

Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 120 cm
w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.

Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

Zespół realizujący badania:

.....
dr hab. Sylwia Wrotek

.....
dr Tomasz Jędrzejewski

.....
dr Jakub Piotrowski

.....
prof. dr hab. Wiesław Kozak

1. Ocena konstrukcji komory, jakości użytych materiałów, ergonomii pracy oraz łatwości przeprowadzania dekontaminacji podczas prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych oraz w trakcie wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

1.1. Ocena konstrukcji komory laminarnej oraz ergonomii pracy pod komorą

Ocena stabilności komory

Egzemplarz komory dostarczony do testowania wyposażony był w ruchomy statyw na kółkach. Mimo, iż takie rozwiązanie umożliwia swobodne przesuwanie komory laminarnej w laboratorium nawet jednemu eksperymentatorowi, to sprawia również, iż cała konstrukcja nie jest stabilna. Tym bardziej, jeśli stoi na płytkach, które są standardem wykończenia większości pracowni i często nie są idealnie wypoziomowane. Testowana komora chwiała się nawet przy niewielkiej ingerencji. Biorąc pod uwagę rygorystyczne przepisy BHP, które nakazują mocowanie do ścian wszystkich sprzętów, które chwieją się lub mogą się przewrócić (dla przykładu butle z gazami), również komora laminarna na stelażu ruchomym powinna być do ściany przymocowana, co niejako przekreśla użyteczność takiego rozwiązania.

Ocena łatwości montażu poszczególnych elementów i zakresu regulacji położenia blatu roboczego

Testowana komora wyposażona była w jednolity (niedzielony) blat roboczy. Choć dobór konstrukcji blatu zależy od preferencji eksperymentatora i jego przeznaczenia, to każde rozwiązanie niesie za sobą korzyści i wady. Blat jednolity zabezpiecza przed spływaniem cieczy, jest łatwiejszy w codziennym utrzymaniu czystości pracy, a odpowiednio wypoziomowany jest stabilniejszy. Wadą takiego rozwiązania jest natomiast duża waga i nieporęczność. Aby wyjąć blat spod komory w celu dokładnej dekontaminacji potrzebne są co najmniej dwie osoby i duża przestrzeń w laboratorium, aby swobodnie nim manewrować.

Blat roboczy w testowanej komorze laminarnej był również niespasowany do rozmiarów otworu w panelu przednim, przez co przy wyjmowaniu rysował krawędzie boczne.

Dostarczona do testów komora nie posiadała możliwości regulacji wysokości położenia blatu roboczego, choć wyposażona była w oprogramowanie przewidziane do sterowania tą funkcją. Wysokość położenia blatu roboczego jest odpowiednia, jednak wyższe osoby mogą mieć problem podczas długotrwałego korzystania z urządzenia. Uważamy, iż wyposażenie komory w statyw umożliwiający regulację wysokości położenia blatu roboczego w znacznym stopniu przyczyni się do poprawienia ergonomii pracy z urządzeniem.

Ocena rozmiaru i wykonania blatu roboczego

Duża powierzchnia blatu roboczego w stosunku do rozmiarów komory pozwala na komfortową pracę. Dostępność do wszystkich materiałów standardowo umieszczanych pod komorą podczas pracy doświadczalnej jest bardzo dobra. Błat roboczy został wykonany bardzo solidnie, nie ugina się podczas pracy.

Ocena ilości i umiejscowienia gniazd zasilających, ich zabezpieczenie, położenie oraz szczelność zabezpieczenia otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika

Gniazda zasilające w dostarczonej komorze zostały zaprojektowane w wystarczającej ilości oraz rozmieszczone w prawidłowy sposób, który umożliwia wygodne z nich korzystanie. Same gniazda zostały bardzo dobrze zabezpieczone przed ewentualnym zachlapaniem. Zastosowane zaślepki bardzo dobrze izolują również wewnętrzną część gniazd od wnętrza komory. Testowana komora nie zawierała otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika. Wyposażona została w dwa krany doprowadzające gaz. Sugerujemy, aby wraz z kranami dostarczane były odpowiednie nasadki, które można by na nie założyć w celu zabezpieczenia otworów w kranach, których nie da się odpowiednio zdezynfekować. Pozostawienie tych otworów bez zabezpieczenia może stanowić niszę dla rozwoju drobnoustrojów. Sugerujemy również, aby wyposażenie komory w krany było opcjonalne dla kupującego.

Natomiast gniazda USB nie zostały w żaden sposób zabezpieczone, a ich centralne umiejscowienie może zwiększyć ryzyko, iż staną się źródłem zakażenia drobnoustrojami lub zostaną uszkodzone (zachłapane lub zalane) podczas dekontaminacji komory a nawet podczas jej użytkowania.

Ocena funkcjonalności panelu sterującego pracą komory

Dostarczona do testów komora wyposażona została w dotykowy panel sterujący stanowiący jednocześnie wyświetlacz monitorujący parametry pracy jak również w tradycyjny sterownik. Pracę z panelami sterującymi oceniamy bardzo wysoko i nie napotkaliśmy na problemy podczas pracy. Panel dotykowy jest bardzo responsywny nawet, gdy użytkownik ma założone rękawiczki. Czytelność wyświetlacza jest również bardzo dobra, pod różnymi kątami widzenia. Obsługa panelu jest prosta i intuicyjna, zapoznanie się z nią zajmuje kilka minut. Wskaźniki monitorowania przepływu powietrza jak również czujniki temperatury działają bezproblemowo. Sugerujemy jednak, aby zmienić nieco interface wyświetlacza, tak by wspomniane wyżej wskaźniki zajmowały mniej miejsca lub były ukryte w menu (dla przykładu z możliwością ich ukrycia lub przywrócenia na wyświetlacz). To sprawi, że elementy związane

ze sterowaniem pracą komory będą mogły być większe. Przesuwanie ikon sterowania pracą komory w menu sprawiało bowiem małe problemy osobom o grubszych palcach, które zamiast trafić w symbol strzałki uruchamiały przypadkowo opcję z menu. Sugerujemy również dodanie monitorowania stanu zużycia filtrów powietrza. Umożliwi to użytkownikowi odpowiednio wcześniej zaopatrzenie się w zestaw filtrów do wymiany, aby zachować ciągłość pracy badawczej.

Nie widzimy również zastosowania dla panelu monitorowania stanu komory umieszczonego pod samą komorą, tym bardziej, iż nie jest możliwe sterowanie pracą komory za jego pomocą. Mógłby on służyć do wyłączania światła (podczas dodawania substancji światłoczułych) bez konieczności wyjmowania ręki spod komory, jednak musiałby zostać zmieniony na panel dotykowy.

Ocena zabezpieczenia przestrzeni wewnętrznej komory po całkowitym zamknięciu

Po zamknięciu otworu roboczego szyba bardzo szczelnie przylega do uszczelki całkowicie izolując wnętrze komory od otoczenia. Zastosowane rozwiązanie konstrukcyjnie oceniamy bardzo wysoko. Nawet po pozostawieniu komory zamkniętej na kilka dni nie zaobserwowaliśmy, aby wewnątrz gromadziły się drobiny kurzu.

Ocena skuteczności działania blokad położenia panelu przedniego

Panel przedni komory prawidłowo blokuje się na odpowiedniej wysokości zgodnie z opcją wybraną w menu. Nie napotkaliśmy na problemy podczas użytkowania komory.

Ocena głośności komory i jakości oświetlenia

Zastosowane w komorze oświetlenie bardzo dobrze i równomiernie oświetla całą powierzchnię komory jednocześnie nie męcząc oczu eksperymentatora.

