

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KOSMATIN
MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KOSMATIN

**LOČEVANJE KRVNIH CELIC S KONVEKTIVNIMI
POROZNIMI NOSILCI**

**SEPERATION OF BLOOD CELLS ON CONVECTIVE
POROUS LAYERS**

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (Oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij) pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. in na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo pod somentorstvom izr. prof. dr. Aleša Podgornika.

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. za strokovno pomoč, vodenje, hitro odzivnost in nasvete pri nastajanju magistrske naloge. Zahvaljujem se vsem zaposlenim v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, ki so mi namenili čas za uvajanje in spoznavanje laboratorija, tako da sem lahko samostojno opravila eksperimentalni del. Obenem se zahvaljujem somentorju izr. prof. dr. Alešu Podgorniku in zaposlenim na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo za posredovane porozne nosilce in za prijazno pomoč pri izvajanju nekaterih preiskav. Posebna zahvala gre mojim najbližnjim, ki so me spodbujali in stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Aleša Podgornika.

Podpis:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Član komisije: doc. dr. Urša Pečar Fonović

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 KRVNE CELICE	1
1.2 ANTIGENI CD	3
1.3 LOČEVANJE CELIC	4
1.3.1 Fizikalno-kemijske metode.....	5
1.3.1.1 Afereza.....	5
1.3.1.2 Centrifugiranje z gostotnim gradientom.....	5
1.3.1.3 Membranska filtracija.....	5
1.3.1.4 Celična adhezija.....	6
1.3.2 Neoznačene metode.....	6
1.3.2.1 Frakcioniranje v tokovnem polju- FFF (angl. Field Flow Fractionation)	6
1.3.2.2 Dielektroforeza	6
1.3.3 Afinitetne metode	7
1.3.2.1 Pretočna citometrija.....	7
1.3.2.2 Magnetno pogojeno ločevanje celic	7
1.3.2.3 Dvofazni vodni sistem - ATPS (Aqueous Two-Phase System)	8
1.3.2.4 Afinitetna kromatografija	8
1.4 Monolitni nosilci pri afinitetni kromatografiji	9
1.4.1 Vrste monolitnih nosilcev.....	10
1.4.1.1 Kriogel	10
1.4.1.2 Metakrilatni monolit.....	10
1.4.2 Uporaba monolitnih nosilcev.....	11

2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 Venska kri odvzeta v epruveto z antikoagulantom K ₃ EDTA.....	14
3.2 Priprava redčenih vzorcev krvi.....	14
3.3 Priprava krvnega lizata	14
3.3.1 Priprava raztopine.....	14
3.4 Konvektivni porozni nosilci	15
3.4.1 Priprava konvektivnih poroznih nosilcev z imobiliziranimi protitelesi	15
3.4.1.1 Preverjanje čistosti diskov z imobiliziranimi protitelesi s spektrofotometrom	15
3.5 Priprava preparatov za mikroskopiranje s centrifugo Cytospin 4	16
3.5.1 Priprava raztopin za barvanje preparatov	17
3.6 Analiza na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000	17
3.7 Analiza na pretočnem citometru Cytomics FC 500	17
3.8 Postopek barvanja levkocitov za štetje v Neubauerjevi komori.....	18
3.9 Mikroskopija.....	19
3.9.1 Svetlobna mikroskopija	19
3.9.3 Fluorescenčna mikroskopija	19
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1 Določanje vezave krvnih celic s pomočjo hematološkega analizatorja	22
4.1.1 Meritev v polni krvi in v redčenem vzorcu krvi	22
4.1.2 Meritev v krvnem lizatu in primerjava s pretočno citometrijo	24
4.2 Nespecifična vezava levkocitov na epoksidne diske	27
4.2.1 Vpliv kemijske modifikacije monolita	28
4.2.2 Vpliv polimernega obročka	28
4.2.3 Vpliv premešavanja in sestave pufra	31
4.3 Poskus vezave levkocitov na protitelesa vezana na monolitne nosilce	36
4.3.1. Vezava na diske z vezanimi protitelesi proti antigenu CD13.....	36

4.3.2 Poskus vezave levkocitov na protitelesa proti antigenu CD20.....	37
4.4 Dokazovanje vezanih celic na površino monolita z vezanimi protitelesi.....	39
4.5 Dokaz vezanih celic s fluorescenčno mikroskopijo	41
5. SKLEPI.....	44
6. LITERATURA	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Mali in veliki epoksidni disk izdelana iz metakrilata.....	11
Slika 2: Spektrofotometer NanoDropOne	16
Slika 3: A) Citocentrifuga Cytospin4. B) Priprava preparatov	17
Slika 4: A) Pretočni citometer Navios. B) Hematološki analizator Sysmex XN-1000.....	18
Slika 5: A) Preparata lizata s polimernimi delci po inkubaciji MD. B) Polimerni delci....	26
Slika 6: Določitev viabilnosti levkocitov s pretočno citometrijo po inkubaciji MD.....	26
Slika 7: Koncentracija levkocitov v lizatu po inkubaciji različnih diskov za 2 min.....	28
Slika 8: Časovna odvisnost koncentracije levkocitov v lizatu po inkubaciji monolitov brez polimernega obročka	30
Slika 9: Koncentracija levkocitov v spiralnem pufru PBS	30
Slika 10: Pregled levkocitov pod 400-kratno povečavo: A) slepa proba, B) lizatu po inkubaciji z monolitom.....	32
Slika 11: Primerjava koncentracije levkocitov v homogenem lizatu	33
Slika 12: Primerjava koncentracije levkocitov v stekleni in plastični epruveti ter primerjava dveh različnih lizatov brez in z dodatkom FBS.....	34
Slika 13: Primerjava konc. levkocitov v lizatu2 s PBS+FBS po inkubaciji diskov	35
Slika 14: Pregled diska z optičnim mikroskopom: A) površina diska, B) rob diska.....	40
Slika 15: Pregled diska brez protiteles pod fluorescenčni mikroskop: A) 100-kratna povečava, B) 200-kratna povečava.....	42
Slika 16: Pregled 1×E-CD20 diska pod fluorescenčni mikroskop:	42
Slika 17 : Pregled 1×E-CD20 diska po filtraciji z injekcijsko brizgo: A) 100-kratna povečava neimobilizirane strani, B) 200-kratna povečava neimobilizirane strani	42

KAZALO TABEL

Tabela 1: Referenčne vrednosti za parametre krvne slike za odrasle (3)	2
Tabela 2: Nekateri antigeni značilni za levkocite.....	3
Tabela 3: Absorbanca in koncentracija protiteles v spiralnem pufu PBS	15
Tabela 4: Seznam uporabljenih reagentov.....	20
Tabela 5: Pregled uporabljenih aparatur.....	21
Tabela 6: Koncentracije krvnih celic v raztopinah pred in po inkubaciji z diskami E.....	22
Tabela 7: Podatki o velikosti diskov in celic	23
Tabela 8: Teoretična vezava celic	23
Tabela 9: Koncentracije krvnih celic v raztopinah RVK pred in po inkubaciji z diskami E ter izračun vezave levkocitov	24
Tabela 10: Koncentracije krvnih celic v raztopinah pred in po inkubaciji z diskami E izmerjene s hematološkim analizatorjem in pretočnim citometrom.....	25
Tabela 11: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu in PBS pufu po inkubaciji MD E in VD E.....	27
Tabela 12: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu in PBS pufu po inkubaciji E in OH diska ter polimernega obročka.....	29
Tabela 13: Zmanjšanje števila levkocitov pri uporabi slepe probe	31
Tabela 14: Vpliv intenzivnega stresanja pred izvedbo meritev.....	32
Tabela 15: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu1 in lizatu2 s PBS+FBS	35
Tabela 16: Določanje levkocitov pri poskusu z malim epoksidnim diskom z vezanimi protitelesi proti CD13	36
Tabela 17: Določanje levkocitov pri poskusu z velikim epoksidnim diskom z vezanimi protitelesi proti CD13	37
Tabela 18: Začetna levkocitna krvna slika B-KLL in negativne kontrole	38
Tabela 19: Določanje levkocitov pri poskusu z epoksidnim diskom z vezanimi protitelesi proti CD20	38
Tabela 20: Določanje levkocitov pri poskusu z epoksidnimi diskami z vezanimi protitelesi ..	39
Tabela 21: Primer štetja levkocitov v Neubauerjevi komori in primerjava s koncentracijo levkocitov izmerjene s hematološkim analizatorjem.....	41

POVZETEK

Ločevanje celic je uporabno orodje, ki je danes razširjeno v bioloških in biomedicinskih raziskavah ter ključno za celično terapijo. Kljub napredkom ostajajo še vedno velike ovire pri izolaciji posamezne vrste celic iz heterogene populacije. V magistrski nalogi smo poskušali razviti postopek izolacije krvnih celic na konvektivnih poroznih nosilcih. Osnovna ideja naloge je vezava celic na površino konvektivnih poroznih nosilcev s predhodno vezanimi specifičnimi protitelesi in nato spiranje celic s tokom pufra skozi porozni sloj. Naloga je razdeljena na dva dela. V prvem delu smo testirali nespecifično vezavo na različne porozne nosilce brez protiteles, pri čemer smo se soočili s številnimi tehničnimi težavami, ki so del razvoja metode. Nadalje smo ugotavliali, ali se celice specifično vežejo na predhodno imobilizirana protiteesa na nosilcih in ali jih s spiranjem uspemo odstraniti.

Poskus smo pričeli s pripravo začetnega biološkega vzorca. S hematološkim analizatorjem smo merili spremembo v koncentraciji levkocitov po inkubaciji diskov v krvnem lizatu, rezultate smo uspešno primerjali z rezultati pretočne citometrije. Med inkubacijo diskov v lizatu nas je zanimala časovna odvisnost nespecifične vezave celic na različne nosilce s kemijskimi modifikacijami, vezava celic na polimerni obroč, citotoksičnost diskov in vpliv materialov, ki smo jih uporabili. Homogenost lizata smo zagotovili z vorteksiranjem in dodatkom FBS, ki prepreči agregacijo celic. V prvem sklopu poskusov smo želeli preveriti, če se celice nespecifično absorbirajo na disk, saj je po vsaki inkubaciji diska v krvnem lizatu začetna koncentracija levkocitov močno padla. Z uvedbo slepe probe smo nespecifične interakcije izključili.

V drugem sklopu poskusov smo uporabili modificirane diske s protitelesi, katere smo po inkubaciji v lizatu in spiranju v PBS, vstavili v nosilec, ki smo ga priključili na črpalko in zatem lovili filtrate. S hematološkim analizatorjem smo določili zelo nizke koncentracije levkocitov v zbranem filtratu, prav tako celic nismo našli v preparatih, pripravljenih s citocentrifugo. Iz tega smo sklepali, da se celice z diskov ne spirajo in ostanejo vezane nanje. Celice, vezane na diskih, smo poskusili opazovati s svetlobno mikroskopijo. Ta ni bila primerna za dokaz vezanih celic, tudi če smo celice pred tem obarvali. S fluorescenčno mikroskopijo pa smo lahko prepoznali in dokazali celice na površini diska. Tako smo potrdili specifično vezavo celic na diske z imobiliziranimi protitelesi in ugotovili, da celic z njih nismo uspeli sprati.

Ključne besede: ločevanje krvnih celic, konvektivni porozni nosilci, krvni lizat, hematološki analizator, mikroskopija

ABSTRACT

Separation of blood cells is a useful tool, which is now widely used in biological and biomedical research and is important for cell therapy. Furthermore, there are still major barriers to isolating a particular type of cell from a heterogeneous population. In our research, we tried to develop a process of isolating blood cells on convective porous layers. The basic idea of our work is to adsorb cells to the surface on convective porous layers with previously bound specific antibodies and then washing the cells with the buffer stream through the porous layer. The experiment was divided into two parts. Firstly, a non-specific binding to various porous layers without antibodies was tested where we were faced with a number of technical problems inherent to the method development. Secondly, it was being determined whether the cells specifically bind to previously immobilized antibodies on the layers and whether they could be removed by washing.

The experiment started with the preparation of an initial biological sample. The change in the leukocyte concentration was measured with the hematology analyzer after incubation of the monoliths in the blood lysate with the results successfully compared with flow cytometry. The point of interest during the incubation of discs in the lysate was the time dependence of the non-specific cell binding to various carriers of chemical modifications, the binding of cells to the polymer ring, the cytotoxicity of the discs and the influence of the materials used. The homogeneity of the lysate was assured by vortexing and the addition of FBS to prevent cell aggregation. The first set of experiments was intended to verify if the cells were absorbed non-specifically on the disc, since the initial concentration of leukocytes dropped significantly after each incubation of the disc in the blood lysate. By introducing a blank test, eliminated non-specific interactions were eliminated.

In the second set of experiments, modified discs with antibodies incubated in the lysate and washing in PBS were inserted into a plastic holder that attached to the pump and subsequently filtered. Very low levels of leukocytes in the collected filtrate were determined with the hematology analyzer. Cells were not found in the sample prepared with cytocentrifuge. Consequently, it was concluded the cells from the discs are not washed up and are still attached to the discs. We attempted to observe the bound cells on discs with light microscopy which was not suitable for the evidence of bound cells, even if cells were previously colored. With fluorescence microscopy, however, we could recognize and prove cells on the surface of the disc. We have thus confirmed the specific binding of cells to immobilized discs and found that the cells were not removed from them.

Key words: blood cell separation, convective porous layers, blood lysate, hematology analyzer, microscopy

SEZNAM OKRAJŠAV

- 7AAD - 7-amino-aktinomicin D (*angl. 7-amino-actinomycin D*)
ATPS - dvofazni vodni sistem (*angl. aqueous Two-Phase System*)
CD - označevalec pripadnosti (*angl. clusters of differentiation*)
CIM - konvektivni nosilci (*angl. convective interaction media*)
DAPI - 4,6 diamino-2-fenilindol (*angl. 4,6-diamino-2-phenyl-indole*)
DEAE - dietilaminoetil
EDTA - etilendiamintetraocetna kislina
FACS - ločevanje celic s pretočno citometrijo (*angl. fluorescence-activated cell sorting*)
FBS - fetalni goveji serum (*angl. fetal bovine serum*)
FFF - frakcioniranje v tokovnem polju (*angl. Field Flow Fractionation*)
KLL - kronična limfocitna levkemija
MACS - magnetno pogojeno ločevanje celic (*angl. Magnetic-activated cell sorting*)
PBS - fosfatno pufrana slanica
QA - kvarterni amin
rpm - število obratov centrifuge na minuto
SMC - kratke monolitne kolone (*angl. Short monolithic column*)
VLP - virusom podobni delci (*angl. Virus-Like particle*)

1. UVOD

1.1 KRVNE CELICE

Rdeče krvne celice z drugo besedo imenujemo **eritrociti**. So bikokavne oblike brez jedra, velike od 7 do 8 μm . Njihova glavna komponenta je hemoglobin, ki je prenašalec kisika. Nastajajo v rdečem kostnem mozgu v procesu eritropoeze, kjer pri sprostivti v krvni obtok izgubijo jedro.

Krvne celice bele vrste skupno imenujemo **levkociti**. Sestavljeni so iz jedra in citoplazme. Poznamo tri podvrste levkocitov, ki se ločijo po morfoloških lastnostih in funkciji v telesu. To so granulociti, monociti in limfociti.

Granulociti so levkociti, ki so dobili naziv po značilnih granulacijah. Granulocite delimo v tri vrste, ki jih ločimo glede na vrsto zrnc. To so nevtrofilni granulociti ali nevtrofilci, eozinofilni granulociti ali eozinofilci in bazofilni granulociti ali bazofilci. Vsi granulociti nastanejo z dozorevanjem matičnih celic v kostnem mozgu.

Nevtrofilci so veliki od 12 do 15 μm . Imajo jedro, ki je razdeljeno na dva do pet segmentov, ki so med seboj povezani s tanko nitko. V tkivih, predvsem v sluznicah, nevtrofilci fagocitirajo bakterije in druge mikrobe. **Eozinofilci** merijo od 12 do 17 μm . Njihovo jedro ima običajno le dva segmenta. Citoplazma eozinofilcov je polna oranžnih zrnc. Tudi eozinofilci lahko fagocitirajo bakterije, poleg tega pa tudi imunske komplekse. Predvsem je pomembna njihova vloga pri zgodnji občutljivosti in obrambi organizma pred paraziti. **Bazofilci** so najmanjši granulociti. Njihovo jedro je iz dveh segmentov, ki ga prekrivajo debela, groba temno vijoličasta zrnca. Na membrano bazofilcev se lahko vežejo IgE, ki sodelujejo pri anafilaktični reakciji. Pri vnetju se med številnimi mediatorji iz zrnc sprosti histamin.

