47	4
43	10,95	7,82	71	33	30	37	4
44	12,66	8,98	71	29	41	30	4

Priloga C: Rezultati spremljanja celične apoptoze in viabilnosti v drugem bioprocusu

Čas (dnevi)	Celokupna koncentracija celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Koncentracija živih celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Tripan modro neg. celice (%)	AV/PI neg. celice (%)	AV poz. in PI neg. celice (%)	AV in PI poz. Celice (%)	Pretok Perfuzije (V/dan)
1	0,49	0,4	82	/	/	/	0
2	0,6	0,49	81	/	/	/	0
3	0,63	0,53	84	/	/	/	0
4	0,92	0,78	84	/	/	/	0
5	1	0,92	87	/	/	/	0
6	0,91	0,75	82	/	/	/	0,144
7	0,95	0,77	81	/	/	/	0,144
8	0,95	0,71	75	/	/	/	0,144
9	0,81	0,66	81	/	/	/	0,288
10	1,3	1,1	86	/	/	/	0,288
11	1,08	0,86	79	/	/	/	0,432
12	1,15	0,93	81	/	/	/	0,288
13	1,36	1,12	83	/	/	/	0,288
14	1,95	1,65	85	/	/	/	0,288
15	1,92	1,62	85	71	20	9	0,288
16	2,19	1,94	89	73	17	10	0,5
17	2,23	1,92	87	63	20	17	0,5
18	3,02	2,57	85	60	19	21	0,5
19	3,06	2,58	84	70	16	14	0,5
20	3,88	3,22	83	68	22	10	0,5
21	3,91	3,3	85	63	19	17	0,5
22	3,16	2,57	81	57	24	19	1
23	4,1	3,18	78	54	27	19	1
24	5,58	4,39	79	53	27	20	1
25	6,84	5,47	80	44	33	23	1
26	8,3	6,53	79	46	32	22	1
27	9,31	7,19	77	39	43	18	1,5
28	8,11	6,23	77	29	40	31	1,5
29	10,25	7,31	71	32	48	20	2,16
30	13,66	10,47	77	19	49	32	2,16
31	12,5	9,16	73	17	52	31	2,16

Priloga D: Analiza celičnega cikla v drugem bioprocusu

Čas (dnevi)	Celokupna koncentracija celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Koncentracija živih celic ($\times 10^6$ celic/ml)	Tripan modro neg. celice (%)	Celice v G1 fazi (%)	Celice v S fazi (%)	Celice v G2/M fazi (%)	Pretok Perfuzije (V/dan)
1	0,49	0,4	82	/	/	/	0
2	0,6	0,49	81	/	/	/	0
3	0,63	0,53	84	/	/	/	0
4	0,92	0,78	84	/	/	/	0
5	1	0,92	87	/	/	/	0
6	0,91	0,75	82	/	/	/	0,144
7	0,95	0,77	81	/	/	/	0,144
8	0,95	0,71	75	/	/	/	0,144
9	0,81	0,66	81	/	/	/	0,288
10	1,3	1,1	86	/	/	/	0,288
11	1,08	0,86	79	/	/	/	0,432
12	1,15	0,93	81	/	/	/	0,288
13	1,36	1,12	83	/	/	/	0,288
14	1,95	1,65	85	/	/	/	0,288
15	1,92	1,62	85	46	41	13	0,288
16	2,19	1,94	89	39	43	18	0,5
17	2,23	1,92	87	45	36	19	0,5
18	3,02	2,57	85	45	40	15	0,5
19	3,06	2,58	84	49	36	15	0,5
20	3,88	3,22	83	54	32	14	0,5
21	3,91	3,3	85	49	35	16	0,5
22	3,16	2,57	81	48	46	6	1
23	4,1	3,18	78	49	31	20	1
24	5,58	4,39	79	58	32	10	1
25	6,84	5,47	80	56	37	7	1
26	8,3	6,53	79	50	41	9	1
27	9,31	7,19	77	46	43	11	1,5
28	8,11	6,23	77	50	43	7	1,5
29	10,25	7,31	71	43	45	12	2,16
30	13,66	10,47	77	53	32	15	2,16
31	12,5	9,16	73	46	45	9	2,16

Priloga E: Primer izračuna celične koncentracije in viabilnosti dobljene z direktnim štejetjem s svetlobnim mikroskopom s pomočjo barvila tripan modro.

Število živih celic = 300

Število celokupnih celic = 350

Vzorca nismo redčili, zato je R enako 1.

Koncentracija živih celic = število živih celic \times 2 \times R / volumen tekočine nad števnim kvadratom = $300 \text{ celic} \times 2 \times 1 / 0,0009 \text{ ml} = 6,7 \times 10^5 \text{ celic/ml}$

Celokupna koncentracija celic = število celokupnih celic \times redčitev vzorca / volumen tekočine nad števnim kvadratom = $350 \text{ celic} \times 2 / 0,0009 \text{ ml} = 7,8 \times 10^5 \text{ celic/ml}$

Odstotek živih celic = število živih celic / število celokupnih celic = $300 \text{ celic} / 350 \text{ celic} = 86 \%$