Komora w trybie pracy jest stosunkowo cicha, w porównaniu tak do komory testowej o szerokości 180cm jak i konkurencyjnych urządzeń. Pozwala to na komfortowe komunikowanie się dwóch osób, które jednocześnie pod nią pracują i nie przeszkadza w prowadzeniu niezależnych eksperymentów w pomieszczeniu laboratoryjnym.

Ocena działania alarmów zaburzenia laminarnego przepływu powietrza, braku zasilania i niewłaściwego położenia panelu przedniego i przerwania procedury naświetlania lampą UV

Testowana komora w prawidłowy sposób informuje o problemach z przepływem powietrza. Wyświetla również informacje alarmowe, jeśli proces naświetlania lampą UV zostanie

zakłócony. Sygnał dźwiękowy jest donośny, słyhać go nawet z sąsiedniego pomieszczenia, co pozwala szybko zareagować na problem. Podobnie, wyświetlana jest również informacja alarmowa, jeśli pojawił się problem z zasilaniem. Natomiast komora nie wydaje dźwięku alarmującego o braku zasilania. Sugerujemy, aby wyposażyć komorę w taki system, pozwala on bowiem szybko zareagować eksperymentatorowi.

System automatycznego sterowania pracą komory, który oceniamy bardzo wysoko niesie za sobą jednak problem. W przypadku braku zasilania nie ma możliwości mechanicznego zamknięcia komory i zabezpieczenia jej wnętrza przed utratą sterylności.

Przy włączonym oświetleniu nie widać migającej na czerwono diody alarmowej. Sugerujemy, aby wprowadzić zmiany w oprogramowaniu sterującym oświetleniem tak, aby światło diody alarmowej było bardziej zauważalne dla eksperymentatora.

1.2. Ocena wytrzymałości materiałów na środki chemiczne stosowane do dezynfekcji oraz na zarysowania. Ocena łatwości przeprowadzenia dekontaminacji komory.

Ocena wytrzymałości materiałów, z których wykonano komorę na dekontaminację

Przez cały okres prowadzonych testów elementy komory były poddawane działaniu środków stosowanych do dezynfekcji chemicznej:

- 70% alkoholu etylowego,
- preparatu Neodisher,
- preparatu Puresept,
- preparatu Meliseptol,
- łagodnego mleczka do czyszczenia.

Wymienione środki chemiczne nanoszone były bezpośrednio na czyszczone powierzchnie, rozprowadzane za pomocą ręczników papierowych i wycierane do sucha.

Zastosowane środki chemiczne nie pozostawiły trwałych śladów na powierzchni elementów komory. Natomiast czarne uszczelki doszczelniające boczne szyby komory, pozostawiały czarne pozostałości na papierze.

Ocena łatwości demontażu elementów blatu roboczego

Testowana komora laminarna wyposażona została w jednolity blat roboczy. Z tego względu element ten jest ciężki i wymaga co najmniej dwóch osób do demontażu i montażu. W testowanym egzemplarzu nie został on również spasowany z otworem przednim komory, przez

co przy wyjmowaniu i wkładaniu przyciera boczne ścianki otworu przedniego, co w konsekwencji prowadzi do zarysowania obu elementów (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 1).



Fot. 1 Zarysowane elementy obudowy przez blat roboczy

Sam blat, ze względu na znaczne rozmiary jest dość trudny w czyszczeniu, tym bardziej, iż laboratoria nie są wyposażane w bardzo duże zlewy. Nie zawiera on jednak trudno dostępnych miejsc, a otwory i krawędzie są prawidłowo wykonane chroniąc przed skałeczeniem.

Sugerujemy również nawiercenie dodatkowych otworów w blacie roboczym ułatwiających wyjmowanie i wkładanie go do komory. Przykładowy otwór (zamieszczony na Fot. 2), w który wyposażona jest komora Thermo Sci MSC Advantage użytkowana w Zakładzie Immunologii UMK przedstawiono na zdjęciu poniżej:



Fot. 2 Element blatu roboczego z otworem ułatwiający wyjmowanie i wkładanie w komorze Thermo Sci MSC Advantage

Ocena łatwości przeprowadzenia procesu dezynfekcji chemicznej komory

Konstrukcja komory została dobrze przemyślana, w związku z powyższym ilość trudno dostępnych miejsc jest ograniczona a czyszczenie komory nie sprawia problemów. Znacznie lepiej niż w przypadku testowanego modelu o długości 180cm zaprojektowano przestrzeń między blatem roboczym a panelem przednim. Jest ona łatwiejsza w czyszczeniu, choć podobnie, należy zachować również szczególną uwagę, aby nie uszkodzić czujnika poziomu opuszczenia komory w prawym dolnym rogu.

Gniazda elektryczne są dobrze zabezpieczone a ich dokładne wyczyszczenie nie sprawia trudności. Sugerujemy jednak, aby umieszczane były wyżej tak, aby stojące pod komorą materiały nie utrudniały do nich dostępu. Problem stanowią również niezabezpieczone otwory w kranikach, które są trudne do wyczyszczenia.

Bardzo wysoko oceniamy możliwość łatwego otwarcia górnego panelu chroniącego szybę przednią, który pozwala na dokładne jej wyczyszczenie.

Ocena wytrzymałości blatu roboczego na zarysowania

Materiał, z którego wykonano blat roboczy cechował standardową odpornością na zarysowania, w przeciwieństwie do blatu, w który wyposażona była testowana komora o długości 180cm, który oceniamy wyżej. Co więcej, podczas wykonywania procedur dekontaminacji, blat po przetarciu bardzo brudził papier. Może to świadczyć o utlenianiu się metalu w miejscu powstałych zarysowań. Badania prowadzone w Zakładzie Immunologii wykazują, iż takie zarysowania stanowią nisze sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów. Sugerujemy zatem zmianę materiału, z którego wykonany jest blat roboczy lub pokrycie go odpowiednią warstwą zabezpieczającą.

Dodatkowe uwagi

Powierzchnia, z której wykonany jest filtr sufitowy uniemożliwia użycie środków chemicznych używanych do dezynfekcji.