Prva celica pri **nastajanju granulocitne vrste** je mieloblast. V procesu dozorevanja se mieloblast preobrazi v promielocit. Iz promielocita nastane mielocit. Naslednja stopnja dozorevanja je metamielocit. Metamielocit dozori v paličasti granulocit, ki sodi že med zrele granulocite. Paličasti granulocit dozori do končne oblike, to je segmentirani granulocit ali segmentiranec. Granulocite vseh stopenj razvoja najdemo samo v kostnem mozgu. Pri odraslem zdravem človeku najdemo v krvi izključno segmentirane in redke paličaste granulocite (1).

Limfocite v krvi najdemo v dveh morfoloških oblikah. Mali limfocit je okroglo ali ovalne oblike, velik od 7 do 12 μm , ima okroglo jedro z ozkim robom svetlomodre citoplazme.

Velik limfocit meri od 9 do 15 μm , prav tako ima okroglo jedro ter obilno svetlomodro citoplazmo, ki lahko vsebuje posamezna azurofilna zrnca ter vakuole (2). Limfociti nastajajo v rdečem kostnem mozgu iz usmerjene matične celice, kjer limfociti B tudi dozorijo. Zorenje limfocitov T pa poteka v priželjcu. Ločimo limfocite T, limfocite B ter naravne celice ubijalke. Limfociti T sodelujejo v celični posredovani imunosti, kot tudi naravne celice ubijalke. Limfociti B so odgovorni za humorалno imunost, ki se vrši s proizvodnjo protiteles (1).

Monociti imajo ledvičasto ali podkvasto upognjeno jedro, lahko ima več segmentov. Citoplazma je velika in svetlo sivomodre barve. Vsebuje številna azurofilna zrnca in vakuole. Velikost malih monocitov je od 20 do 30 μm , velikih pa lahko tudi do 40 μm . Monociti se v krvi zadržijo le do 40 ur. Iz krvi prehajajo v tkiva, v tkivih se preobrazijo v makrofage - histiocite. Sodelujejo pri posredovanju antigena limfocitom T in imajo ključno vlogo pri imunski odzivnosti. Makrofage imenujemo različno - glede na njihovo mesto in videz. V pljučih so alveolarni makrofagi, v jetrih jim pravimo Kupfferjeve celice (1).

Trombociti ali krvne ploščice so celični fragmenti, ki jih vseeno štejemo med krvne celice. So manjši od eritrocitov, s premerom od 1,5 do 3 μm . Nastajajo v kostnem mozgu s fragmentacijo megakariocitov. V našem telesu krožijo v krvnem obtoku ter tako sodelujejo v procesu hemostaze, ki vodi do nastanka krvnih strdkov (1,2).

Tabela 1: Referenčne vrednosti za parametre krvne slike za odrasle (3)

Parameter	Referenčne vrednosti za moške/ženske
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4,50-5,50/3,80-4,80
Levkociti ($\times 10^9/\text{L}$)	4,00-10,00
Nevtrophili ($\times 10^9/\text{L}$)	1,50-7,40
Limfociti ($\times 10^9/\text{L}$)	1,10-3,50
Eozinofilci ($\times 10^9/\text{L}$)	0,02-0,67
Bazofilci ($\times 10^9/\text{L}$)	0,00-0,13
Monociti ($\times 10^9/\text{L}$)	0,21-0,92
Trombociti ($\times 10^9/\text{L}$)	150-410

1.2 ANTIGENI CD

Levkociti izražajo na svojih površinah makromolekule imenovane antigeni. Mnoge od teh površinskih makromolekul so dobro opredeljene z biokemijskega in genetskega vidika. Znana so njihova aminokislinska zaporedja in v grobem funkcijski pomen. Proti antigenom je mogoče izdelati monoklonska protitelesa, ki jih nato uporabljamo za določevanje celic oziroma levkocitov. Monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo za prikaz levkocitnih molekul so razvrščena po sistemu CD (*angl. Cluster od differentiation*). Vsako monoklonsko protitelo proti antigenom CD je določeno s številko. Znak + ali - označuje prisotnost ali odsotnost celičnega označevalca. Vsi antigeni niso specifični za posamezno vrsto levkocitov, zato uporabljamo kombinacijo monoklonskih protiteles za več antigenov. Celice se med dozorevanjem spreminjajo po velikosti in obliki, pri tem pridobivajo nove in izgubljajo stare antogene. Tako lahko z določanjem antigenov določimo tudi stopnjo razvoja celice (1,4,5).

Tabela 2: Nekateri antigeni značilni za levkocite:

Vrsta celice	Antigen CD
Levkociti	CD45+
Granulociti	CD45+, CD13+ , CD15+
Monociti	CD45+, CD14+
Limfocit T	CD45+, CD3+
T pomagalka	CD45+, CD3+, CD4+
T zaviralka	CD45+, CD3+, CD8+
Limfocit B	CD45+, CD19+, CD20+
Celica NK	CD45+, CD56+

Pri naših poskusih smo uporabili protitelo proti antigenu CD13, na katerega se vežejo granulociti in protitelo proti antigenu CD20 za limfocite B.

1.3 LOČEVANJE CELIC

Moderna zgodovina ločevanja celic sega v leto 1960, ko so bile ugotovljene prve fizikalno biokemične razlike med celicami. Ločevanje je temeljilo na gostoti in razpoložljivosti poznanih encimov (6). Prvo čiščenje celic na gostotnem gradientu s pomočjo fikola je bilo izvedeno leta 1968. Zatem se je začel razvoj številnih ločevalnih tehnik. Nekatere stare enostavne tehnike, katerih namen je obogatitev in izolacija celic pred ločevanjem, se še vedno uporabljajo (7).

Ločevanje celic je danes uporabno orodje, ki je razširjeno v bioloških in biomedicinskih raziskavah ter pri klinični terapiji. Uporaba se povečuje zlasti v tkivnem inženirstvu in regenerativnem zdravljenju, zasledimo jo tudi na drugih področjih, kot so biokemija, fizika, elektrotehnika. Trenutno najbolj pogosto uporabljeni tkivi pri izolaciji sta kri in kostni možeg. Izziv ločevanja celic je, da iz heterogene populacije celic izoliramo ali prepoznamo posamezno vrsto celic brez kontaminacije (8).

Ne glede na to za katero metodo gre, se jo vedno ovrednoti s tremi pojmi: **čistost, izkoristek in viabilnost**. Čistost se nanaša na obogatitev žejene tarčne celične populacije z zanimimi celičnimi lastnostmi, kot je celični površinski fenotip. Izkoristek je odstotek celic, ki jih izoliramo glede na število začetnih celic. Viabilnost pove, kako žive - kakovostne so celice po ločevanju. Čistost in viabilnost skupaj podata informacijo o učinkovitosti metode. Idealna tehnika prinaša tudi funkcionalnost, hitrost, ločljivost, enostavnost, dostopnost in nizko ceno. Pri načrtovanju metode v grobem opredelimo izhodiščni biološki material, zaporedne korake in namen izolacije. Težave, kot so agregacija celic, razpadle in mrtve celice, nespecifična vezava na protitelesa, nas spremljajo pri ločevanju celic in moramo biti nanje zelo pozorni (8).

Ločevalne tehnike razdelimo glede na naravo ločevanja v štiri skupine: **fizikalno-kemijske metode, afinitetne metode, neoznačene metode** in kombinirane metode (8). Razvijajo se predvsem afinitetne metode, kjer izkoriščajo nove ligande (aptamere in lektine) ter biofizikalne metodeh, kjer ni označevanja celic (9).

1.3.1 Fizikalno-kemijske metode

Ločitev temelji na fizikalnih in kemijskih lastnostih celic. Tehnike so enostavne za izvedbo, a imajo nizko kapaciteto resolucije. Uporabljamo jih lahko kot korak obogatitve celične vrste ali koncentriranje celic. Sem sodijo afereza, membranska filtracija, centrifugiranje z gostotnim gradientom in celična adhezija (9).

1.3.1.1 Afereza

Afereza je medicinski postopek, kjer iz krvi ločujemo posamezne komponente, ostanek pa враčamo darovalcu. Ločene komponente lahko враčamo darovalcu ali prejemniku. Ločevanje krvi poteka s pomočjo centrifugiranja. Metoda lahko vključuje filter ali kolono, s katero se ločijo plazma, komponente plazme, imonoglobulini ali izbrane celice. Za izolacijo levkocitov in trombocitov se uporablja spiranje s pufrom. Končni produkt se direktno aplicira prejemniku ali najprej zbira in nato intravensko injicira (10).

1.3.1.2 Centrifugiranje z gostotnim gradientom

Centrifugiranje z gostotnim gradientom je postopek z nizko ločljivostjo, ki vsebuje dva različna medija, ki se razlikujeta po gostoti. Po navadi gre za kombinacijo saharoze in polimera. Celice se dodajo na vrhu centrifugirke, zatem sledi centrifugiranje. Med centrifugiranjem se celice različno porazdelijo po gostotnem mediju. Celice z največjo gostoto se usedejo na dno epruvete, celice z manjšo gostoto se ustavijo nekje vmes. Komercialno dostopni polimerni mediji so: Percoll, Ficoll, Lymphoprep and dekstran (9). Tehnika se uporablja za obogatitev mononuklearnih celic iz kostnega mozga in kot začetni korak pred uporabo metode z visoko ločljivostjo npr. MACS in FACS (8).

1.3.1.3 Membranska filtracija

Membranska filtracija je alternativna fizikalna metoda za ločevanje celic, ki temelji na velikosti celic in membranskih por. Metoda je hitra, enostavna in cenovno ugodna. Največja pomajkljivost je zlepljenje celic, zaradi katere se izgubi veliko število celic. Izolacija celic CD34+ iz periferne krvi poteka s pomočjo poliuretanskih penastih membran, ki so modificirane s karboksilnimi skupinami in nato prekrite s Pluronic F127 ali hialuronsko kislino (9).

1.3.1.4 Celična adhezija

Tehnika je enostavna, cenovno ugodna, vendar nespecifična in dokaj zamudna. Po vezavi celic na plastično površino, se nevezane kontaminirajoče celice odstranijo z izmenjevalnim medijem (11). Tehnika se uporablja na začetni stopnji izolacije mezenhimskih matičnih celic iz kostnega mozga, popkovnične krvi ali maščobnega tkiva (12).

1.3.2 Neoznačene metode

Mehanizem ločevanja temelji na osnovi biofizikalnih lastnosti celic. Prednost neoznačenih metod je, da so cenovno bolj ugodne.

1.3.2.1 Frakcioniranje v tokovnem polju- FFF (angl. Field Flow Fractionation)

FFF je analitska metoda, kjer nežno ločevanje celic poteka skozi prazno kapilaro s kombinacijo laminarnega toka in polja, ki je pravokoten na tok. Celice v kapilari se porazdelijo na osnovi morfoloških in biofizikalnih lastnosti, kot so masa, velikost, gostota, oblika in togost. Pri tem se zbirajo različne frakcije. Princip je podoben kot pri kromatografiji, vendar tu ni stacionarne faze. Najenostavnejša oblika FFF je uporaba gravitacijskega polja. S pomočjo te metode so izolirali mezenhimske matične celice in krvotvorne progenitorske matične celice iz periferne krvi. Nediferencirane matične in progenitorske celice imajo bolj enostavno strukturo, zato se celice lahko ločijo na osnovi oblike in razmerja jedro-citoplazma (9).

1.3.2.2 Dielekstroforeza

Dielekstroforeza je druga možnost neoznačenih metod za identifikacijo in ločevanje celic. Sestavni deli metode so mikrokanali napoljeni s pufersko raztopino, v katero se injicira vzorec celične suspenzije. Po vzpostavitvi električnega polja se celice premikajo, ločijo ali ujamejo na mestu. Celični odziv je odvisen od polarizacije med suspendiranim medijem in notranjih dielektričnih lastnosti celične membrane, citoplazme in celične stene. Notranje dielektrične lastnosti celic opredelijo pojmi, kot so celična gostota, velikost, fiziologija in razvojna stopnja celice. Primer uporabe je obogatitev krvotvornih matičnih celic CD34+ iz kostnega mozga in periferne krvi (9).

1.3.3 Afinitetne metode

Način ločevanja temelji na interakciji med celičnimi površinskimi molekulami in komplementarnimi ligandi (monoklonska protitelesa, apatameri in lektini). Specifičnost in raznolikost protiteles omogočata ogromno možnosti za ločevanje celic. Selektivnost metode se doseže z uporabo protitelesa, vezanega s toksini ali fluorokromi, s pomočjo različnih trdnih nosilcev, kot so magnetni delci, kroglice in kolone. Pri tem imamo možnost pozitivne in negativne selekcije (13).

1.3.2.1 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija ali FACS (angl. fluorescence-activated cell sorting) je ena izmed najbolj uporabnih in učinkovitih tehnik za celično izolacijo in čiščenje. Gre za metodo zelo dobre ločljivosti, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi pretočno celico, pri tem jih osvetljujemo z ozkim snopom laserske svetlobe. Pred ločevanjem se celice označijo s fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi proti specifičnim antigenskim označevalcem. Če je specifični celični površinski označevalec nedostopen, se s pomočjo vektorja v celico vstavi reporter (9). Metoda temelji na osvetljevanju celice z ozkim snopom laserske svetlobe. Ko svetloba doseže celico, se ta razprši, količino razpršene svetlobe pa zaznajo fotodetektorji. Fotodetektor FS (Forward Scatter) sprejme svetlobo iz smeri laserskega žarka, količina sprejete svetlobe je sorazmerna z velikostjo celice. Fotodetektor SS (Side Scatter) sprejema razpršeno svetlobo pod kotom 90° od smeri laserskega žarka, količina sprejete svetlobe je odvisna od velikosti in oblike jedra ter granulacij v citoplazmi. Dodatni detektorji merijo različne fluorescenčne svetlobe, ki jih oddajajo fluorescenčna barvila. Svetlobne signale računalnik pretvorí v električne in jih prikaže v grafični in matematični obliku. Pretočni citometer ima tri glavne dele: hidrodinamski sistem, optiko (vir svetlobe), elektroniko (detekcijski in računalniški sistem) (14). Prednost sodobnega citomtera je, da analizira več tisoč celic na sekundo. Slabost pa, da je oprema draga, poleg tega metoda potrebuje usposobljeno osebje (9).

1.3.2.2 Magnetno pogojeno ločevanje celic

Magnetno pogojeno ločevanje celic ali krajše MACS je metoda, ki temelji na magnetnem ločevanju celic. Pred ločevanjem se celice označi z monoklonskimi protitelesi, ki so specifična za površinski antigen. Protitelesa so direktno označena z magnetnimi delci. Magnetni delci so mikro-kroglice velike 50 nm, zgrajene iz biorazgradljivega matriksa. Pripravljena celična suspenzija potuje skozi kolono, ki je nameščena v zunanjem magnetnem

polju. Pri tem se označene celice zadržijo na koloni, neoznačene pa preidejo skozi. Sledi korak spiranja in odstranitev kolone iz magnetnega polja. Če primerjamo metodi MACS in FACS, je MACS hitrejša in bolj enostavna za uporabo. Pri tem sta čistost in učinkovitost primerljivi. Ima to slabost, da lahko zaradi uporabe magnetnih delcev povzroči neželene biološke učinke na celico. MACS predstavlja zlati standard za izolacijo matičnih celic (8, 9, 15, 16).

1.3.2.3 Dvofazni vodni sistem - ATPS (Aqueous Two-Phase System)

Metoda je primerna za ločevanje matičnih celic CD34+, ko natančnost ni potrebna, ampak je ključna hitrost. ATPS je tehnika, kjer ločevanje biomolekul poteka med dvema tekočima fazama. Afiniteta molekul ali celic je definirana s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot so hidrofobnost, velikost in površinski naboj. Sistem ATPS razdelimo na dva načina: sistem polimer-polimer in sistem polimer-sol. Najbolj pogosta uporabljeni polimera sta polietilen glikol in dekstran, najbolj uporabljene soli fosfati, sulfati in citrati. Novi pristop ATPS uporablja na polimere vezana monoklonska protitelesa (9).