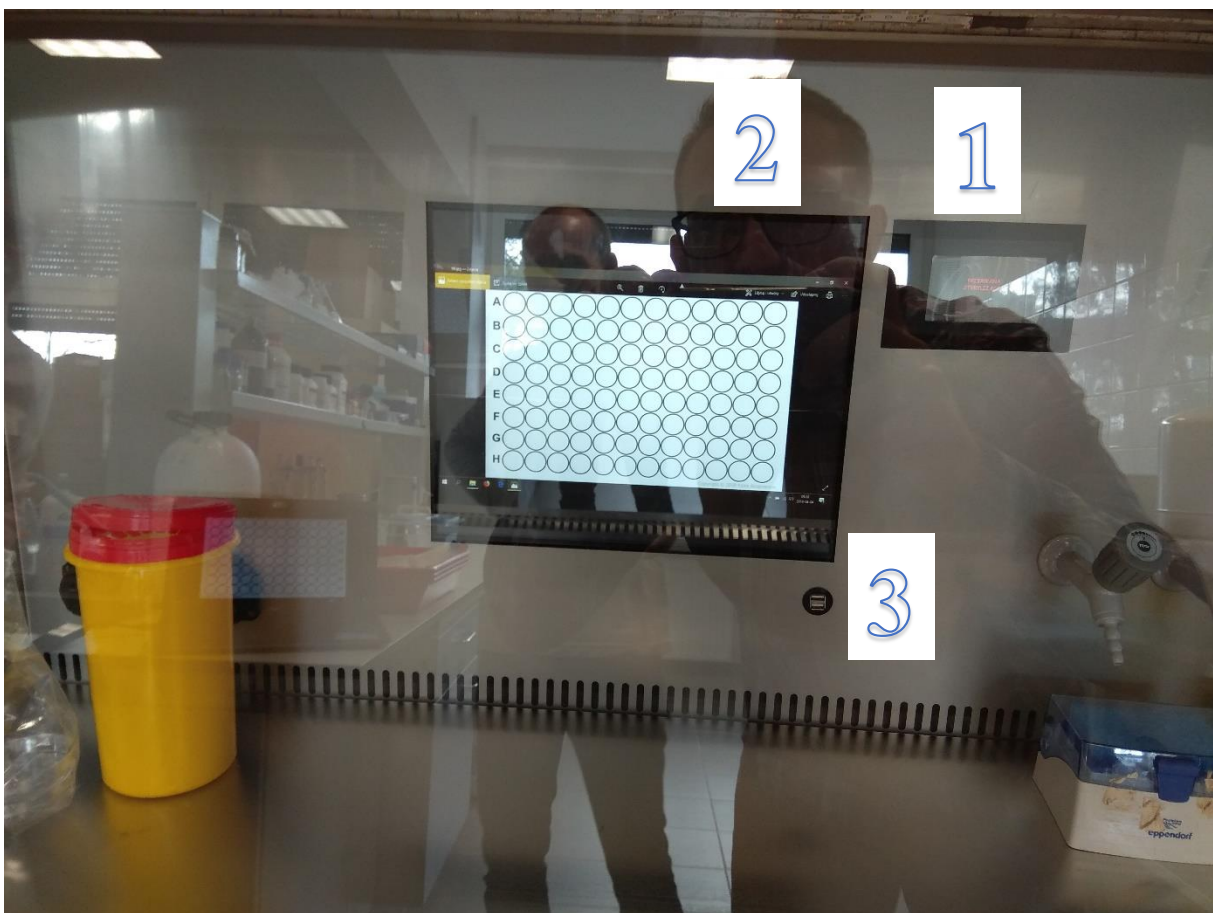
Nie widzimy zastosowania i tym samym zasadności umieszczenia panelu monitorowania stanu komory (na Fot. 3 oznaczony jako 1). Sugerujemy zmianę funkcjonalności panelu.

Sugerujemy również przeniesienie portu USB (na Fot. 3 oznaczony jako 3) z wnętrza komory, gdzie może stanowić źródło zakażenia lub ulec uszkodzeniu (zachlapaniu) na bok komory lub inne łatwo dostępne miejsce. Sugerujemy również zmianę funkcjonalności tego portu. Jak sądzimy, służy on do podłączenia myszki lub klawiatury, jednak są to urządzenia pełne

zakamarków i mogą stanowić źródło zakażenia, stąd też nie rozumiemy, dlaczego istniałaby konieczność umieszczania ich pod komorą.

Jeśli port USB pozwalałby natomiast na wyświetlanie plików graficznych lub tekstowych na ekranie (na Fot. 3 oznaczony jako 2), a ekran ten byłby ekranem dotykowym umożliwiającym przeglądanie plików, stanowiłoby to rewolucyjne i znakomite rozwiązanie. Umożliwiłoby to eksperymentatorowi wyświetlanie instrukcji do doświadczeń lub „layoutów” płytek hodowlanych. Kartki z wydrukiem takich dokumentów są najczęściej przyklepane magnesami do komory i eksperymentator musi odchyłać głowę, aby się z nimi zapoznać.

Testowaną komorę wyposażono natomiast w wyjście VGA, którego umiejscowienie na górze komory sprawia, że trzeba wejść na drabinę, aby podłączyć do niego komputer. Port VGA sprawia również, iż konieczne jest zastosowanie odpowiedniej przejściówki/adaptera, bowiem większość współczesnych komputerów wyposażona jest w port HDMI.



Fot.3 Ściana tylna komory z ekranem, portami USB i ekranem monitorowania parametrów komory

2. Analiza skuteczności działania filtrów powietrza i lampy ultrafioletowej w trakcie prowadzenia hodowli linii komórkowych i wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

2.1. Ocena skuteczności działania filtrów powietrza

Ocena skuteczności działania komory obejmowała sprawdzenie laminarnego przepływu powietrza po umieszczeniu w niej materiałów (pudełka z końcówkami, pipety automatyczne, wytrząsarka laboratoryjna, pipetor, pojemnik na odpady), które standardowo używane są w trakcie hodowli komórkowych *in vitro* i testów immunologicznych.

Wykonano również analizę skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu atmosferycznym w następujących wariantach czasowych: przed rozpoczęciem pracy pod komorą oraz po upływie 15 minut, 60 minut, 3 i 5 godzin od chwili włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Do oceny czystości mikrobiologicznej powietrza wykorzystane zostały następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży
- płytki odciskowe (kontaktowe) BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów;
- płytki odciskowe Sabouraud - do oznaczania drożdży i pleśni.

Odniesieniem do wyników pomiarów było analogiczne badanie czystości mikrobiologicznej powietrza w laboratorium, w którym znajdowała się komora. Próby pobrano z powierzchni blatów laboratoryjnych. Uzyskane wyniki zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 1), gdzie „-„ oznacza negatywny wynik testu; „+” niewielką infekcję; „++” silną infekcję; „+++” bardzo silną infekcję.

Tab. 1 Zestawienie wyników analizy skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu

Nazwa testu	Wariant czasowy	Testowane miejsce	Wynik testu
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-

Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-

Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Biocount PCA	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Hygicult TPC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-

CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
CompactDry TC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-

Obserwacja: analiza mikrobiologiczna przeprowadzona za pomocą testów Biocount Sabouard i PCA; Hygicult TPC i YF; CompactDry TC i YM nie wykazała obecności mikroorganizmów na blacie komory.

Wykonano również ocenę skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB (bogatego w substancje odżywcze: peptydy, aminokwasy witaminy rozpuszczalne w wodzie oraz węglowodany), które stanowi wysoce podatną na infekcje pożywkę do hodowli bakterii. Sterylną pożywkę LB rozlano pod komorą do szalek Petriego tak, aby tworzyła ona na dnie kilkumilimetrową warstwę. Pożywkę rozlewano po 15 minutach, 60 minutach, 3 i 5 godzinach od włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Szalki z otwartym wieczkiem pozostawiono pod komorą na 10 minut (tak zwany test otwartej płytki). Ocenę czystości mikrobiologicznej wykonano z użyciem testów HYGICULT TPC i CompactDry TC. Wyniki badania zestawiono w tabeli poniżej (Tab. 2), gdzie „-” oznacza brak infekcji, „+” oznacza stwierdzoną infekcję:

Tab. 2 Wyniki oceny skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB

Lokalizacja szalki	Wariant czasowy	Wynik
Środek blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Lewy brzeg blatu komory	15'	-
	60'	-

	3h	-
	5h	-
Prawy brzeg blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Kontrola (poza komorą)	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-

Obserwacja: Za pomocą testu otwartej płytki nie wykryto skażenia mikrobiologicznego w komorze w żadnym z wariantów czasowych. Również pogłębiona analiza pożywki LB, za pomocą testów Hygicult TPC i CompactDry TC nie wykazała skażenia.

Wnioski:

Badana komora w prawidłowy sposób generowała laminarny przepływ powietrza, którego nie zaburzało ustawienie na jej blacie materiałów i drobnego sprzętu laboratoryjnego.

System monitorowania przepływu powietrza prawidłowo diagnozował problemy z przepływem (po zasłonięciu otworów w blacie roboczym) i wydawał głośny sygnał alarmowy.

Nie stwierdzono obecności mikroorganizmów na blacie roboczym komory, nawet po długim czasie pracy urządzenia, co potwierdza skuteczność działania filtrów powietrza.

2.2. Ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowego działania lampy UV

Ocenie podlegało umiejscowienie lampy UV pod komorą warunkujące ekspozycję na promieniowanie całej powierzchni blatu roboczego. Ze względów bezpieczeństwa i higieny pracy oceniono również zabezpieczenie przed włączeniem lampy, jeśli panel przedni komory nie jest zamknięty lub czy uniemożliwia on podniesienie panelu w trakcie naświetlania. Oceniono możliwość zaprogramowania czasu pracy lampy UV oraz zaprogramowania włączenia lampy UV z opóźnieniem czasowym umożliwiające opuszczenie pomieszczenia

badawczego przez eksperymentatora. Ocenie podlegała również poprawność automatycznego wyłączenia naświetlania po zakończeniu ekspozycji oraz wskazania licznika czasu pracy lampy UV.

Ocena skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonana została metodą kontaktową z użyciem płytek odciskowych. Czystość mikrobiologiczna miejsc trudno dostępnych, łączenia elementów i zakrzywionych powierzchni została oceniona metodą wymazową z użyciem zwilżonego jałowego wacika. Materiał do badań pobrany został przed i po naświetlaniu lampą UV, stosując standardowy czas ekspozycji 30 minut. Oceniona została czystość mikrobiologiczna blatu roboczego oraz zewnętrznych powierzchni materiałów znajdujących się pod komorą (pudełka na końcówki, pipety automatyczne, statyw na probówki), na które bezpośrednio oddziaływały promienie UV. Do oceny skuteczności bakteriobójczej lampy UV wykorzystano następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii
- płytki odciskowe (kontaktowe) typu BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów.

Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 3), gdzie „-„ oznacza brak infekcji; „+” oznacza stwierdzoną infekcję.

Tab. 3 Wyniki oceny skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonanej metodą kontaktową

Nazwa testu	Testowane miejsce	Wynik przed sterylizacją	Wynik po sterylizacji
Biocount PCA	Blat komory	-	-
Biocount PCA	Pipety pod komorą	-	-
Biocount PCA	Pudełko z końcówkami pod komorą	-	-
Hygicult TPC	Blat komory	-	-
Hygicult TPC	Górny lewy róg komory (od wewnątrz)	-	-
Hygicult TPC	Filtr sufitowy	-	-

Hygicult TPC	Tylna ścianka ze stali kwasoodpornej	-	-
Hygicult TPC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-
CompactDry TC	Szpary między płytami blatu ze stali kwasoodpornej	-	-
CompactDry TC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-
CompactDry TC	Powierzchnia wokół gniazd prądu	-	-
CompactDry TC	Powierzchnia wokół i w kranach	-	-

Obserwacja: Lampa UV, w którą wyposażona została testowana komora skutecznie niszczyła drobnoustroje na testowanych powierzchniach, zarówno na blacie, materiałach umieszczonych pod komorą.

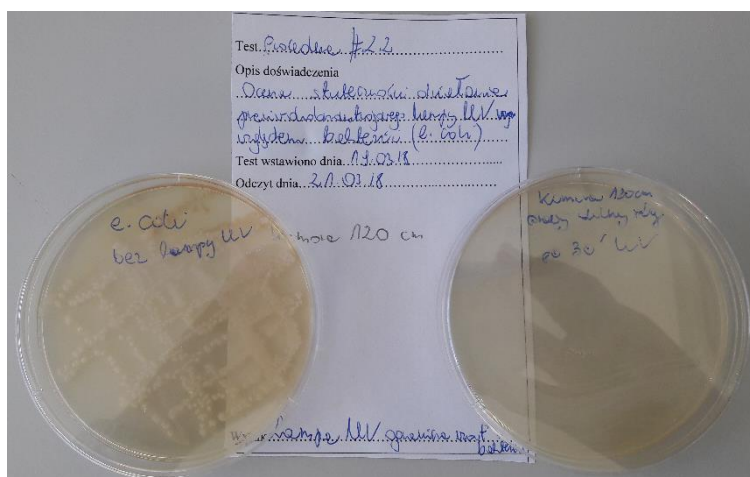
Skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowej lampy UV oceniono również względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli* wysianych na podłożu stałym (agar) na szalce Petriego. Szalki z posiewem bakteryjnym umieszczono w wybranych miejscach na blacie roboczym (w centralnym punkcie oraz w narożnikach), po czym poddane zostały działaniu lampy UV przez 30 minut. Po zakończeniu ekspozycji szalki zostały przeniesione do inkubatora ustawionego na 37°C na 24 godziny. Szalki kontrolne natychmiast po wysianiu umieszczono w inkubatorze w temp. 37°C. Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 4), gdzie „-” oznacza brak kolonii; „+” oznacza jedną kolonię; „++” oznacza kilka kolonii; „+++” oznacza nieograniczony wzrost bakterii.

Tab. 4 Ocena działania przeciwdrobnoustrojowej lampy UV względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli*

Lokalizacja szalki z <i>E. coli</i>	Wynik
Blat komory środek, przód	-
Blat komory środek, tył	-
Blat komory lewa strona	-

Blat komory prawa strona	-
Kontrola	+++
Kontrola	+++
Kontrola	+++

Przykładowy wynik testu przedstawia poniższe zdjęcie:



Fot. 4 Kontrolna szalka z posiewem *E. coli* (po lewej) nie poddana działaniu promieniowania UV (widoczne liczne kolonie bakteryjne). Po prawej posiew *E. coli* po zakończeniu 30 minutowego programu sterylizacji UV. Szalka ustawiona była w prawym brzegu blatu roboczego (brak kolonii bakteryjnych)

Wnioski:

Lampa ultrafioletowa, w którą wyposażona została komora skutecznie naświetlała całą powierzchnię blatu roboczego. Nie stwierdzono infekcji tak na samym blacie roboczym, jak i na powierzchni materiałów używanych pod komorą oraz w trudno dostępnych miejscach.

Poziom zabezpieczeń komory jest również bardzo dobry. Możliwe jest zaprogramowanie czasu naświetlania, jak również opóźnienia czasowego włączenia ekspozycji. Pozwala to na opuszczenie pomieszczenia przez eksperymentatora, na co bardzo dużą uwagę zwraca inspekcja BHP. Niemożliwe jest również uruchomienie procedury naświetlania bez opuszczenia przedniego panelu komory, jak również podniesienie go w trakcie działania lampy UV. Szczelnie przylegający przedni panel komory skutecznie zabezpiecza przed działaniem promieni UV.

Po zakończeniu naświetlania proces jest prawidłowo kończony i odpowiednia informacja wyświetlana jest na panelu sterującym. Podobna informacja wyświetlana jest, gdy urządzenie jest ponownie uruchamiane.

Przeprowadzona procedura sterylizacji lampą UV skutecznie eliminowała posiew bakterii *E. coli* w szalkach rozstawionych w różnych częściach blatu roboczego.