1.3.2.4 Afinitetna kromatografija

Po definiciji IUPAC je kromatografija "fizikalna metoda ločevanja, pri kateri se komponenta porazdeli in loči med dve fazi, od katere je ena stacionarna in druga mobilna" (17). Kromatografiji podobne ločitve se uporabljajo v industriji in raziskavah od industrijske revolucije naprej (19. stoletje). Glavna prelomnica je bila v letu 1931, ko je Lederer s sodelavci ločil lutein in zeaksantin od ogljikovega disulfida in ksantofil iz jajčnega rumenjaka na koloni s kalcijevim karbonatom (18).

Afinitetna kromatografija je primer imunoafinitetne tehnike, ki temelji na mehanizmu ključa in ključavnice (19). Danes se afinitetna kromatografija zelo razvija, vzrok temu je visoka stopnja ločljivosti. Pri afinitetni kromatografiji prihaja do ločevanja zaradi biološke specifične interakcije med analitom in ligandom. Znana je tudi pod imenom biospecifična interakcijska kromatografija (BIC) in bioselektivna adsorpcijska kromatografija (BAC). Primarno se uporablja za ločevanje biomolekul, kot so antigeni, encimi, proteini in virusi. Ligandi so običajno vezani na kolono, te pa razdelimo v dve skupini. V prvo štejemo tiste, ki vežejo samo eno vrsto molekul (npr. monoklonska protitelesa), v drugo prištevamo ligande, ki vežejo skupino analitov (npr. proteini). Večinoma sledi korak spiranja, kjer se vezani analiti sprostijo, rezultat tega je ločba želenih molekul (19).

Celična afinitetna kromatografija temelji na interakciji med površinskimi celičnimi molekulami in njihovimi komplementarnimi ligandi. Ligand je lahko na nosilec kolone vezan direktno ali indirektno, celice se po nanosu na kolono vežejo, zatem se odstranijo s spiralnim pufom (20).

Skozi zgodovino so se razvijale različne afinitetne kromatografije. Prvi poskus celične separacije s kromatografijo je bil leta 1967, ko sta Plotz in Talal ločila celice vranice iz podgane na steklenih kroglicah, modificiranih z agarozo in s poliklonalnimi δ -globulini. Leta 1977 je Kondorosi objavil študijo ločevanja podganjih limfocitov T s steklenimi in polimetilmetakrilatnimi kroglicami ter najlonsko volno, površina kroglic je bila hkrati prekrita s podganjimi imunoglobulini ali različnimi proteini. Po letu 1970 so uporabljali poliakrilamidne kroglice in kroglice dekstrana (Sephadex G-10). Dekstran so modificirali z avidinom za izolacijo celic CD34+ (21). Omenjene stare tehnike so časovno zamudne, omejuje jih počasna difuzija, na celice deluje velika strižna sila (9).

1.4 Monolitni nosilci pri afinitetni kromatografiji

Novejša alternativna afinitetna kromatografija uporablja **monolitne kromatografske kolone**. Pojem kromatografski monolit ali krajše monolit predstavlja skupino homogene stacionarne faze sestavljene iz enega kosa, vstavljenega v kromatografsko kolono. Prvi poskusi so bili objavljeni v poznih 60-ih in 70-ih letih 20. stoletja, vendar se postopek zaradi tehničnih težav ni obnesel. Z razvojem biotehnologije in potrebe po čiščenju velikih molekul in hitrosti se je konec 90-ih začel velik razvoj. Monolit je lahko pripravljen z različnimi postopki iz različnih snovi, kot so poliakrilamidni gel, metakrilat in silicijev monolit, silicijev kserogel, monolit pripravljen z metatezno polimerizacijo, polimetakrilat, poliakrilamidna keramika, monolit s celulozo, superporozna agariza, različni anorganski monoliti, emulzijsko obdelan monolit imenovan poliHIPE, kriogeli iz poliakrilamidov in številni drugi. Med seboj se razlikujejo v mikroskopski strukturi in sicer v velikosti in geometriji por. Skupna lastnost vseh monolitov je, da so pore povezane med seboj v mikromrežo kanalov, kar omogoča visoko poroznost. Struktura monolita omogoča, da se molekule skozi pore gibljejo skupaj z mobilno fazo in se na ta način omeji difuzija. Tak hitrejši prenos molekul skupaj z mobilno fazo imenujemo konvekcija. Konvektivni transport v kromatografskem monolitu ima pomemben vpliv na ločevanje makromolekul z nizko difuzivnostjo, kot so polinukleotidi in virusi. Problem pri starejših nosilcih iz delcev je ta,

da molekule difundirajo v nosilec. Majhne molekule npr. proteini imajo veliko difuzivnost, velike molekule (npr. genomska DNA) pa majhno difuzivnost. Zato bi morali za enako učinkovitost ločevanja velikih molekul porabiti veliko več časa kot za majhne molekule (22). V primerjavi s klasično kromatografijo, ki temelji na počasni difuziji majhnih molekul, je zato nova kromatografija z monolitnimi nosilci veliko bolj produktivna in hitrejsa (23). Konvektivni prenos prinaša tudi tokovno neodvisnost. Pri klasičnih nosilcih se ločba z zvišanjem pretoka znižuje, učinkovitost pada. Pri monolitnih nosilcih pa ravno obratno, z zvišanjem pretoka se učinkovitost ohranja. Prednost monolitov je tudi visoka vezalna kapaciteta velikih molekul ter majhen padec tlaka zaradi odprte monolitne strukture (22,24).

1.4.1 Vrste monolitnih nosilcev

1.4.1.1 Kriogel

Kriogel je zelo porozen medij, pripravljen s krio-polimerizacijo raztopljenih monomerov pod temperaturo -10°C. Ko raztopina zamrzne, se izoblikujejo kristali. Oblika in velikost kristalov je odvisna od hitrosti zamrzovanja. Struktura kriogela predstavlja 90 % vode ter 4 % polimera, ostalo je voda vezana na polimer. Sistemski upor toka je zelo nizek zaradi velikih por. Glavne biotehnološke aplikacije so ločevanje laktat dehidrogenaze, kvasovk, *E.coli*, limfocitov B, različnih mikroorganizmov in evkariontskih celic. Kriogel je kot adsorbent mehansko zelo mehek in fleksibilen. Postopek izdelave je tehnično enostaven in cenovno ugoden. Matriko kriogela lahko enostavno odstranimo, sušimo pri 70 °C in hranimo v suhem stanju (23).

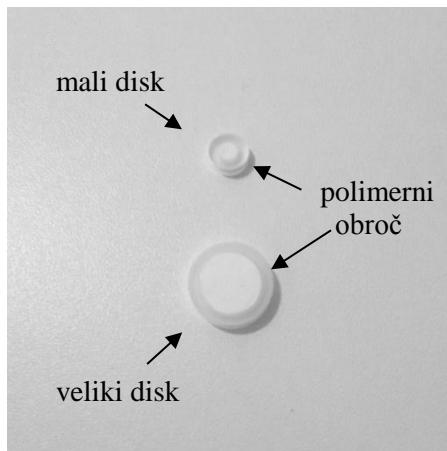
1.4.1.2 Metakrilatni monolit

Metakrilatni monolit se izoblikuje v procesu proste radikalne polimerizacije. Polimerizacijska mešanica vsebuje monomere monovinil in divinil metakrilata (zamreževalce), iniciator in topilo (porogen), ki izoblikuje pore. Ko prosti radikalni iniciator razpade pri določeni temperaturi, se začne polimerizacija. Polimer, ki se izoblikuje, je netopen v topilu in se izbori, zaradi premreženja pa se ohrani njegova porozna struktura. Pri tem temperatura določa velikost por, topilo določa poroznost, razmerje monomera in zamreževalca pa premreženost monolita. Omenjeni monolitni material se uporablja za tekočinsko kromatografijo (25).

Kratke monolitne kolone (SMC-Short Monolithic Columns), komercialno imenovane tudi disk CIM (CIM-Convective Interaction Media), zagotavljajo konvektivni prenos molekul.

Velika prednost kratkih kolon pred ostalimi je, da zahtevajo zelo nizek pritisk, kar je ključno za varnost, kadar uporabljamo monolite velikih volumnov (24). Ostale prednosti SMC so: tokovno neodvisna ločljivost in visoka dinamična vezavna kapaciteta, hitrost, enostavna uporaba ter zmanjšana inaktivacija molekul (24,25),

Pri naših poskuhih smo uporabili konvektivne porozne nosilce, izdelane iz metakrilata, na katere so bile vezane naslednje skupine: epoksidne, DEAE, OH, SO₃ in QA.



Slika 1: Mali in veliki epoksidni disk izdelana iz metakrilata

1.4.2 Uporaba monolitnih nosilcev

1. Čiščenje bakteriofagov

Bakterifagi so virusi, ki napadajo bakterije. Odkriti so bili v začetku 20. stoletja. Danes se predvsem uporabljamjo kot alternativa antibiotikom za zdravljenje bakterijskih obolenj, zlasti bakterij odpornih na antibiotike. Primer uporabe monolitnih nosilcev sta čiščenje bakteriofaga T4, ki se izloči iz *Escherichie coli* s pomočjo monolitne kolone CIM DEAE ter čiščenje bakteriofaga VDX-10, ki napada *Staphylococcus aureus* (22).

2. Zaznavanje virusov

Učinkovito zaznavanje virusov je pomembno za zgodnje odkrivanje bolezni. Poleg tega so virusi dober kandidat za gensko in celično terapijo ter se uporabljamjo za vakcinacijo. Primer uporabe monolitnih nosilcev je določanje tipa adenovirusa 5 z monolitno kolono QA, ločevanje bakulovirusa od lentivirusa z monolitno kolono CIM DEAE in čiščenje virusa rubela s metakrilatnim monolitom QA (22).

3. Določanje virusom podobnih delcev (VLP)

Virusom podobni delci so sestavljeni iz virusnih plaščnih proteinov in ne vsebujejo virusnega genskega materiala. Aktivirajo imunski sistem brez tveganj za infekcijo, zato se uporabljajo kot alternativa za cepljenje. Ker so VLP po obliki in velikosti podobni ali enaki kot nativni virusi, uporabljam tu iste monolite. Primer uporabe monolitnih nosilcev sta določanje VLP Ad3 z monolitno kolono CIM QA ter ločitev površinskega antiga hepatitis B VLP s hidroksi monolitno kolono CIM (22).

4. Ločevanje celic

Celice so po velikosti večje od virusov in VLP. Zaradi tega je monolitna struktura temu prilagojena, velikost pa je zaradi velikosti celic večja. Dober kandidat za ločevanje celic je kriogel, ker se pore pri polimerizaciji izoblikujejo v velikosti od 10-100 μm . Primer te uporabe sta ločevanje limfocitov in matičnih celic s kriogelovo kolono imobilizirano s proteinom A ter ločevanje bakterij *Escherichia coli* z etrskim monolitom poligicerol-3-gicidil, ki ima preko epoksidnih skupin imobiliziran ligand polimiksin B (22).

5. Ločevanje in čiščenje celičnih struktur

Primer te uporabe je ločevanje bakterijskih ribosomov z monolitnimi diskami CIM QA (22).

6. Ločevanje velikih proteinov

Protitelesa IgG in IgM so zelo uporabna na terapevtskem in diagnostičnem področju. Zahtevana je visoka čistost, ki jo dosežemo z ločevanjem na kratkih metakrilatnih monolitnih kolonah. Tipično čiščenje IgG vsebuje na monolitih še imobiliziran protein A (22).

7. Čiščenje plazmidne DNA na metakrilatnih kratkih monolitnih nosilcih (CIM) (24).

2. NAMEN DELA

Cilji našega dela so:

- Ugotoviti, katere so primerne metode za določanje vezave levkocitov na monolitne nosilce in njihovo spiranje z njih.
- Preveriti morebitni vpliv nosilcev na celice.
- Ugotoviti, če se levkociti nespecifično vežejo na monolitne nosilce z različnimi kemijskimi modifikacijami.
- Ugotoviti, če lahko na monolitne nosilce s pomočjo nanje imobiliziranih protiteles vežemo le določene vrste levkocitov.
- Ugotoviti, če lahko specifično vezane celice z nosilcev kasneje tudi spiramo.

Izhodiščni biološki vzorec za naše raziskovanje bo venska kri in njen lizat. Levkocite v začetnem lizatu, po inkubaciji diskov in spiranju v PBS bomo analizirali na hematološkem analizatorju. Rezultate bomo primerjali s pretočno citometrijo. Pred vsakim poskusom bomo diske sprali v pufru PBS. Koncentracijo spiralnega PBS bomo merili s hematološkim analizatorjem in spektrofotometrom, ter na ta način določili čistost diskov. Strukturo levkocitov bomo pregledali s pripravo preparatov in pregledom pod svetlobnim mikroskopom. Dodatno informacijo o živosti celic in primerjavo koncentracije s hematološkim analizatorjem bomo dobili s štetjem obarvanih celic v Neubauerjevi komori.

V drugem delu bomo uporabili monolitne diske z imobiliziranimi specifičnimi monoklonskimi protitelesi. Diske bomo po inkubaciji v krvnem lizatu vstavili v plastično ohišje in s pomočjo injekcijske brizge ali črpalke poskušali sprati celice s tokom pufra skozi porozni sloj. Za opazovanje površine diskov in morebitnih vezanih celic bomo uporabili svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Venska kri odvzeta v epruveto z antikoagulantom K₃EDTA

Izhodiščni biološki material je bila venska kri odvzeta z antikoagulantom EDTA. Raziskavo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko št. 0120-189/2017-6.

3.2 Priprava redčenih vzorcev krvi

Za pripravo redčenih vzorcev krvi smo uporabili 1 × PBS.

3.3 Priprava krvnega lizata

1 mL polne venske krvi smo dodali 24 mL 1 × lizirnega pufra. Inkubacija je potekala 10 minut na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 1600 rpm. Nato smo supernatant odlili in sediment sprali z 10 mL 0,5 × FBS. Zopet smo centrifugirali 5 min pri 1600 rpm. Supernatant smo odlili in sedimentu dodali 10 mL 0,5 × FBS. Postopek spiranja smo ponavljali, dokler nismo dosegli, da je bil supernatant brezbarven. Na koncu smo dodali toliko 0,5 × FBS, da smo dosegli želeno koncentracijo levkocitov. Pri pripravi krvnega lizata smo na začetku sediment najprej sprali z 1 × PBS, kasneje smo uporabili PBS z dodatkom FBS zato, da smo preprečili agregacijo celic.

3.3.1 Priprava raztopine:

10 × PBS: Natehtali smo 80 g NaCl, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl, 14.4 g 2Na₂HPO₄×H₂O (11.5 g Na₂HPO₄). Dodali smo 900 mL destilirane vode in pH uravnali na 7,4. Nato smo dopolnili z destilirano vodo do oznake in prefiltrirali preko sterilnega filtra v sterilno reagenčno steklenico.

1 × PBS: 100 mL 10 × PBS smo zlili v 1000 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake, zatem smo pH vrednost smo uravnali na 7,4. PBS smo uporabili za spiranje diskov in redčenje raztopin.

0,5 × FBS: 100 mL 1 × PBS smo dodali 0,5 mL FBS.

10 × lizirni pufer: Natehtali smo 82,6 g NH₄Cl, 10 g KHCO₃, 0,37 g EDTA. Vse skupaj smo raztopili v 1000 mL destilirane vode. Raztopino smo nato sterilizirali.

1 × lizirni pufer: 100 mL 10 × lizirnega pufra smo zlili v 1000 mL bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

3.4 Konvektivni porozni nosilci

Pri našem delu smo uporabili predhodno pripravljene monolitne diske dveh premerov. Mali disk (MD) je imel polmer 2 mm, veliki disk (VD) pa 6 mm. Diski so zaradi boljše mehanske stabilnosti imeli plastični obroček. Večino poskusov smo izvedli na metakrilatnih monolitih z epoksidnimi skupinami, uporabili pa smo tudi monolite z naslednjimi kemijskimi modifikacijami: DEAE (dietilaminoetyl), kvarterni amin (QA), hidroksi in sulfatna. Diske so pripravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Pred vsakim poskusom smo diske sprali v pufru $1 \times$ PBS in s tem smo zagotovili njihovo čistost.