Materiał wyścielający górną część komory, który prawdopodobnie pełni funkcje filtracyjne nie pozwala na skuteczne czyszczenie i sterylizację. Choć w przeciwieństwie do testowanej komory o długości 180 cm, nie stwierdzono w tym miejscu infekcji, sugerujemy zmiany konstrukcyjne mające na celu wyeliminowanie tego problemu, dla przykładu, zastosowanie odpowiedniej maskownicy ze stali kwasoodpornej.

3. Ocena przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

3.1. Badanie czystości mikrobiologicznej pożywek oraz odczynników wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych przygotowywanych pod komorą laminarną

W opisywanych badaniach wykorzystano następujące pożywki hodowlane oraz odczynniki:

- pożywkę RPMI 1640,
- pożywkę DMEM,
- pożywkę Medium 200,
- płodową surowicę bydlęcą (FBS),
- buforowaną fosforanami sól fizjologiczną (PBS),
- medium do separacji limfocytów (LSM).

Wszystkie powyższe pożywki i odczynniki są powszechnie wykorzystywane w praktyce laboratoryjnej do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, co więcej są bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Stąd też praca z ich użyciem musi odbywać się pod prawidłowo działającą komorą laminarną.

Wszystkie pożywki i odczynniki użyte w badaniu stanowiły sterylne, komercyjne roztwory dostarczone w butelkach zabezpieczonych plastikową plombą. Po otwarciu butelek pod komorą laminarną badane roztwory inkubowane były w otwartych naczyniach hodowlanych:

- płytkach 96-dołkowych (w objętości 200 μ L),
- płytkach 24-dołkowych (w objętości 1 mL),
- płytkach 12-dołkowych (w objętości 2 mL),
- butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² (w objętości 200 μ L).

Są to naczynia hodowlane najczęściej używane w laboratorium do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, jak również w doświadczeniach z ich wykorzystaniem. W butelkach hodowlanych nie inkubowano płodowej surowicy bydlęcej i medium do separacji limfocytów, ponieważ w praktyce laboratoryjnej nie ma przykładów takiego ich użycia.

W przebiegu badań odczynniki i pożywki w różnych naczyniach inkubowane były przez 15 minut, 30 minut lub godzinę. Czasy inkubacji dobrano tak, aby odpowiadały standardowym procedurom wykonywanym pod komorą laminarną w trakcie prowadzonych badań.

Po zakończeniu inkubacji wszystkie roztwory zostały zebrane do sterylnych probówek typu falcon i inkubowane były w cieplarni przez 48 h w temperaturze 35°C w celu zapewnienia warunków do wzrostu mikroorganizmom, które mogłyby zainfekować badane roztwory.

Następnie wykonana została specjalistyczna analiza czystości mikrobiologicznej każdego badanego roztworu, w każdym użytym naczyniu hodowlanym i po każdym z wymienionych czasów inkubacji pod komorą. Użyto w niej komercyjnych testów:

- Hygicult TPC (do oceny ogólnej liczby drobnoustrojów),
- CompactDry TC (do oznaczania ogólnej liczby bakterii),
- Hygicult Y+F (do oceny zakażenia pleśniami lub drożdżami),
- CompactDry YM (do oznaczania pleśni i drożdży).

Wyniki przeprowadzonych testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 5).

Tab. 5 Wyniki analizy czystości mikrobiologicznej pożywek inkubowanych w różnych typach naczyń hodowlanych pod komorą

Stosowany roztwór	Naczynie hodowlane	Czas inkubacji	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

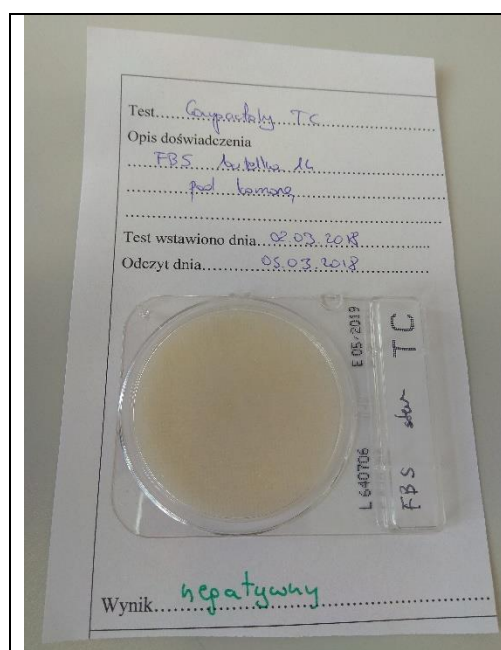
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Pożywka Medium200	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

PBS	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

LSM	Płytką 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



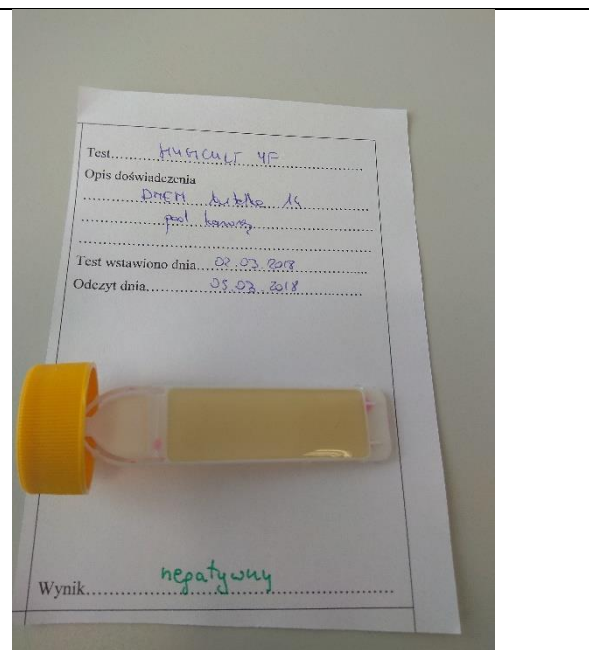
Fot. 5 Płodowa surowica bydlęca (FBS) inkubowana **pod komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (brak infekcji bakteryjnej)



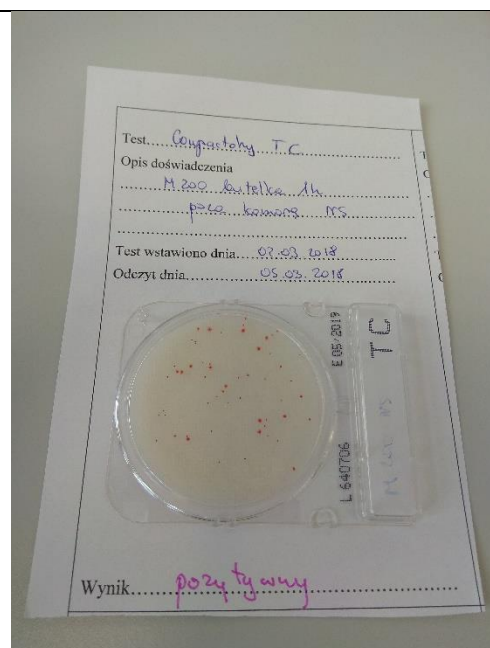
Fot. 6 Pożywka DMEM inkubowana **pod komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 7 Pożywka DMEM inkubowana **pod komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 8 Pożywka DMEM inkubowana **pod komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 9 Pożywka Medium 200 inkubowana **poza komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (znaczną infekcją bakteryjną)



Fot. 10 Płodowa surowica bydlęca FBS inkubowana **poza komorą** przez godzinę w butelce hodowlanej (widoczne liczne bakteryjne)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami testowanych pożywek hodowlanych i odczynników inkubowanych pod komorą laminarną w naczyniach hodowlanych. Porównanie tych wyników z dodatkowymi badaniami kontrolnymi prowadzonymi w niesterylnych warunkach, poza komorą, które wykazały infekcje dowodzi, iż system filtrów, w jakie komora została wyposażona skutecznie chroni powietrze przed mikroorganizmami.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do przygotowywania i korzystania z pożywek oraz odczynników standardowo wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.2. Ocena przydatności komory podczas zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

W ramach oceny przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych, wykonano procedury związane z zakładaniem i prowadzeniem hodowli linii ludzkich:

- komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC; nr katalogowy C0035C), pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*),
- komórki MCF-7 (Lot. 13K023), pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*).

i zwierzęcych:

- mysie fibroblasty L929 (NCTC klon 929; numer CCL-1) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).
- mysie makrofagi RAW 264.7 (nr katalogowy TIB-71) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną. Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- Fibroblasty L929 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC – w pożywce Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierającej 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (LSGS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 97 ml Medium 200, 2 ml LSGS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Komórki MCF-7 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS), mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (NAA). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 88 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS, 1 ml roztworu antybiotyków oraz 1 ml NAA.
- Mysie makrofagi RAW 264.7 – w pożywce DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej i mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki DMEM, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.

Czystość mikrobiologiczną pożywek oceniono przed założeniem hodowli komórkowej (w celu wyeliminowania ryzyka, iż komórki podczas zakładania hodowli będą przenoszone do zainfekowanej pożywki) oraz po wykonaniu jednego pasażu komórek, po upływie 2-3 dni od momentu założenia hodowli komórkowej (w zależności od momentu osiągnięcia przez hodowlę stanu konfluencji wynoszącego 70-80%).

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F - do oznaczania pleśni i drożdży,

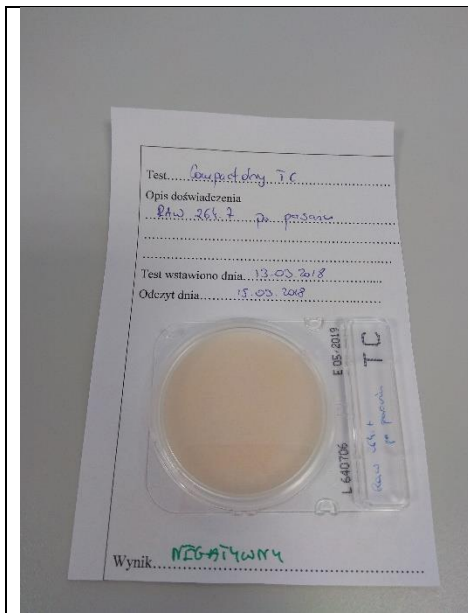
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 6).

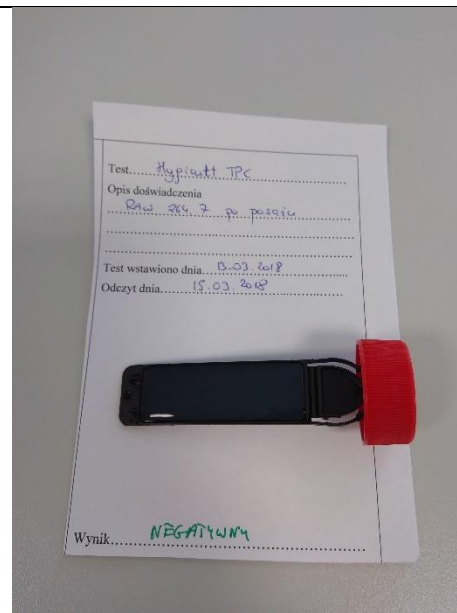
Tab. 6 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej pożywek przed założeniem hodowli komórkowej i po wykonaniu pasażu

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Fibroblasty L929	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Fibroblasty L929	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



Fot. 11 Hodowla *in vitro* makrofagów RAW 264.7 prowadzona pod komorą, po pasażu (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 12 Hodowla *in vitro* makrofagów RAW 264.7 prowadzona pod komorą, po pasażu (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 13 Hodowla *in vitro* makrofagów RAW 264.7 prowadzona pod komorą, po pasażu (brak infekcji bakteryjnej) (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 14 Hodowla *in vitro* makrofagów RAW 264.7 prowadzona pod komorą, po pasażu (brak infekcji bakteryjnej) (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek hodowlanych używanych do prowadzenia hodowli komórkowych, które przygotowywane były pod testowaną komorą.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro*, po wykonaniu jednego pasażu komórek.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.3. Izolacja i hodowla *in vitro* pierwotnych zwierzęcych linii komórkowych

Oceniona została czystość mikrobiologiczna hodowli *in vitro* komórek mononuklearnych krwi obwodowej – PBMC (z ang. *peripheral blood mononuclear cells*) izolowanych pod testowaną komorą laminarną.

Źródłem komórek była krew obwodowa szczura rasy WISTAR, zdrowego samca ważącego 250 g pochodzącego z jednostki uprawnionej do prowadzenia hodowli zwierząt doświadczalnych (zarejestrowanej przez MNiSW). Krew pobrano na sterylny roztwór antykoagulantu (wersenian tripatasowy, K₃EDTA). Procedurę wykonano w sterylnym pomieszczeniu chirurgicznym z wykorzystaniem sterylnych i jednorazowych materiałów chirurgicznych. Pozostałe etapy izolacji frakcji mononuklearnej (PBMC) z krwi pełnej przeprowadzono pod testowaną komorą laminarną. Składały się na nie:

1. Nawarstwienie krwi rozcieńczonej w stosunku 1:1 sterylnym buforem PBS na roztwór generujący gradient gęstości – medium do separacji limfocytów (LSM) w sterylnej probówce wirówkowej typu Falcon.
2. Wirowanie w gradiencie gęstości LSM (400 x g przez 30 minut).
3. Zebranie frakcji komórek PBMC, która tworzy dobrze widoczny pierścień na granicy osocza i medium do separacji limfocytów.
4. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości medium do separacji limfocytów.
5. Hemoliza erytrocytów w 0,85% sterylnym roztworze chlorku amonu.
6. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości chlorku amonu.

Wyizolowane komórki PBMC hodowano następnie w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającą 10% płodowej surowicy bydlęcej

(FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu stężonych antybiotyków.

Hodowlę prowadzono na płytkach 24-dołkowych (1 milion komórek na mililitr pożywki) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 95% wilgotności w inkubatorze. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji podczas hodowli, przed użyciem inkubator wysterylizowano w temperaturze 186°C.

Po upływie 24 i 48 godzin zawartość dołków została zebrana w celu wykonania analizy czystości mikrobiologicznej. Analizie poddana została również wyjściowa zawiesina komórek stanowiąca bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

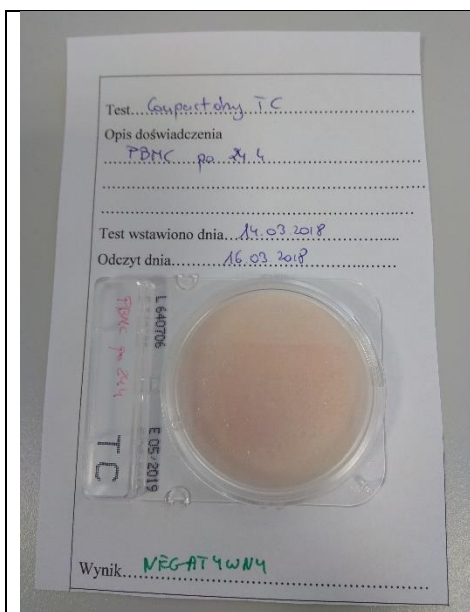
- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 7).