3.4.1 Priprava konvektivnih poroznih nosilcev z imobiliziranimi protitelesi

Prav tako smo dobili že vnaprej pripravljene monolitne nosilce z imobiliziranimi protitelesi proti antigenoma CD13 in CD20.

Diske so na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo dva dni pri $4-8^{\circ}\text{C}$ inkubirali v raztopini s protitelesi CD20 oziroma s protitelesi CD13.

3.4.1.1 Preverjanje čistosti diskov z imobiliziranimi protitelesi s spektrofotometrom

Pred vsakim poskusom smo diske vedno sprali v pufru $1 \times$ PBS. S tem smo zagotovili njihovo čistost in odstranili morebitna nevezana protitelesa. S spektrofotometrom NanoDropOne (Slika 2) smo v spiralnem pufru PBS, določili absorbanco pri 280 nm, da smo preverili koncentracijo proteinov - protiteles (Tabela 3). Meritev na aparatu je potekala tako, da smo $10 \mu\text{L}$ PBS kanili na testno polje in odčitali rezultat. Med vsako naslednjo meritvijo smo očistili testno polje. V našem primeru je bila koncentracija proteinov pokazatelj koncentracije nevezanih protiteles v porah diska, oziroma učinkovitosti spiranja nespecifično vezanih.

Tabela 3: Absorbanca in koncentracija protiteles v spiralnem pufru PBS

Vzorec	A280	Koncentracija [mg/mL]
1. spiranje s PBS E-1 \times CD20	0,32	0,319
2. spiranje s PBS E-1 \times CD20	0,01	0,012
3. spiranje s PBS E-1 \times CD20	0,00	0,004
1. spiranje s PBS E-2 \times CD20	0,49	0,492
2. spiranje s PBS E-2 \times CD20	0,02	0,022
3. spiranje s PBS E-2 \times CD20	0,00	0,002

Tabela 3 prikazuje, kako smo s spiranjem odstranili nevezana protitelesa. Absorbanca in koncentracija sta padali po vsakem spiranju. Pri zadnjem spiranju je bila absorbanca 0, tako so bili diskki pripravljeni za nadaljnje poskuse.



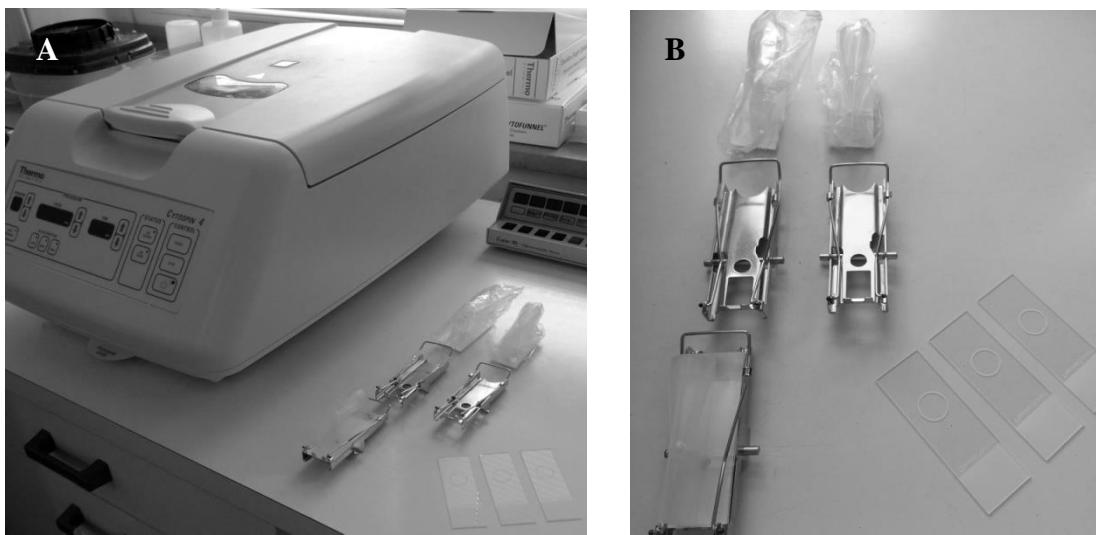
Slika 2: Spektrofotometer NanoDropOne

3.5 Priprava preparatov za mikroskopiranje s centrifugo Cytospin 4

Sestavili smo skupaj ograjico, objektno stekelce, filter, tulček in obroček. 200 µL lizata smo nanesli v tulček. S citocentrifugo Hettich smo jih centrifugirali 5 minut pri 700 rpm. Po prvem vrtenju smo lizat odlili in nato odstranili obroček in tulček. Ponovno smo centrifugirali 5 minut pri 700 rpm. Potem smo odstranili ograjico in filter.

Centrifuga Cytospin4 (Slika 3) omogoča hitrejšo in enostavnejšo pripravo preparatov za mikroskopiranje, ki je bila nova pridobitev tekom dela v hematološkem laboratoriju. Priprava je potekala tako, da smo dali na objektno stekelce plastični tulček, oba dela smo skupaj speli s kovinsko sponko, nato pa smo v plastični lijak odpipetirali biološki vzorec. Vpeto stekelce smo centrifugirali 5 min pri 400 rpm.

Tako pripravljene preparate smo sušili najmanj 2 uri. Posušene preparate smo barvali v raztopini May-Grunwald 5 minut, nato sprali s pufrom in zatem preložili v razredčeno delovno raztopino barvila Giemsa ter barvali 20 minut. Obarvane preparate smo na koncu dobro sprali pod tekočo vodo in osušili na zraku.



Slika 3: A) Citocentrifuga Cytospin4. B) Priprava preparatov za mikrosopiranje

3.5.1 Priprava raztopin za barvanje preparatov

-Sorrensenov fosfatni pufer za pripravo barvila Giemsa, pH=6.6: 9,1 g/L KH_2PO_4 smo raztopili v 630 mL destilirane vode. Nato smo natehtali 9,5 g/L Na_2HPO_4 in dolili 370 mL vode. Obe raztopini smo zmešali skupaj in pH vrednost uravnali na 6,6.

-Delovna raztopina barvila Giemsa v fosfatnem pufru: 10 mL barvila Giemsa smo odmerili v merilnem valju in dodali fosfatni pufer do oznake 100 mL. Razmerje mora biti 1:10.

3.6 Analiza na hematološkem analizatorju Sysmex XN-1000

Analiza temelji na hidrodinamičnem fokusiranju, pretočni citometriji ter načinom določanja hemoglobina z uporabo SLS (Natrijev Lavril Sulfat). Aparat XN-1000 (Slika 4b) omogoča določanje levkocitov v polni krvi in v telesnih tekočinah, kjer je koncentracija levkocitov zelo nizka (26). Na način merjenja telesnih tekočin meri aparat približno 1000-krat nižje koncentracije krvnih celic, kot so v normalni krvi. V našem primeru smo uporabili 100-krat redčeno kri in krvni lizat.

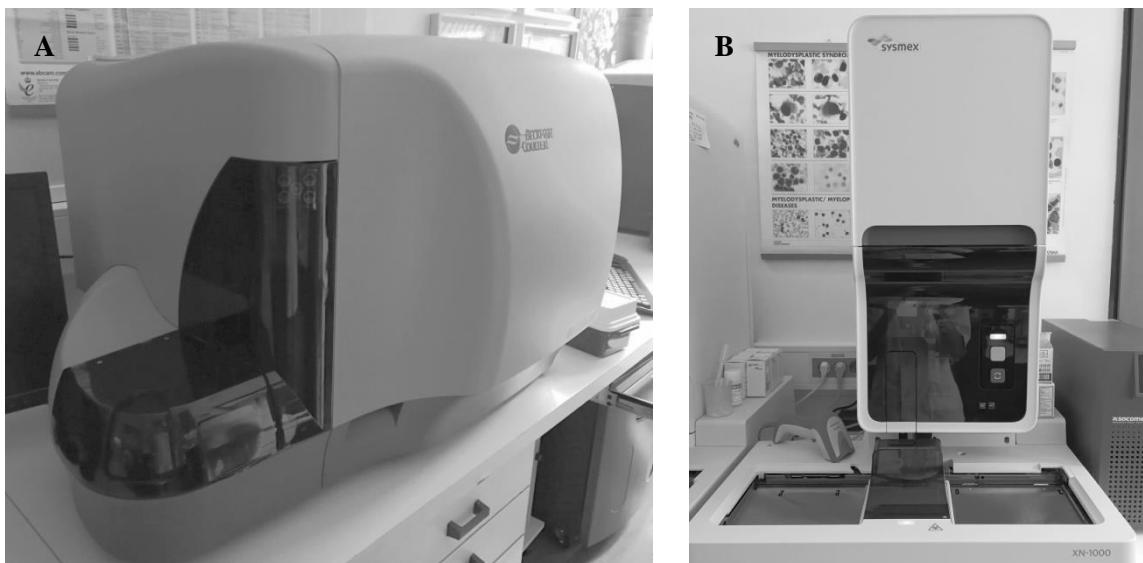
3.7 Analiza na pretočnem citometru Cytomics FC 500

Delo na pretočnem citometru zahteva strokovno usposobljeno osebje, v primerjavi s hematološkim analizatorjem je metoda veliko bolj draga in časovno zamudna. V našem primeru smo uporabili označevalec nukleinskih kislin 7AAD, ki se veže samo v mrtve celice, katerih membrana je močno poškodovana (9,14,27).

Priprava suspenzije za meritev na pretočnem citometru:

V plastični epruvetki smo zmešali 100 µL krvnega lizata, 20 µL celičnega označevalca CD45 in 20 µL 7AAD. Zatem smo na temnem epruvetko inkubirali 15 min. Po 15 min smo v suspenzijo dodali 2 mL 1 × PBS in 100 µL 994 fluorosfere ter na stresalniku suspenzijo močno homogeno premešali.

V primeru 100-krat redčene krvi smo suspenziji dodali 2 mL NH₄Cl za lizo eritrocitov ter raztopino analizirali na pretočnem citometru Navios (Beckman Coulter) (Slika 4a).



Slika 4: A) Pretočni citometer Navios. B) Hematološki analizator Sysmex XN-1000

3.8 Postopek barvanja levkocitov za štetje v Neubauerjevi komori

V epruveto s 500 µL raztopine po Türku smo dodali 25 µL vzorca ter mešali na valjčnem mešalcu 5 minut. Nato smo napolnili Neubauerjevo komoro za štetje celic. Mikroskopirali smo pri 200-kratni povečavi in prešteli vse celice na površini 4 mm² (v 4-ih velikih vogalnih kvadratih mreže). Levkocite, ki so bili na mejni črti kvadrata smo šteli tako, da smo upoštevali vse celice, ki so na spodnji in levi stranici kvadrata; tiste, ki so bile na zgornji in na desni stranici smo izločili.

Izračun: Št. preštetih levkocitov : 20 = štev. konc. levkocitov × 10⁹/L

Raztopina po Türku: Pripravili smo vodno raztopino barvila gentianaviolet: 0,2 g barvila gentianaviolet smo raztopili v nekaj destilirane vode in dopolnili z njo do 100 mL. 3 mL koncentrirane ocetne kisline smo dodali 0,8 mL raztopine barvila gentianaviolet ter dopolnili z destilirano vodo do 100 mL. Reagent smo nato pred uporabo prefiltrirati.

3.9 Mikroskopija

3.9.1 Svetlobna mikroskopija

Svetlobni mikroskop je najpogostejša in najpreprostejša mikroskopija, ki uporablja svetlobno valovanje v vidnem delu spektra (28). Mikroskopirali smo najprej pod manjšo (100-kratno) in zatem pod večjo (400-kratno) povečavo, za preparate smo dodatno nastavili imerzijski objektiv. Uporabili smo dva mikroskopa:

- Mikroskop Olympus BX41 za mikroskopiranje v vidnem polju za preparate in števno komoro
- Optični mikroskop Imager.Z2m (Zeiss) za opazovanje površine diskov in obarvanih celic.

3.9.3 Fluorescenčna mikroskopija

S to mikroskopijo smo izkorisčali lastnost fluorescence, kar pomeni, da so molekule absorbirale svetlobo krajših valovnih dolžin in oddajale svetlobo daljših valovnih dolžin. Mikroskop je preparat osvetllil od zgoraj z izbrano vzbujevalno svetlobo. Ker smo imeli tu filter, ki zapre svetlobo, ki ne fluorescira, smo videli samo fluorescenčno svetlobo v temnem polju (29,30,31).

Na disk smo po inkubaciji v krvnem lizatu in spiranju v $1 \times$ PBS dodali $20 \mu\text{L}$ DAPI. Uporabili smo filter z vzbujevalno svetlobo pri 358 nm in z mikroskopom Olympus BX41 opazovali celice na površini diska.

Tabela 4: Seznam uporabljenih reagentov

Reagent	Proizvajalec
NaCl	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Kemika
KCl	Merck
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	Kemika
NaOH	Kemika
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
KHCO ₃	Itrij
EDTA	Sigma-Aldrich
Destilirana voda	Lekarna UKC Ljubljana
HCl	Kemika
Giemsa stain, modified solution	Sigma-Aldrich
May-Grunwald solution	Sigma-Aldrich
Barvilo gentianaviolet B	Kemika
Koncentrirana ocetna kislina	Alkaloid
DAPI	Abbott Molecular

Tabela 5: Pregled uporabljenih aparatur

Aparatura	Proizvajalec
Laminarij (brezprašna komora) LFVP12	Iskra PIO, Slovenija
Vorteks Vibromix10	Tehtnica, Slovenija
Tehtnica AX 304	Mettler Toledo, ZDA
pH meter SevenEasy	Mettler Toledo, ZDA
Hematološki analizator	Sysmex XN-1000, Japonska
Centrifuga Rotofix 32A	Hettich Zentrifugen, Nemčija
Centrifuga Cytospin4	ThermoFisher scientific, ZDA
Centrifuga Labofuge 400, Heraeus	ThermoFisher scientific, ZDA
Centrifuga Eppendorf 5810R	Eppendorf, Nemčija
Svetlobni in fluorescenčni mikroskop Olympus BX41	Olympus Optical, Japonska
Injekcijska črpalka Harvard PHD	Harvard Apparatus, ZDA
Stereološki optični mikroskop Imager.Z2m	Zeiss, Nemčija
Pretočni citometer Cytomics FC 500	Beckam-Coulter, ZDA
Spektrofotometer NanoDropOne	Thermo scientific, ZDA

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določanje vezave krvnih celic s pomočjo hematološkega analizatorja

Prva naloga pri našem delu je bila ugotoviti, katere metode so primerne za določitev morebitne vezave krvnih celic na monolitne nosilce. Glede na to, da se koncentracije krvnih celic rutinsko določajo s hematološkimi analizatorji, smo najprej preverili, če bi lahko pri naših poskusih uporabili kar analizator.

4.1.1 Meritev v polni krvi in v redčenem vzorcu krvi

Poskus smo pričeli z epoksidnimi diskami (diski E) dveh premerov, z malim diskom (MD E) in velikim diskom (VD E). Diske smo pomakali v epruveti z vzorčkom venske krvi, po določenem času inkubacije smo diske odstranili. Mali disk smo inkubirali 10 in 20 min, za veliki disk smo uporabili 15 minutni čas inkubacije. Koncentracijo krvnih celic smo merili s hematološkim analizatorjem v navadnem načinu za določitev krvne slike pred dodatkom in po odstranitvi diska iz epruvete (Tabela 6).

Tabela 6: Koncentracije krvnih celic v raztopinah pred in po inkubaciji z diskami E

	Eritrociti [$\times 10^{12}/L$]	Levkociti [$\times 10^9/L$]	Trombociti [$\times 10^9/L$]
Začetni hemogram	4,0	7,40	397,0
VD E, 15 min	4,21	7,73	426,0
MD E, 10 min	4,18	7,66	412,0
MD E, 20 min	4,29	7,26	397,0

Rezultati so pokazali, da ni bistvenih sprememb med koncentracijami pred in po inkubaciji z diskami. Glede na to, da sprememb nismo zaznali, smo naredili izračun, koliko krvnih celic posamezne vrste bi se teoretično lahko vezale na disk (Tabela 8). Pri tem smo upoštevali površino celic in diskov, za izračune smo predpostavili povprečen premer eritrocita, levkocita in trombocita (Tabela 7). Upoštevali smo, da ima disk dve strani, da celice ne morejo vstopiti v pore diskova, da se vežejo na površino diskova v eni plasti in poenostavili, da so celice okrogle oblike. Teoretično vezavo smo dobili z razmerjem med površino diskova in površino celic.

Tabela 7: Podatki o velikosti diskov in celic

	Premer	Površina
Mali disk	4 mm	$12,56 \times 10^6 \mu\text{m}^2$
Veliki disk	12 mm	$226,19 \times 10^6 \mu\text{m}^2$
Eritrocit	7 μm	$38,5 \mu\text{m}^2$
Levkocit	13 μm	$132,7 \mu\text{m}^2$
Trombocit	2 μm	$3,14 \mu\text{m}^2$

Tabela 8: Teoretična vezava celic

Vezava celic	Eritrociti	Levkociti	Trombociti
Mali disk	$3,2 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$	4×10^6
Veliki disk	$5,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$7,2 \times 10^7$

Z izračuni smo ugotovili, da v primeru analize polne krvi z uporabo hematološkega analizatorja ne moremo zaznati sprememb, tudi če krvne celice prekrijejo celotno površino. Analitična natančnost meritev je za levkocite $\leq 3\%$, eritrocite $\leq 1,5\%$ in trombocite $\leq 4\%$. Če smo želeli približati analitični natančnosti analizatorja, smo morali kri obvezno vsaj 100-krat redčiti (RVK).

Poskus smo nadaljevali z epoksidnimi diskami dveh premerov, z malim diskom (MD E2 in MD E3) in velikim diskom (VD E1). Diske smo inkubirali v epruveti z redčenim vzorčkom venske krvi ($100 \times \text{RVK}$). Da bi zaznali spremembo v koncentraciji krvnih celic pred in po inkubaciji diska v epruveti, smo merili s hematološkim analizatorjem v načinu "body-fluid", za merjenje telesnih tekočin z nizko koncentracijo celic. V tabeli 9 so v oklepajih navedeni volumni celične raztopine, ki smo jih uporabili pri izračunih števila vezanih celic ter časi inkubacije diskov.

Tabela 9: Koncentracije krvnih celic v raztopinah RVK pred in po inkubaciji z diskimi ter izračun vezave levkocitov

	Eritrociti [$\times 10^6/\text{L}$]	Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]	Število vezanih levkocitov
Začetna $100 \times \text{RVK VD E1}$ (1 ml)	0,041	67	
Začetna $100 \times \text{RVK MD E2}$ (0,5 ml)	0,042	77	
Začetna $100 \times \text{RVK MD E3}$ (0,5 ml)	0,042	72	
VD E1, 15 min (1 ml)	0,044	81	-
MD E2, 10 min (0,5 ml)	0,046	68	4500
MD E3, 20 min (0,5 ml)	0,047	67	2500

Koncentracija levkocitov je po inkubaciji malega diska padala, kar je bil lahko vzrok vezave levkocitov na površino diska. Pri meritvi RVK po inkubaciji velikega diska je prišlo verjetno do napake, saj smo izmerili večjo koncentracijo levkocitov.

4.1.2 Meritev v krvnem lizatu in primerjava s pretočno citometrijo

Na podlagi prejšnjih rezultatov smo sklepali, da se je kljub redčitvi venske krvi na diske lahko vezalo veliko eritrocitov, kar je posledično zmanjšalo vezavo levkocitov. Koncentracija eritrocitov se v nobenem poskusu ni zmanjšala. Pri namakanju diskov je prišlo do rahlega rdečega obarvanja nosilcev, kar je tudi motilo nadaljnje opazovanje površine nosilcev. Zato smo se odločili, da bomo v nadalnjih poskusih uporabili krvni lizat, to je suspenzija levkocitov po odstranitvi eritrocitov. Glede na majhno velikost smo v nadaljevanju zanemarili trombocite.

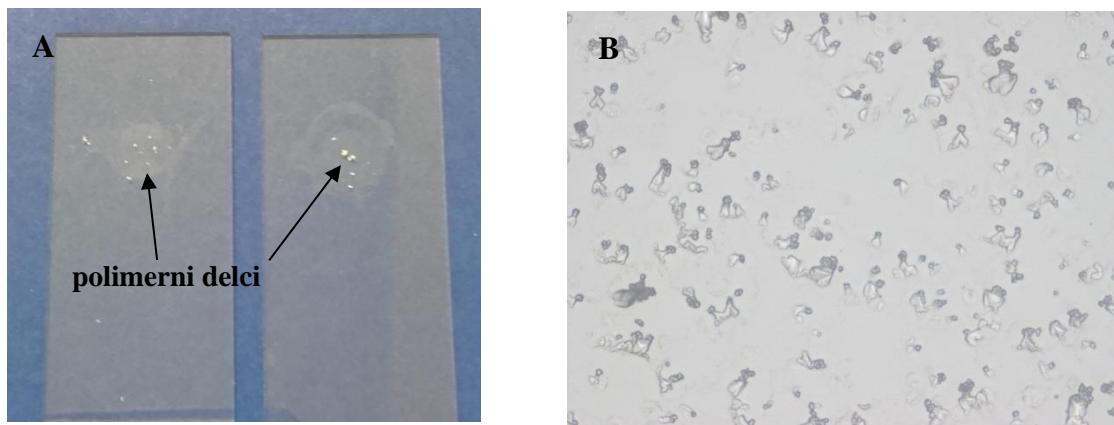
Da bi dodatno preverili, če lahko hematološki analizator uporabimo pri določanju vezave levkocitov, smo koncentracijo levkocitov primerjali z določitvijo na pretočnem citometru. Poleg krvnega lizata smo zaradi primerljivosti uporabili tudi 100-krat redčeno vensko kri ($100 \times \text{RVK}$). Dodatno smo vključili med inkubacijo še centrifugiranje, da bi preverili, če centrifugalna sila vpliva na nespecifično vezavo celic na površino diskov. Spreminjali smo čas inkubacije in volumen krvnega lizata (Tabela 10).

Tabela 10: Koncentracije krvnih celic v raztopinah pred in po inkubaciji z diskami E izmerjene s hematološkim analizatorjem in pretočnim citometrom

	Hematološki analizator		Pretočna citometrija
	Eri [$\times 10^6/\mu\text{L}$]	Lkc [$\times 10^6/\text{L}$]	Lkc [$\times 10^6/\text{L}$]
Začetna $100 \times \text{RVK}$	0,04	44	38
MD E, 10 min (0,5 ml)	0,042	45	41
MD E, 20 min (0,5 ml)	0,044	26	27
VD E, 15 min (1 ml)	0,042	48	36
Začetni lizat	0,003	103	32
VD E, 10 min (1 ml)	0,002	4	8
VD E, 15 min (1 ml)	0,002	6	22
MD E, 20 min (0,5 ml)	0,003	795*	1551*

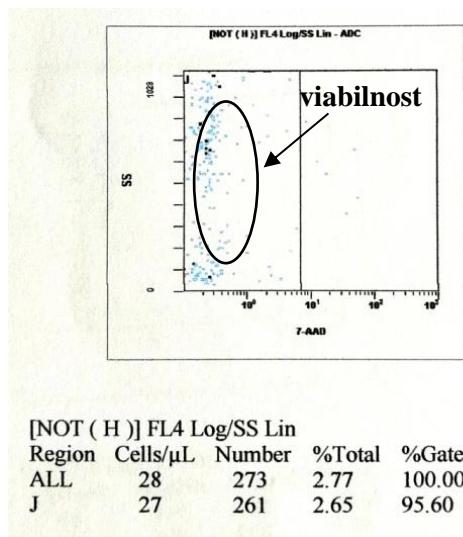
Meritev $100 \times \text{RVK}$ malega diska po inkubaciji 10 min se od začetne koncentracije ni razlikovala. Prav tako ni bilo velike spremembe v koncentraciji pri velikem disku in inkubaciji 15 min. Največjo spremembo v koncentraciji smo zaznali po inkubaciji malega diska za 20 min. Koncentracija eritrocitov se tudi tokrat ni spremenjala.

Nasprotno pa so se meritve s krvnim lizatom zelo razlikovale. Opazili smo velik padec koncentracije levkocitov po inkubaciji velikega diska v lizatu. Sklepali smo, da se je velika večina celic vezala na diske. Pri merjenju lizata pri inkubaciji malega diska za 20 min smo opazili porast koncentracije z opozorilom aparata z zvezdico. V takem primeru analizator ne more opredeliti, za katero vrsto celic gre, zato moramo tak vzorec pregledati pod mikroskopom. Sklepali smo, da gre za delčke nosilca, saj se pri poskusih zaradi prijemanja s pinceto delčki polimera lahko hitro odkrušijo. Priprava preparatov s citocentrifugo in pregled pod mikroskopom je pokazala prisotnost delcev polimera (Slika 5). Iz slike 5B je razvidno, da je velikost delcev primerljiva z velikostjo levkocitov, zato jih je analizator uvrstil v to skupino. Zanimivo je, da tudi pretočna citometrija, pri kateri smo za označevanje levkocitov uporabili anti CD45, ni »prepoznala«, da ne gre za celice. Razlog verjetno tiči v nespecifični vezavi protitelesa na polimerne delce. Da bi se tovrstni motnji izognili smo v prihodnjih poskusih pred eksperimenti s celicami diske dodatno ultrazvočno očistili in s tem odstranili morebitne polimerne delce s površine diska.



Slika 5: A) Preparata lizata s polimernimi delci po inkubaciji MD. B) Polimerni delci (400-kratna povečava).

Rezultati hematološkega analizatorja so bili primerljivi s pretočno citometrijo (Tabela 10). Zato smo se odločili, da meritve lahko izvajamo s hematološkim analizatorjem. Ta način je v primerjavi s pretočno citometrijo časovno manj zamuden, enostavnejši ter cenovno ugodnejši. Meritve na pretočnem citometru so nam dale pomemben podatek o živosti celic. Iz grafa 7-AAD/SS za RVK po inkubaciji MD za 10 min je razvidna 100 % viabilnost celic, kar pomeni, da nosilci niso citotoksični (Slika 6).



Slika 6: Določitev viabilnosti levkocitov s pretočno citometrijo po inkubaciji MD

4.2 Nespecifična vezava levkocitov na epoksidne diske

Zanimala nas je časovna odvisnost morebitne vezave levkocitov na monolitne diske. V tem delu poskusa smo imeli male in velike epoksidne diske, koncentracijo lizata smo merili takoj po potopitvi diskov v krvni lizat, po 2 minutni in 10 minutni inkubaciji. Za tem smo diske sprali v pufru PBS, kjer smo prav tako izmerili koncentracijo levkocitov (Tabela 11). V začetnem lizatu je bilo $0,001 \times 10^6/\text{L}$ eritrocitov, zato smo jih pri nadalnjih meritvah zanemarili.

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu: $79 \times 10^6/\text{L}$

Število levkocitov v 1 mL lizata: 79000

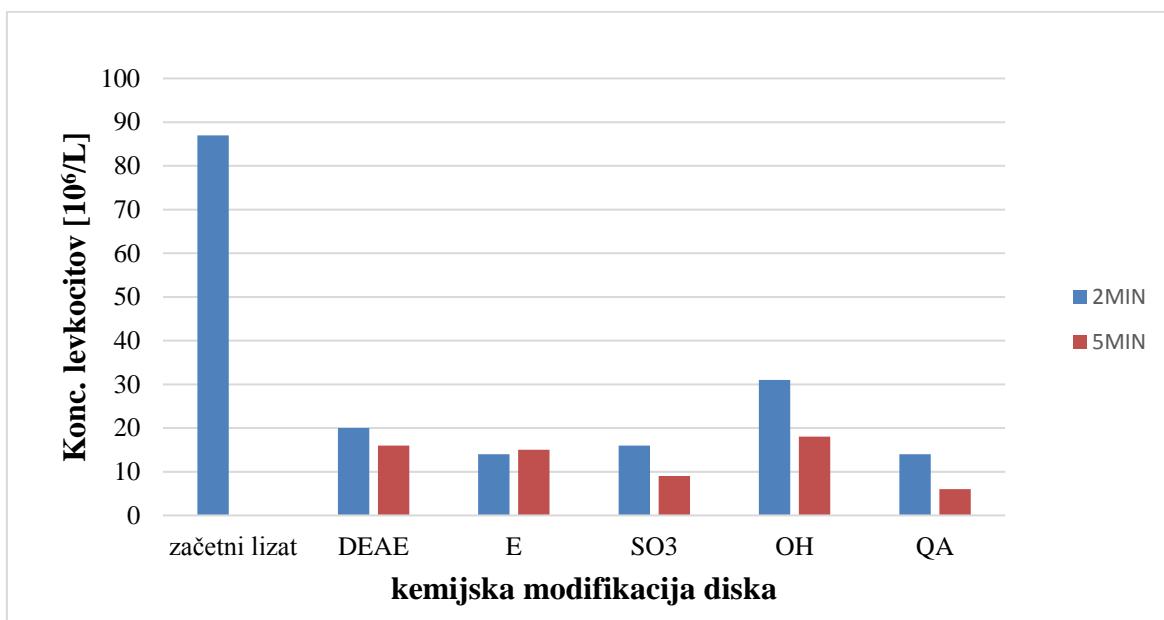
**Tabela 11: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu in pufru PBS po inkubaciji
MD E in VD E**

	Lizat po inkubaciji Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]	PBS po spiranju Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]	Zmanjšanje št. levkocitov
VD E, 0 min (1 ml)	34	5	45000
VD E, 2 min (1 ml)	9	1	70000
VD E, 10 min (1 ml)	6	1	73000
MD E, 0 min (0,5 ml)	27	1	26000
MD E, 2 min (0,5 ml)	9	1	35000
MD E, 10 min (0,5 ml)	3	4	38000

Tabela 11 prikazuje velik padec koncentracije levkocitov v lizatu že takoj po potopitvi diskov, kar smo pripisali nespecifični vezavi levkocitov na diske. Koncentracija je padala po enkratnem namakanju, naraščala s časom, po 10 minutah so bile skoraj vse celice vezane. Vendar v spiralnem pufru PBS levkocitov skoraj ni bilo. Pričakovali smo, da bi se nespecifično vezane celice morale sprati s PBS. Prav tako je bilo nenavadno, da ni bilo bistvene razlike med velikim in malim diskom kljub bistveno večji površini velikega diska.

4.2.1 Vpliv kemijske modifikacije monolita

Tudi pri uporabi malih diskov z različnimi kemijskimi modifikacijami (hidroksi (OH), sulfatne (SO₃), QA in DEAE) smo dobili podobne rezultate kot z epoksidnimi diskami (E) (Slika 7). Rezultati so ponovno pokazali hiter padec koncentracije levkocitov ne glede na čas in kemijsko modifikacijo. Nekoliko manjši padec smo opazili le pri modifikaciji s kemijsko skupino OH.



Slika 7: Koncentracija levkocitov v lizatu po inkubaciji različnih diskov za 2 min in 5 min

4.2.2 Vpliv polimernega obročka

Ker čas, velikost površine, spiranje v PBS in kemijska modifikacija niso bistveno vplivali na zmanjšanje koncentracije levkocitov v inkubacijski raztopini, smo izključili še vezavo celic na plastični obroček, ki obdaja monolitne diske. Nekateri polimeri se namreč uporabljajo za vezavo celic na površino pri njihovem ločevanju (22). V krvnem lizatu smo inkubirali še samostojni polimerni obroč brez monolita. Za primerjavo smo inkubirali še epoksidni (E) in OH disk. Diske in polimer smo inkubirali v krvnem lizatu najprej 2 minuti, zatem smo jih sprali v spiralnem pufru PBS (Tabela 12).