Tab. 7 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej wyjściowej zawiesiny komórek PBMC oraz hodowli po upływie 24 i 48 h od założenia hodowli

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
PBMC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 24 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 48 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiono na zdjęciach poniżej.



Fot. 15 Hodowla *in vitro* komórek PBMC 24 h po izolacji z krwi obwodowej przeprowadzonej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 16 Hodowla *in vitro* komórek PBMC 24 h po izolacji z krwi obwodowej przeprowadzonej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej) (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 17 Hodowla *in vitro* komórek PBMC 24 h po izolacji z krwi obwodowej przeprowadzonej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej) (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 18 Hodowla *in vitro* komórek PBMC 24 h po izolacji z krwi obwodowej przeprowadzonej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej) (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami wyjściowej zawiesiny komórek PBMC stanowiącej bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywki po upływie 24 h i 48 h od założenia hodowli.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do prowadzenia izolacji i hodowli *in vitro* pierwotnych linii komórkowych.

4. Ocena przydatności komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*

4.1. Oznaczenie przeżywalności i wskaźnika proliferacji wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w wykonywaniu oznaczeń aktywności metabolicznej (po 24 godzinach) oraz stopnia proliferacji (po 48 i 72 godzinach) komórek należących do czterech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC, mysich fibroblastów L929, mysich makrofagów RAW 264.7 (wszystkie trzy linie pochodzą z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC; z ang. *American Type Culture Collection*) oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7 pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*). Ocena przeżywalności i wskaźnika proliferacji komórek została wykonana z użyciem testu MTT. Zasada testu MTT oparta jest na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej aktywnej w żywych komórkach do przekształcania soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy) do niebieskiego formazanu, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie. Wartość zmierzonej absorbancji jest wprost proporcjonalna do ilości żywych, aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach płytki hodowlanej.

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

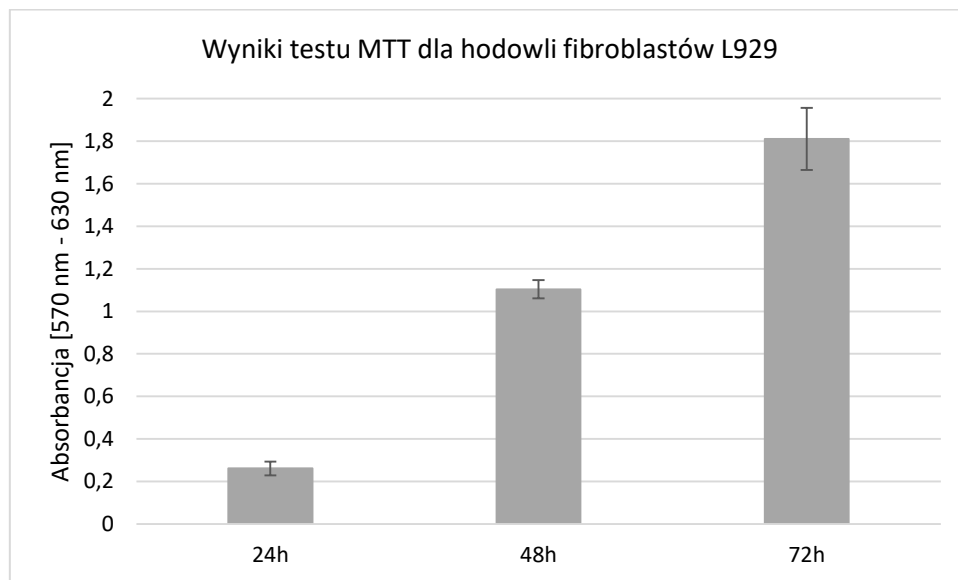
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla mysich fibroblastów L929 - pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicę bydlęcą (z ang. fetal bovine serum; FBS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),

- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich fibroblastów L929

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji mysich fibroblastów L929 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 1) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu ± błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 1 Wyniki testu MTT dla hodowli fibroblastów L929

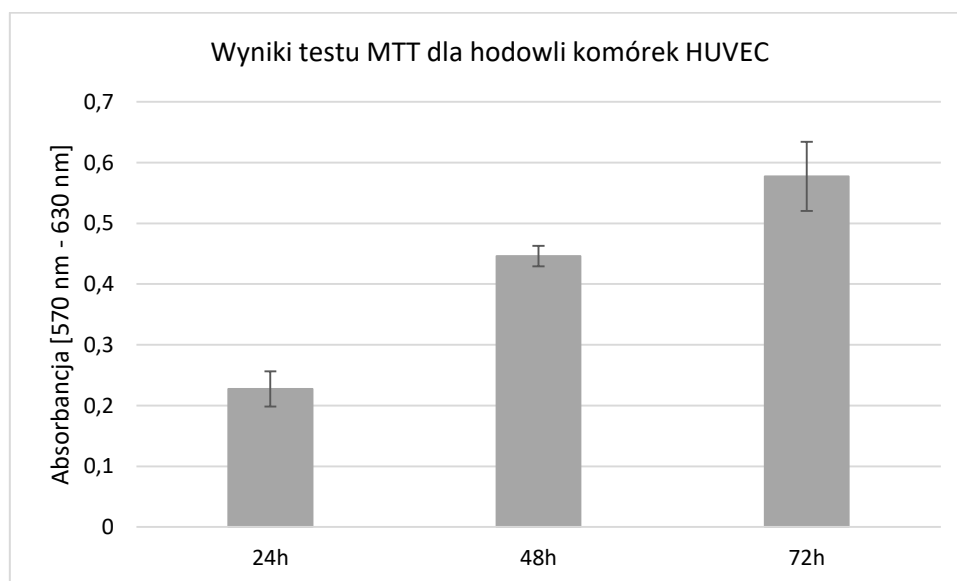
Obserwacja:

Jak można zaobserwować na powyższej rycinie wraz ze wydłużeniem czasu inkubacji, odnotowano znaczący wzrost liczby żywych komórek, świadczący o wysokim stopniu ich proliferacji. Uzyskany wynik jest zgodny z powszechną wiedzą dotyczącą zdolności mysich fibroblastów L929 do spontanicznej proliferacji, bez konieczności stosowania związków o charakterze mitogenów, których celem jest pobudzenie tego procesu. Na podstawie

przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas zakładania hodowli komórkowej, jak i przeprowadzania samej procedury MTT z wykorzystaniem komory, nie doszło do zainfekowania komórek patogenami. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji ze względu na fakt, iż zainfekowane linie komórkowe charakteryzują się obniżoną przeżywalnością oraz spadkiem tempa proliferacji.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek HUVEC (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dółek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 2) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 2 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek HUVEC