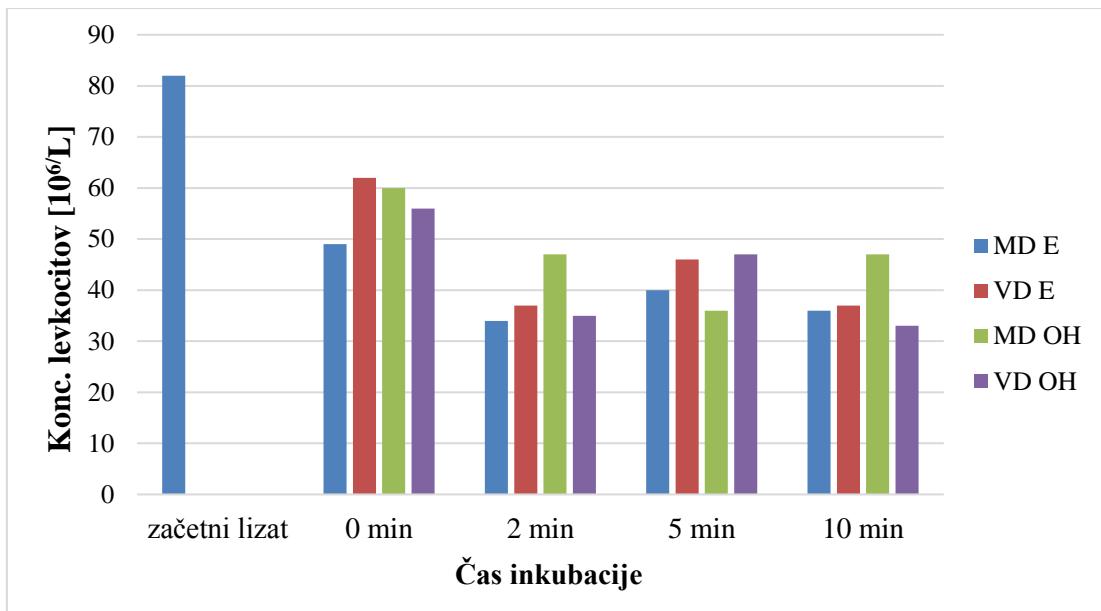
Začetna koncentracija levkocitov v lizatu: $128 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 12: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu in pufru PBS po inkubaciji diskov E in OH ter polimernega obročka

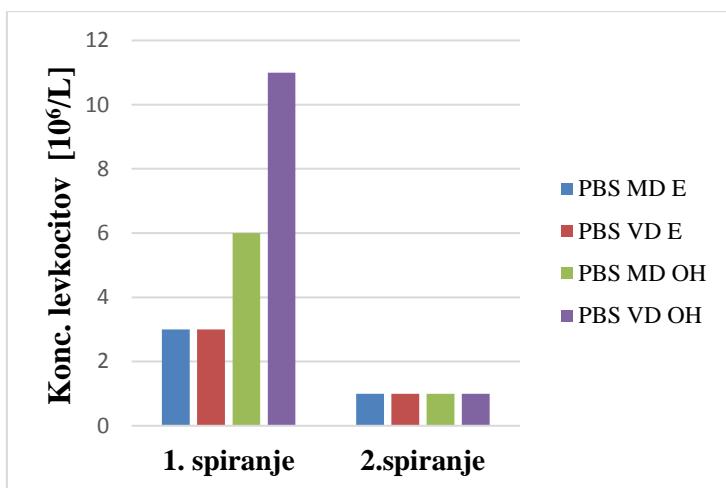
	Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]		Zmanjšanje števila levkocitov
	Lizat po inkubaciji	PBS po spiranju	
VD E, 2 min (2 ml)	50	23	156000
VD OH, 2 min (2 ml)	58	11	140000
Polimerni obroček, 2 min (400 μl)	49	0	316000
VD E, 5 min (2 ml)	34	-	188000
VD OH, 5 min (2 ml)	31	-	194000
Polimerni obroček, 5 min (400 μl)	29	-	396000

Koncentracija celic v lizatu po inkubaciji polimernega obročka je padala enako kot v ostalih primerih, v spiralnem pufru jih ni bilo (Tabela 12). Sklepali smo, da so se celice vezale na polimer, vendar je mikroskopski pregled obročka pokazal, da celic na plastiki ni.

Poskus smo ponovili še z epoksidnimi (E) in OH monoliti v obliki valjčka brez polimernega obročka (Slika 8). Male in velike valjčke smo inkubirali 0, 2, 5 in 10 minut, med tem smo jih rahlo stresali, po vsakem časovnem intervalu smo odpipetirali 200 μL lizata in izmerili koncentracijo s hematološkim analizatorjem z načinom merjenja telesnih tekočin. Sledilo je dvakratno spiranje monolitov za 10 minut v pufru PBS (Slika 9).



Slika 8: Časovna odvisnost koncentracije levkocitov v lizatu po inkubaciji monolitov brez polimernega obročka



Slika 9: Koncentracija levkocitov v spiralnem pufru PBS

Koncentracija levkocitov je zopet padala enako, tudi če monolit ni bil obdan s plastiko. Torej smo lahko izključili vezavo celic na polimerni obroč. Vnovič se je potrdilo, da ni bilo razlike med rezultati glede na površino kot tudi ne glede na kemijsko modifikacijo monolita. Ponovno pa smo ugotovili, da se koncentracija zmanjša takoj, kasneje z nadaljnjo inkubacijo ni bistvenih sprememb. To je olajšalo nadaljnje poskuse, ker čas inkubacije ni bistveno vplival na rezultate.

4.2.3 Vpliv premešavanja in sestave pufrja

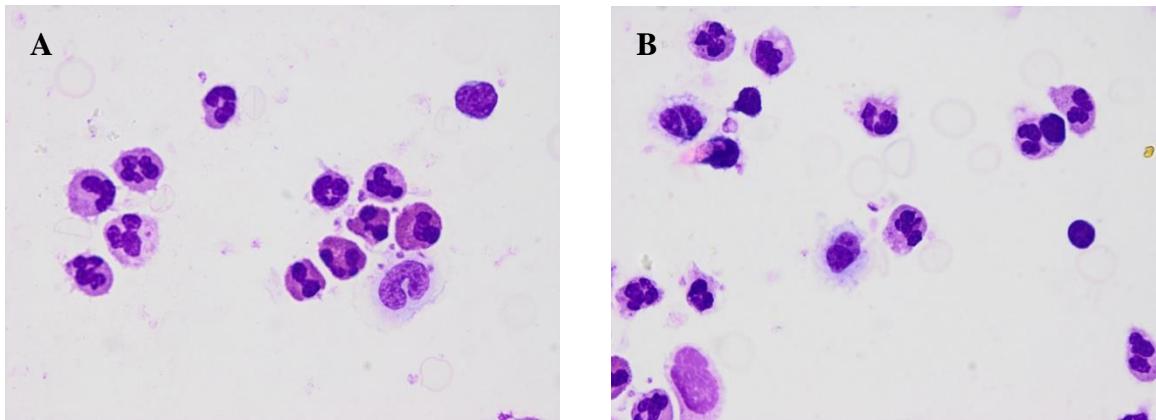
Po izločitvi vseh zunanjih vplivov smo sklepali, da gre razlog za izrazito padanje koncentracije levkocitov v merjenih raztopinah iskatи v samih raztopinah in ravnjanju z njimi. Zato smo uvedli slepo probu, ki je bila pri nas epruveta s krvnim lizatom, v katero nismo ničesar dodajali. Ponovili smo prejšnji poskus z dodatno epruveto - slepo probu (Slepa), čas inkubacije diskov je bil 0 in 5 min, čas spiranja diskov v pufru PBS pa 10 min (Tabela 13). Ker v spiralnem pufru PBS levkocitov nismo določili, rezultatov v nadaljevanju ne navajam posebej.

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu: $95 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 13: Zmanjšanje števila levkocitov pri uporabi slepe probe

	Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]	Zmanjšanje števila levkocitov	Zmanjšanje števila levkocitov glede na slepo probu
MD E, 0 min (1 ml)	32	63000	24000
MD QA, 0 min (1 ml)	25	70000	21000
Slepa, 0 min (1 ml)	56	39000	/
MD E, 5 min (0,8 ml)	39	44800	1600
MD QA, 5 min (0,8 ml)	25	56000	12800
Slepa, 5 min (0,8 ml)	41	43200	/

Iz rezultatov prikazanih v tabeli 13 smo ugotovili, da je koncentracija izrazito padala že v slepi probi, kjer diska sploh nismo inkubirali. Najprej smo preverili, če so mogoče celice razpadle, čeprav smo s pretočno citometrijo predhodno že dokazali, da so celice žive. Vseeno smo pripravili preparate iz lizata in pogledali strukturo levkocitov pod svetlobnim mikroskopom (Slika 10). Njihov pregled je ponovno pokazal, da so v vseh raztopinah številni nepoškodovani levkociti vseh podvrst.



Slika 10: Pregled levkocitov pod 400-kratno povečavo: A) slepa proba, B) lizat po inkubaciji z monolitom.

Glede na to, da celice niso razpadle, v slepi probi pa je koncentracija levkocitov izrazito padala, smo pomislili, da bi bil lahko problem v posedanju celic. Zato smo pred vsako naslednjo meritvijo s hematološkim analizatorjem vedno izvedli temeljito premešavanje.

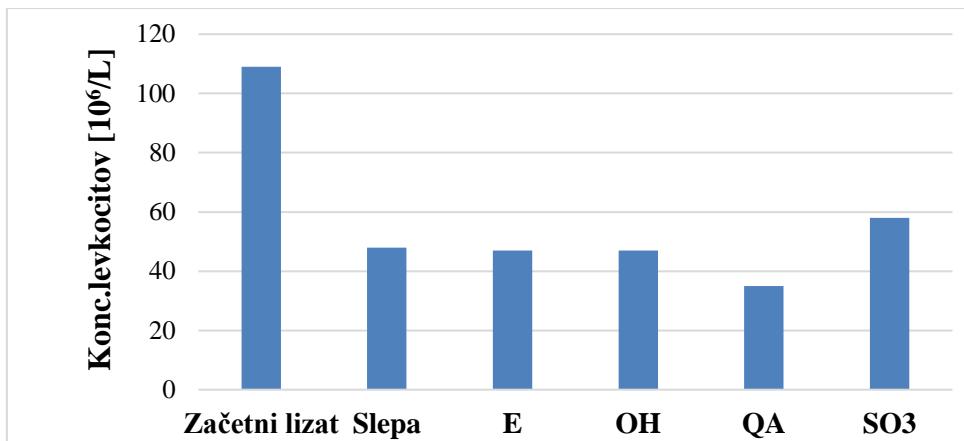
Tokrat smo ponovno uporabili vse diske s plastičnimi obročki: E, OH, QA in SO_3 in slepo probo (Tabela 14). Čas inkubacije je bil samo 5 min, po tem času smo diske odstranili, preostalo raztopino pa neposredno pred meritvijo na hematološkem analizatorju temeljito vorteksirali. Po opravljenih meritvah smo diske sprali v PBS 10 min, kjer pa levkocitov vnovič nismo določili.

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu: $109 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 14: Vpliv intenzivnega stresanja pred izvedbo meritev

	Levkociti [$\times 10^6/\text{L}$]	Zmanjšanje števila levkocitov glede na slepo probo
MD E, 5min (1 ml)	47	14000
MD OH, 5 min (1 ml)	47	14000
MD QA, 5 min (1 ml)	35	26000
MD SO_3 , 5 min (1 ml)	58	3000
Slepa, 5 min (1 ml)	48	61000*

*glede na začetni lizat



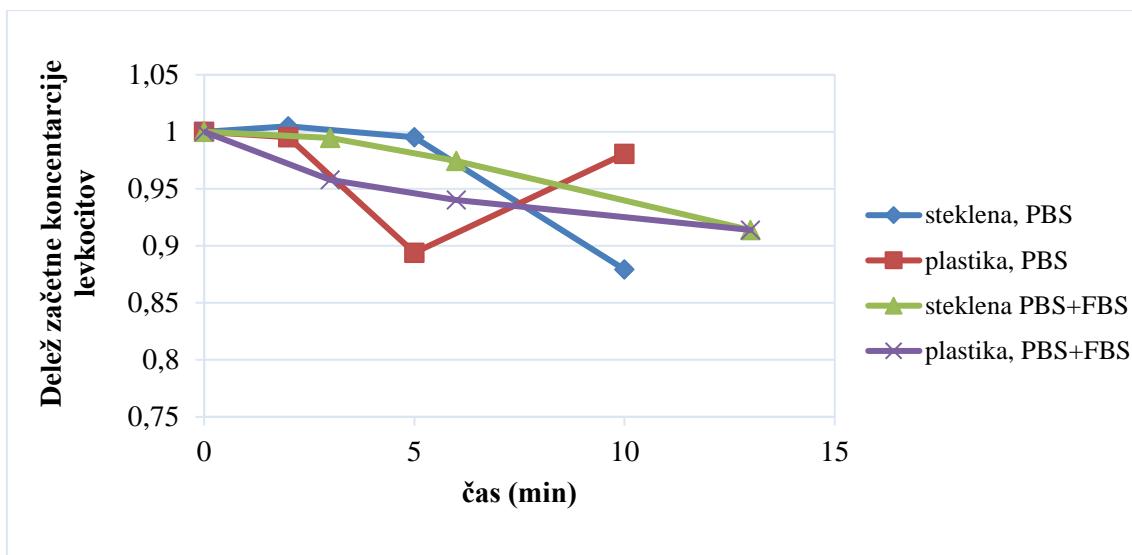
Slika 11: Primerjava koncentracije levkocitov v premešanem lizatu

Z vorteksiranjem smo zagotovili homogenost suspenzije, kar je potrdilo, da pri predhodnih poskusih premešavanje ni bilo zadostno. Rezultati na sliki 11 kažejo, da z upoštevanjem slepe probe koncentracija po inkubaciji diskov ostaja skoraj enaka, torej se celice nespecifično ne vežejo na diske. Vendar pa je kljub intenzivnemu premešavanju koncentracija celic v slepi probi padala, kar smo želeli razrešiti v nadalnjih poskusih.

Najprej smo preverili, če se celice lahko delno adsorbirajo na steno epruvet. Poskus smo izvajali v dveh vzporednih serijah, v prvi seriji smo imeli lizat v plastični epruveti, v drugi seriji smo uporabili stekleno epruveto. Koncentracijo levkocitov smo v plastični in stekleni epruveti merili v časovnih intervalih do 60 minut. Vzporedno smo v pufer PBS dodali FBS. FBS ali fetalni goveji serum vsebuje proteine, ki ugodno vplivajo na okolje celic. Med seboj smo prav tako primerjali padec koncentracije v slepi probi samo s PBS in slepi z dodatkom PBS+FBS (Slika 12).

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu s PBS: $415 \times 10^6/L$

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu s PBS+FBS: $569 \times 10^6/L$



Slika 12: Primerjava koncentracije levkocitov v stekleni in plastični epruveti ter primerjava dveh različnih lizatov brez in z dodatkom FBS

Ugotovili smo, da ni bistvene razlike v uporabi plastične epruvete od steklene, zato je za nadaljnje vseeno katero uporabimo. Čeprav razlike niso velike, pa slika 12 tudi pokaže, da z dodatkom FBS v PBS zagotovimo nekoliko bolj stabilno okolje, v katerem so meritve koncentracije levkocitov bolj zanesljive. Verjetno v raztopini zgolj s PBS prihaja do intenzivnejše agregacije celic. FBS sicer ne prepreči agregacije celic v celoti, vsaj v krajših časih pa zagotavlja ponovljive meritve.

Ponovno smo naredili poskus z inkubacijo diskov v krvnem lizatu s PBS+ FBS (Tabela 15). Uporabili smo epoksidne (E), QA, SO₃ male diske (MD) in polimerni obroček. Tokrat smo jih inkubirali samo 5 min. Za razliko od prejšnjih poskusov smo uporabili 2 različni koncentraciji – običajno, s koncentracijo okrog $100 \times 10^6/\text{L}$ in bistveno višjo, okoli $500 \times 10^6/\text{L}$. Spremembo smo uvedli zato, ker smo pričakovali tudi večjo razliko v koncentraciji.

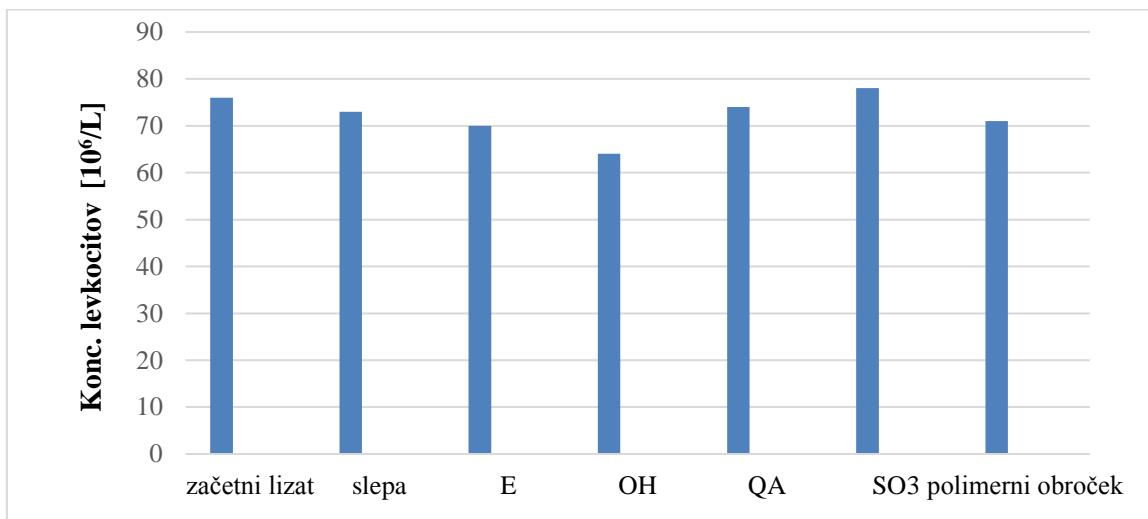
Začetna koncentracija levkocitov v lizatu1: $436 \times 10^6/\text{L}$

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu2: $76 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 15: Zmanjšanje koncentracije levkocitov v lizatu1 in lizatu2 s PBS+FBS

	Lizat1 po inkubaciji Lkc [$\times 10^6/L$]	Zmanjšanje št. levkocitov glede na slepo probo	Lizat2 po inkubaciji Lkc [$\times 10^6/L$]	Zmanjšanje št. levkocitov glede na slepo probo
MD E, 5 min (1 ml)	453	/	70	3000
MD OH,5 min (1ml)	430	/	64	9000
MD QA, 5 min (1 ml)	439	/	74	/
MD SO ₃ , 5 min (1 ml)	438	/	78	/
Polimerni obroček, 5 min (1 ml)	411	/	71	2000
Slepa, 5 min (1 ml)	459	/*	73	3000

*glede na začetni lizat



Slika 13: Koncentracija levkocitov v lizatu2 s PBS+FBS po inkubaciji različnih diskov

Dokazali smo, da ne prihaja do nespecifične vezave celic, saj smo se z upoštevanjem slepe probe približali začetni koncentraciji (Slika 13).

4.3 Poskus vezave levkocitov na protitelesa vezana na monolitne nosilce

Nedvoumna izključitev nespecifične vezave celic je bila predpogoj, da smo lahko nadaljevali s poskusi vezave na specifična protitelesa. V tem delu smo testirali diske, na katere so bila na eno površino imobilizirana protitelesa.

4.3.1. Vezava na diske z vezanimi protitelesi proti antigenu CD13

Najprej smo uporabili male epoksidne diske (MD E-CD13), na katerih so bila vezana protitelesa proti antigenu CD13, specifična za granulocite. Diske smo inkubirali v lizatu 10 minut, nato pa smo jih sprali v pufru PBS. Vzporedno smo delali z epoksidnim diskom brez protitels in slepo probo, na katero smo preračunali vse rezultate. Nato smo z diskov poskusili sprati morebitne vezane celice tako, da smo diske vstavili v posebno plastično ohišje, na katero je mogoče pritrditi injekcijsko brizgo. Lovili smo spiralni pufer (filtrat), ki smo ga brizgali preko diska. Rezultate prikazuje tabela 16.

Začetna koncentracija levkocitov (slepa): $267 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 16: Določanje levkocitov pri poskusu z malim epoksidnim diskom z vezanimi protitelesi proti CD13

	Lizat po inkubaciji $\text{Lkc} [\times 10^6/\text{L}]$	Zmanjšanje števila levkocitov	Levkociti $[10^6/\text{L}]$		
			PBS po spiranju	Filtrat1	Filtrat2
MD E (1 ml)	265	2000	24	21	-
MD E-CD13 (1 ml)	245	22000	0	7	7

Rezultati v tabeli 16 so pokazali, da se je na diske s protitelesi CD13 vezalo nekoliko več celic kot na diske brez protiteles. V pufru PBS in filtratu smo določili manj celic kot na diskih brez protiteles, torej jih s spiralno injekcijsko brizgo nismo uspeli odstraniti. Spiranje z injekcijsko brizgo se je izkazalo za neučinkovito in nerodno tehniko, saj nam je pufer uhajal, ker nismo mogli doseči enakomerno visokega tlaka. Prav tako smo ugotovili, da moramo sprati s pufrom brez dodatka FBS, ker proteini zamašijo pore v disku in s tem otežijo korak spiranja, pufer pa se peni.

Ker smo opazili, da gre za zelo malo število vezanih celic, smo nadalje uporabili velike diske (VD E-CD13) z večjo površino immobiliziranih protiteles proti CD13 (Tabela 17). Poskus smo izvedli s pomočjo koračne črpalke, ki omogoča nadzor pretoka. V rezultate smo dodali še delež polimorfonuklearnih celic (PMN) in mononuklearnih celic (MN), ki jih poda hematološki analizator. Izraz polimorfonuklearne celice pomeni, da je jedro sestavljeno iz več delov, sem štejemo granulocite. Med mononuklearne spadajo celice, kjer je jedro iz enega dela, to lastnost imajo limfociti in monociti. Vrednosti analizatorja so orientacijske.

Začetna koncentracija levkocitov (slepa): $124 \times 10^6/\text{L}$

Tabela 17: Določanje levkocitov pri poskusu z velikim epoksidnim diskom z vezanimi protitelesi proti CD13

	Lizat po inkubaciji			Zmanjšanje števila levkocitov	PBS po spiranju Lkc [$\times 10^6/\text{L}$]	Filtrat Lkc [$\times 10^6/\text{L}$]
	Lkc [$\times 10^6/\text{L}$]	PMN (%)	MN (%)			
VD E-CD13 (1 ml)	100	51	49	24000	0	0
VD E-CD13 (1 ml)	103	48,6	51,4	21000	0	1
VD E (1 ml)	111	49,6	50,4	13000	5	0

V obeh primerih je koncentracija levkocitov padla bolj v lizatu, kjer smo inkubirali diske z immobiliziranimi protitelesi, torej se je nanje vezalo več levkocitov kot na diske brez protiteles (Tabela 17). Hematološki analizator je pokazal, da se pri vseh poskusih glede na slepo probo zmanjšal delež granulocitov (PMN) in povečal delež MN, kar je skladno s tem, da so se iz lizata na disk (preko CD13) vezali samo granulociti. Poskus spiranja je bil zopet neuspešen, v filtratu ni bilo nič celic, to dejstvo smo potrdili tudi s pregledom pripravljenih preparatov pod mikroskop. V preparatih lizatov po inkubaciji in slepi probi so bile celice videti lepe in nepoškodovane.

4.3.2 Poskus vezave levkocitov na protitelesa proti antigenu CD20

Uporabili smo nove epoksidne diske z immobiliziranimi protitelesi proti antigenu CD20. Pripravili smo tri krvne lizate: pozitivno kontrolo iz vzorca krvi z zvečanim deležem limfocitov B (B-KLL), negativno kontrolo iz vzorca krvi s povišanimi deležem nevtrofilcev

in tretji lizat (Lizat3), ki je bil pripravljen s kombinacijo 500 µL krvi pozitivne kontrole in 500 µL krvi negativne kontrole (Tabela 18). Kronična limfocitna levkemija (B-KLL) je bolezen limfatične vrste, in sicer gre za novo tvorbo zrelih limfocitov B. Disk s protitelesi CD20 (E-CD20) in disk brez protiteles (E) smo inkubirali za 15 min v vseh treh celičnih lizatih. Po inkubaciji smo disk sprali v pufru PBS, zatem smo ga vstavili v nosilec in s koračno črpalko Harvard poskušali sprati vezane celice. Ker smo imeli samo en disk s protitelesi, smo ga v naslednjem poskusu vedno dobro sprali s pufrom PBS. Filtrate smo zbirali, in v njih izmerili koncentracijo levkocitov (Tabela 19).

Tabela 18: Začetna levkocitna krvna slika B-KLL in negativne kontrole

	Levkociti [× 10 ⁹ /L]	Nevtrofilci [× 10 ⁹ /L] (%)	Limfociti [× 10 ⁹ /L] (%)
B-KLL	83,52	2,62 (3,1)	79,37 (95,0)
Negativna kontrola	17,87	15,10 (84,5)	1,49 (8,3)

Tabela 19: Določanje levkocitov pri poskusu z E diskom z vezanimi protitelesi proti CD20

	Filtrat		
	Levkociti [× 10 ⁶ /L]	PMN (%)	MN (%)
B-KLL, VD E-CD20	3	25,0	75,0
B-KLL, VD E	4	0,0	100,0
Negativna kontrola, VD E-CD20	7	71,4	28,6
Lizat3, VD E CD20	2	50	50

Rezultati pozitivne kontrole na hematološkem analizatorju so pokazali, da se je delež MN v filtratu zmanjšal, na račun vezave limfocitov B na disk imobiliziran s protitelesi, v primerjavi z diskom brez protiteles kjer je ostal delež MN 100 % (Tabela 19). Test selektivnosti smo kontrolirali z lizatom3, kjer smo izmerili 50 % PMN in 50 % MN, kar je skladno s tem da smo med seboj zmešali pozitivno in negativno kontrolo v razmerju 1:1. Vendar pa je potrebno poudariti, da so vrednosti levkocitov tako majhne, da so rezultati v filtratu vprašljivi. Ponovno nam ni uspelo sprati celic, kar je pokazal tudi pregled preparatov filtrata pod mikroskop.

4.4 Dokazovanje vezanih celic na površino monolita z vezanimi protitelesi

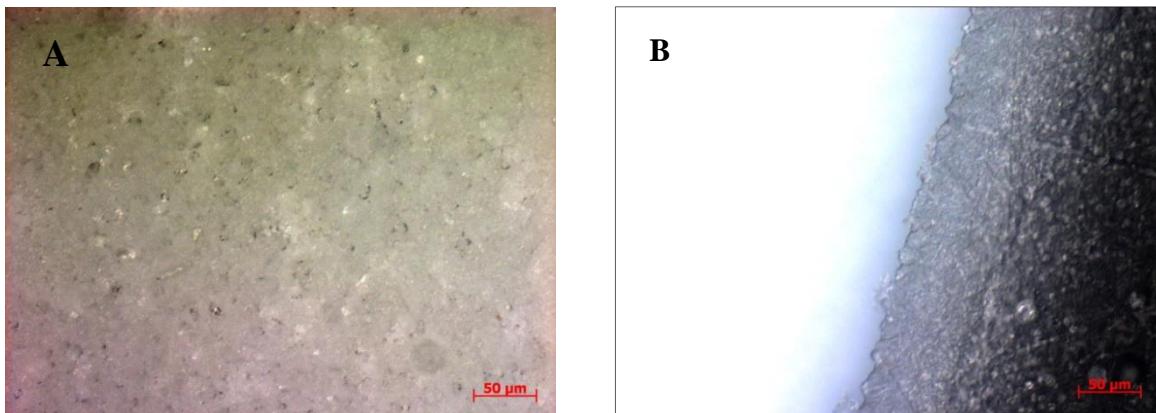
V vseh poskusih s protitelesi smo prišli do sklepa, da se celice z diska niso sprale, rezultati pa so kazali, da so se vsaj do neke mere vezale nanje. Zato smo hoteli ugotoviti, ali celice ostanejo vezane na površino diska. Zato je bilo potrebno najti način dokazovanja celic na površini.

Najprej smo poskusili s svetlobno mikroskopijo s predhodnim obarvanjem celic. Poskusa smo se lotili s pripravo krvnega lizata, z izjemo da lizata nismo veliko redčili (začetna koncentracija levkocitov je $tu \times 10^9/L$), ponovno smo imeli vzorec krvi bolnika s KLL. Diske smo inkubirali v lizatu 15 min, zatem smo jih sprali v PBS, nato smo jih položili za 5 minut v Turkovo raztopino gentianaviolet in pogledali pod mikroskopom, če se na površini vidijo limfociti (Tabela 20). Vse poskuse smo naredili vzporedno z diskom s protitelesi in brez protiteles. Poleg navadnih epoksidnih diskov smo imeli na razpolago še nove diske CDI (CDI E-CD20). Diski CDI imajo podaljšane verige, na katere se vežejo protitelesa, kar omogoča boljši dostop celic. Podaljšane verige brez protiteles v vodnem mediju tu razpadajo, zato ni bilo smisla imeti vzporedni poskus z diskom CDI. Po mikroskopiranju smo kot v prejšnjih poskusih diske namakali v PBS in morebitne vezane celice poskušali sprati s črpalko. Na koncu smo preverili tudi živost celic v začetnem lizatu z drugo metodo, tako da smo jih obarvali s tripanskim modrilom in prešteli v Neubauerjevi komori (Tabela 21).

Začetna koncentracija levkocitov v lizatu: $8,7 \times 10^9/L$

Tabela 20: Določanje levkocitov pri poskusu z epoksidnimi diskami z vezanimi protitelesi

	Lizat po inkubaciji Lkc [$\times 10^9/L$]	PBS po spiranju			Filtrat		
		Lkc [$\times 10^6/L$]	PMN (%)	MN (%)	Lkc [$\times 10^6/L$]	PMN (%)	MN (%)
VD E-CD20	4,76	4,7	12,8	87,2	9	77,8	22,2
VD E	6,04	20	10	90	3	66,7	33,3
VD CDI E-CD20	5,25	17	17,6	82,4	2	100	0
MD CDI E-CD20	4,5	45	22,2	77,8	0	0	0



Slika 14: Pregled diska z optičnim mikroskopom: A) površina diska, B) rob diska

Mikroskopiranje z optičnim mikroskopom Zeiss, ki je namenjen slikanju površin, se je izkazalo za neuspešno in nespecifično. Na diskih se ni videlo nič drugega kot groba površina (Slika 14). Vezanih celic nismo videli, ker niso bile obarvane. Pri barvanju celic s Turkovo raztopino in barvilom gentianaviolet se je nežno vijoličasto obarvala tudi bela površina diska. Metoda z optičnim mikroskopom je v praksi primerna predvsem za čisto ravne gladke in suhe materiale. V našem primeru smo disk poslikali težko, ker površina diska ni gladka, rahlo je nazobčana, prav tako je moral biti disk omočen s pufrom. Ravnino, na kateri naj bi bile vezane morebitne celice, smo zaradi porozne strukture diskov težko določili. Celice v lizatu po inkubaciji barvane s tripanskim modrilom in preštete v Neubauerjevi komori pod navadnim svetlobnim mikroskopom so bile žive in nepoškodovane, kar je bil ponovni dokaz, da monolitni nosilci niso citotoksični. Zopet nismo uspeli sprati nič celic, kar se je videlo tudi v preparatih pripravljenih s citocentrifugo. Rezultati deleža MN % v lizatu po inkubaciji so skladni s tem, da je bil lizat pripravljen z vzorcem krvi s KLL, hematološki aparat tu ni opredelil podvrste levkocitov. V filtratu se delež levkocitov nagiba v prid PMN %, kar je lahko posledica tega, da so se limfociti specifično vezali na disk in se zato delež MN % zmanjša, vendar pri tako nizkih koncentracijah rezultati niso ravno zanesljivi.

Tabela 21: Primer štetja levkocitov v Neubauerjevi komori in primerjava s koncentracijo levkocitov izmerjene s hematološkim analizatorjem

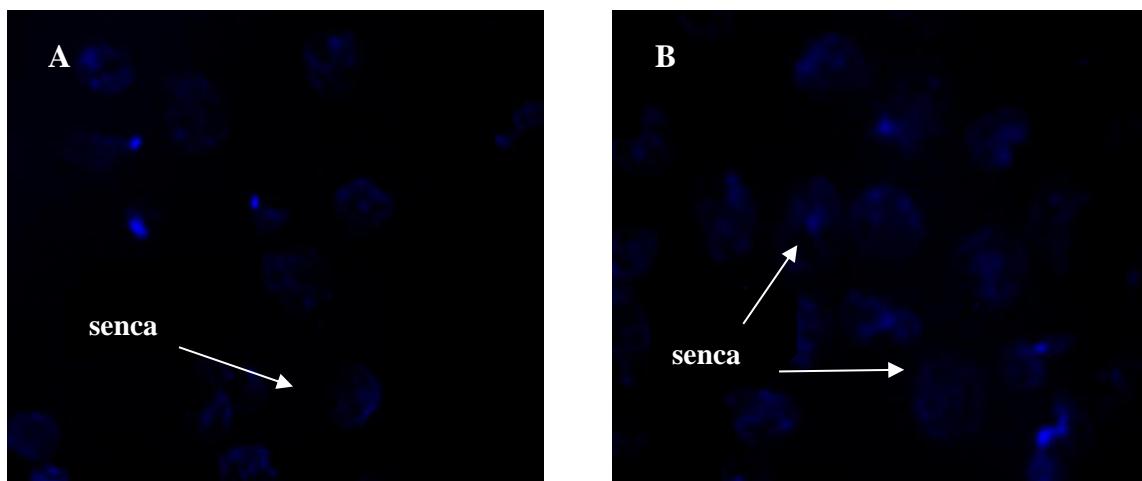
	Koncentracija levkocitov po štetju [$\times 10^9/L$]	Koncentracija levkocitov na analizatorju [$10^9/L$]
Lizat po inkubaciji CDI E CD20	4,5	4,5

4.5 Dokaz vezanih celic s fluorescenčno mikroskopijo

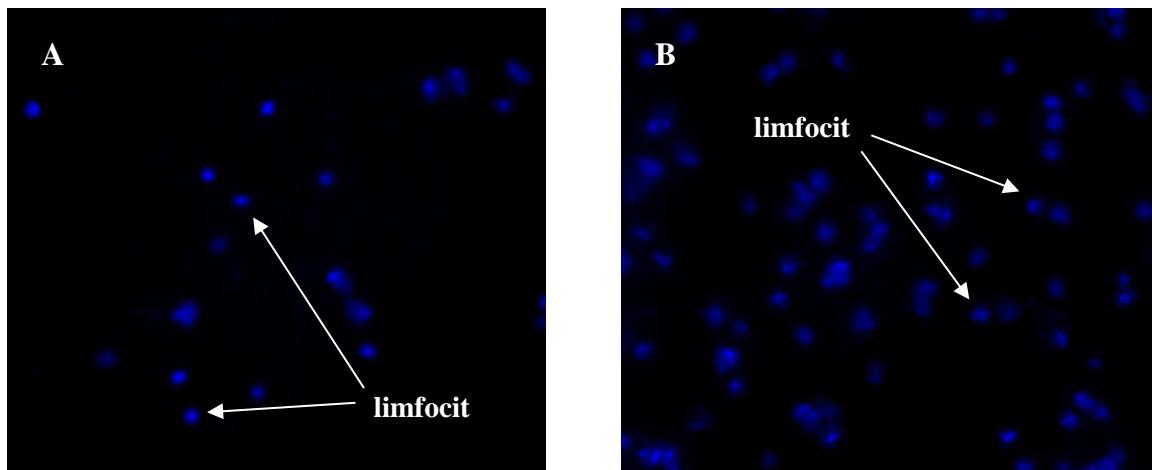
V zadnjem delu poskusa smo imeli na voljo tri velike epoksidne diske: disk s protitelesi CD20 immobilizirani na eni strani ($1\times E\text{-}CD20$), disk s protitelesi CD20 immobiliziranimi na obeh straneh ($2\times E\text{-}CD20$) in disk (E) brez protiteles. Po zaključeni inkubaciji v lizatu vzorca KLL smo diske inkubirali v PBS 10 min, tako so bili diskri pripravljeni za mikroskopiranje. Diske smo nato položili na objektno stekelce, na njih nanesli $10 \mu L$ barvila DAPI, počakali 30 sekund in pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom pri valovni dolžini 358 nm.

$1\times E\text{-}CD20$ disk smo po mikroskopiranju vključili v naslednjem poskusu, kjer smo ga ponovno za 10 minut inkubirali v istem krvnem lizatu s KLL in nato namakali v PBS za 10 min. Ta del poskusa je dodatno vključeval še morebitno odstranitev vezanih celic s pomočjo vstavite diska v plastično ohišje in spiranje z injekcijsko brizgo. Po spiranju smo zopet pogledali površino diska pod fluorescenčni mikroskop.

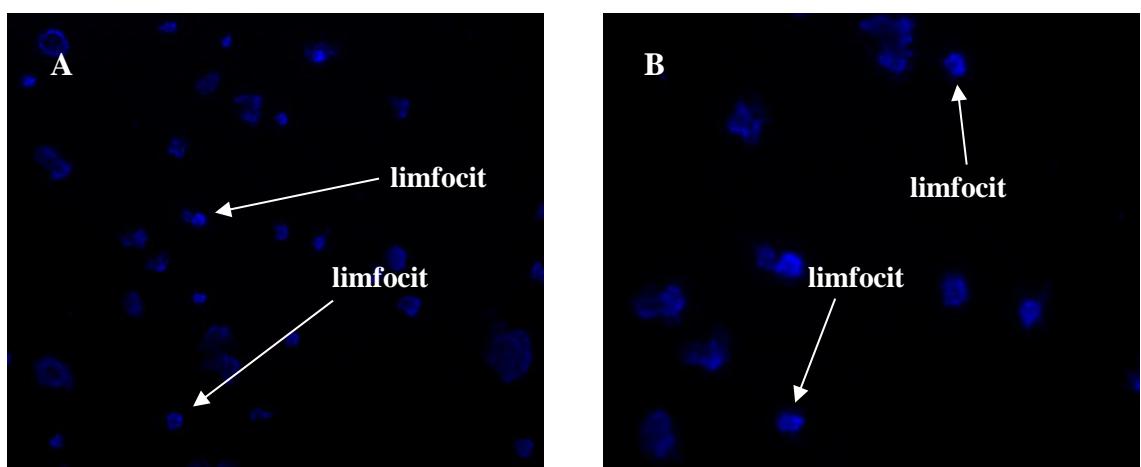
Vsem lizatom po inkubaciji, spiralnem pufru PBS ter končnemu filtratu smo izmerili koncentracijo levkocitov s hematološkim analizatorjem, rezultati so bili primerljivi s prejšnjim poskusom (Tabela 20). Zopet je koncentracija levkocitov v lizatu padla bolj tam, kjer smo inkubirali diske z immobiliziranimi protitelesi. Če smo primerjali začetno koncentracijo levkocitov s koncentracijo levkocitov v lizatu po inkubaciji diskov, smo ugotovili, da se ta zmanjša. Z upoštevanjem slepe probe smo ugotovili, da se vsa razlika v številu levkocitov verjetno vendarle ni vezala na disk. Zopet nismo sprali nič celic, kar je dokazovala zanemarljiva koncentracija levkocitov v filtratu.



Slika 15: Pregled diska brez protiteles pod fluorescenčnim mikroskopom:
A) 100-kratna povečava, B) 200-kratna povečava



Slika 16: Pregled 1×E-CD20 diska pod fluorescenčnim mikroskopom: A) 100-kratna povečava immobilizirane strani, B) 100-kratna povečava neimmobilizirane strani



Slika 17 : Pregled 1×E-CD20 diska po filtraciji z injekcijsko brizgo: A) 100-kratna povečava neimmobilizirane strani, B) 200-kratna povečava neimmobilizirane strani

Za slikanje smo uporabili velike diske, zato ker se je pri malih pokazalo, da se na njihovih robovih sipa svetloba, kar ovira njihovo opazovanje z mikroskopom. Na površini epoksidnih diskov brez protiteles ni bilo skoraj nič celic, opazili smo sence, kar pa niso bile celice (Slika 15). Ta disk smo zato lahko imeli za dobro primerjavo z diskim z immobiliziranimi protitelesi, na katerih smo opazili jedra celic. Na $1\times$ E-CD disku je bilo zelo veliko celic na tisti strani, ki ni bila immobilizirana s protitelesi (Slika 16B). Celice so bile na immobilizirani strani redkejše, ravno obratno kot smo pričakovali (Slika 16A). Tu se nam je odprlo vprašanje, ali je verjetno, da kapilarni vlek povzroči kopiranje protiteles na drugi strani? Struktura diska je porozna in velikost por bi lahko omogočila prehajanje protiteles na drugo stran. Sklepamo lahko, da se protitelesa pri inkubaciji usedejo na določeno stran. Vsekakor bi bilo potrebno to raziskati z nadaljnji poskusi, ker je od tega, na kateri strani so celice, odvisna smer spiranja. Po filtraciji $1\times$ E-CD20 diska z injekcijsko brizgo so na neimmobilizirani strani limfociti še vedno ostali vezani, kar je dokaz, da jih nismo uspeli odstraniti (Slika 15). Tu smo upoštevali, da so celice vezane bolj na neimmobilizirani strani, smer spiranja je bila v tem delu poskusa ravno obratna kot pri prejšnjih poskusih, saj smo z mikroskopom dokazali, na kateri strani so bile celice. Na diskih z immobiliziranimi protitelesi CD20 zagotovo lahko trdimo, da gre za celice, ki ustrezajo limfocitom. Limfociti imajo okrogla jedra, kar ustreza jedrom z grudasto kromatinsko strukturo z malo citoplazme, ponekod so imeli limfociti razrahljana jedra. V tem delu poskusa smo našli in potrdili metodo za prepoznavanje celic na diskih. Zagotovo lahko trdimo, da so na diskih z immobiliziranimi protitelesi CD20 vezani limfociti, na diskih brez protiteles pa ne.

5. SKLEPI

Pri razvoju metode ločevanja krvnih celic na konvektivnih poroznih nosilcih smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Najbolj primeren izhodiščni biološki vzorec je krvni lizat, pripravljen z dodatkom FBS k pufru, ki levkocitom zagotavlja stabilnejše okolje. Venska kri z EDTA in razredčena venska kri sta zaradi eritrocitov neprimerna vzorca, ker eritrociti motijo vezavo levkocitov na površino diskov.
- S hematološkim analizatorjem lahko zaznamo spremembo v koncentraciji levkocitov pred in po inkubaciji diska v suspenziji. Primerljiva metoda je tudi pretočna citometrija, vendar je zamudna in cenovno neugodna. Hematološki analizator tako lahko služi v nadalnjih poskusih ločevanja krvnih celic na monolitnih nosilcih.
- Pred eksperimenti s celicami morajo biti diskri ultrazvočno obdelani, saj tako zagotovimo njihovo ustrezno čistost. Pred poskusi je diske potrebno vedno očistiti z namakanjem v PBS ali s spiranjem z injekcijsko brizgo. Polimerni delci sicer motijo meritev na analizatorju.
- Pred merjenjem koncentracije na aparatu moramo vzorec dobro premešati na vorteksu, s tem zagotovimo homogenost suspenzije. Kljub mešanju in dodatku FBS v PBS prihaja do agregacije levkocitov, zato je potrebno vedno uporabiti tudi slepo probu.
- Med krvnimi celicami in monolitnim materialom ne prihaja do nespecifičnih interakcij. Velikost diskov, različne kemijske modifikacije diskov, struktura epruvete in polimerni obroč ne vplivajo na rezultate meritev.
- Monolitni diskri na krvne celice ne delujejo citotoksično. To smo dokazali s pretočno citometrijo, pripravo preparatov s citocentrifugo in štetjem obarvanih celic s tripanskim modrilom v Neubauerjevi komori.
- Poskusi diskov z immobiliziranimi protitelesi so pokazali, da se celice specifično vežejo na diske. Optično mikroskopiranje in standardno barvanje levkocitov se je izkazalo za neuspešno. S fluorescenčno mikroskopijo, kjer so celice označene z barvilom DAPI, smo uspeli mikroskopsko opazovati celice na površini diskov. Dokazali smo specifično vezavo limfocitov na diske s protitelesi CD20 in hkrati s slepim diskom potrdili, da nespecifičnih interakcij ni.
- Ni nam uspelo sprati celic z diskov. Zato bi bilo potrebno nadaljevati poskuse tako z modifikacijo monolitov, kot s postopki spiranja. Smo pa v tem delu razvili orodja za nadaljnji razvoj teh postopkov.

6. LITERATURA

1. Kocijančič A, Mrevlje F, Andoljšek D: Interna medicina, Druga dopolnjena izdaja, DZS, Ljubljana, 1998: 1037-1045,1049
2. Podgornik H, Pretnar J, Černelč P: Atlas krvnih celic, Slovensko društvo za hematoonkološko diagnostiko, Ljubljana, 2013: 9-45
3. <http://www.szkklm.si/si/vsebina/projekti-zdruzenja/delovne-skupine/predlog-poetenjenja-okvirnih-referencnih-vrednosti-za-parametre-krvne-slike-za-odrasle>.
Dostopno: julij 2017
4. Kotnik V: Imunološki priročnik, Inštitut za mikrobiologijo, Ljubljana 2010, str. 75
5. https://sl.wikipedia.org/wiki/Ozna%C4%8Devalec_pripadnosti. Dostopno: maj 2017
6. Böyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl 1968; 21: 77-89
7. Esser C: Historical nad useful methods of preselection and preparative scale sorting, Cell separation methods and applications: New York, United States of America, 1998: 1-14
8. Tomlinson M J, Tomlinson S, Yang X B, Kirkham J: Cell seperation: Terminology and practical considerations. J. Tissue Eng. 2012; 4: 1-4
9. Diogo M M, da Silva C L, Cabral J M S: Seperation Technologies for Stem Cell Bioprocessing. Biotechnol. Bioeng. 2012; 109: 2699-2709
10. Schwartz J, Winters J L , Padmanabhan A , Balogun R, Delaney M, Linenberger M L , Szczepiorkowski Z A , Williams M E, Wu Y and Shaz B H: Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the writing committee of the American society for apheresis: The sixth special issue. J. C. A. 2013; 28: 145-284
11. Lennon D P and Caplan A I: Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp.Hem. 2006; 34: 1604-1065
12. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells 2006; 24: 1294-1301
13. Thomas T E, Miller C L, Eaves C J: Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. Methods 1999; 17: 202-218

14. Brown M, Wittwer C: Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* 2000; 46:1221-1229
15. Grutzkau A, Radbruch A: How the MACS technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A* 2010: 643–647
16. Handgretinger R, Lang P, Ihm K, Schumm M, Geiselhart A, Koscielniak E, Hero B, Klingebiel T, Niethammer D: Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34(+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone marrow transplant.* 2002; 29: 731-736
17. Ettre L S: Nomenclature for chromatography (IUPAC recommendations 1993). *PAC* 1993; 65: 819-872.
18. Braithwaite A, Smith F J: Chromatographic methods, 5th ed., Blackie Academic & Professional, London, 1996: 1-16
19. Miller J M: Chromatography: Concepts and contrasts. 2nd ed. Wiley, New Jersey, 2005: 423-461
20. Kumar A, Plieva F M, Galeav I Y, Mattiasson B: Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *J. Immunol. Meth.* 2003; 283: 185-194
21. Johnsen H E , Hutchings M , Taaning E, Rasmussen T, Knudsen L M , Hansen S W, Andersen H, Gaarsdal E, Jensen L, Nikolajsen K, Kjaesgård E, Hansen N E: Selective loss of progenitor subsets following clinical CD34+ cell enrichment by magnetic field, magnetic beads or chromatography separation. *Bone marrow Transplant.* 1999; 24: 1329-1336
22. Podgornik A, Lendero Krajnc N: Application of monoliths for bioparticle isolation. *J. Sep. Sci.* 2012; 35: 3059-3072
23. Jungbauer A, Hahn Rainer: Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology. *J. Sep.Sci.*, 2004; 27: 767-778
24. Strancar A, Podgornik A, Milos B, Necina R: Short Monolithic Columns as Stationary Phases for Biochromatography. *Biotechnol.* 2002; 76: 49-82
25. Barut M, Podgornik A, Urbas L, Gabor B, Brne P, Vidic J, Plevcak S, Štrancar A: Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles. *J. Sep. Sci.* 2008; 31: 1-14

26. <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-1000R-Hematology-Analyzer.aspx>. Dostopno: julij 2017
27. <http://www.beckman.com/coulter-flow-cytometry/instruments/flow-cytometers/fc-500-series>. Dostopno: julij 2017
28. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Mikroskop>. Dostopno: avgust 2017
29. https://sl.wikipedia.org/wiki/Konfokalni_mikroskop. Dostopno: julij 2017
30. https://sl.wikipedia.org/wiki/Fluorescentni_mikroskop. Dostopno: julij 2017
31. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>. Dostopno: julij 2017
32. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika 1, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 24-26, 63-76