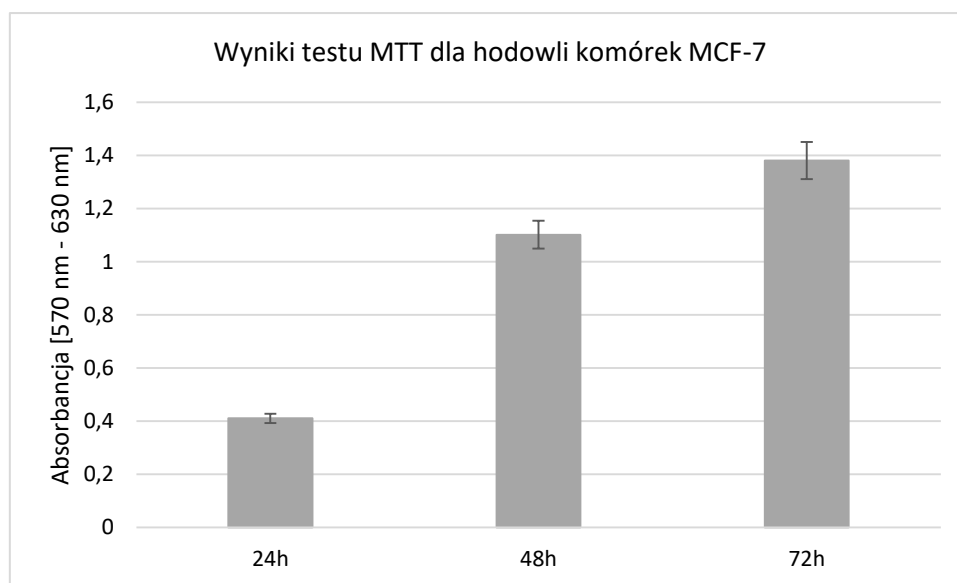
Obserwacja:

Uzyskane wyniki wykazały, iż wraz z wydłużeniem czasu inkubacji nastąpił wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach w obrębie 96-dolkowej płytki hodowlanej. Komórki HUVEC stanowią linie komórkową, która nie wymaga użycia czynnika

(mitogenu) indukującego proces ich proliferacji. Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji można stwierdzić, iż użyte podczas procedury komórki znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym i ich procesy metaboliczne nie były zakłócone, co w znaczący sposób wyklucza wystąpienie infekcji podczas przeprowadzania całej procedury.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek raka piersi MCF-7

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek MCF-7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 3) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 3 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek MCF-7

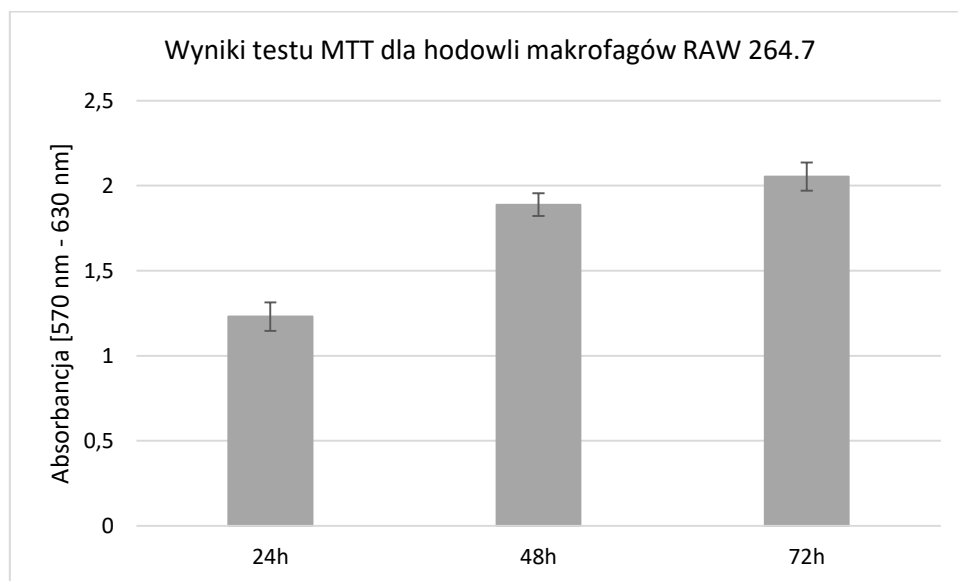
Obserwacja:

Wyniki uzyskane na podstawie testu MTT jednoznacznie wskazują, że wraz z wydłużeniem czasu hodowli, zwiększa się liczba aktywnych metabolicznie komórek MCF-7, o czym świadczą wyższe wartości pomiaru absorbancji. Komórki MCF-7 jako klasyczna linia komórek nowotworowych charakteryzuje się wysokim tempem proliferacji. Na powyższej rycinie można także zaobserwować stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w porównaniu do 72-godzinnego

czasu hodowli. Wynika to z faktu, iż ze względu na intensywny proces proliferacji komórek nowotworowych po upływie 48 godzin uzyskiwany jest niemal 100% stan konfluencji, który ogranicza dalsze podziały komórkowe. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko podczas prowadzenia hodowli komórkowych. Zostało ono potwierdzone przy użyciu mikroskopu z odwróconą optyką i wskazuje jednoznacznie na prawidłowy stan fizjologiczny i aktywność metaboliczną hodowanych komórek.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich makrofagów RAW 264.7

Poniższy wykres (Ryc. 4) przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek RAW 264.7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołeków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 4 Wyniki testu MTT dla hodowli makrofagów RAW 264.7

Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru absorbancji wykonane po zakończeniu testu MTT jednoznacznie wskazują na dużą aktywność metaboliczną mysich makrofagów RAW 264.7, o czym świadczy wzrost wartości absorbancji wraz z wydłużeniem czasu hodowli komórek. Badana linia komórkowa charakteryzuje się bardzo dużym wskaźnikiem tempa proliferacji, co

potwierdzają uzyskane wysokie wartości absorbancji rzędu przekraczające wartość 2 jednostek. Zaobserwowano także stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w stosunku do 72-godzinnego czasu hodowli. Przy użyciu mikroskopu świetlnego z odwróconą optyką, zauważono, iż po upływie 48 godzin hodowli niemal cała powierzchnia dołka na płycie hodowlanej była porośnięta żywymi komórkami o charakterystycznym wydłużonym kształcie. W związku z uzyskaniem przez komórki niemal 100% stanu konfluencji, została ograniczona wolna przestrzeń dla ich dalszych podziałów, co tłumaczy niewielkie różnice w wartościach absorbancji pomiędzy 48- i 72-godzinnym czasem inkubacji. Tak jak już wspomniano powyżej, jest to zjawisko korzystne w kontekście prowadzenia hodowli aktywnych metabolicznie komórek przeznaczonych do testów immunologicznych *in vitro*.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur dotyczących oznaczania przeżywalności i wskaźnika proliferacji czterech komercyjnie dostępnych linii komórkowych jednoznacznie wskazują na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w omówionych testach immunologicznych *in vitro* (teście MTT). W przypadku wszystkich wykonanych analiz zaobserwowano, iż wraz z wydłużeniem czasu hodowli następował wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek, co potwierdzały wyniki pomiarów absorbancji. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko, które świadczy o prawidłowym stanie fizjologicznym, jak i o dużej aktywności metabolicznej komórek.

Na podstawie przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas prowadzenia hodowli komórkowych, jak i wykonywania testów MTT z wykorzystaniem komory nie doszło do zainfekowania badanych linii komórkowych. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji.

4.2. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu przez komórki należące do wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w prowadzeniu fluorymetrycznych oznaczeń poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT), które to pomiary są jednym z podstawowych wskaźników stanu fizjologicznego komórek. Badania te

przeprowadzono z użyciem trzech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek raka piersi MCF-7, ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i mysich makrofagów RAW 264.7 stymulowanych nadtlaniem wodoru w dwóch stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM. Ilość wolnych rodników w komórkach zmierzono z użyciem gotowego zestawu fluorymetrycznego firmy Sigma-Aldrich (nr katalogowy MAK143 Sigma) oraz 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (2',7'DCF-DA). W obu przypadkach intensywność fluorescencji była proporcjonalna do ilości powstających RFT.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

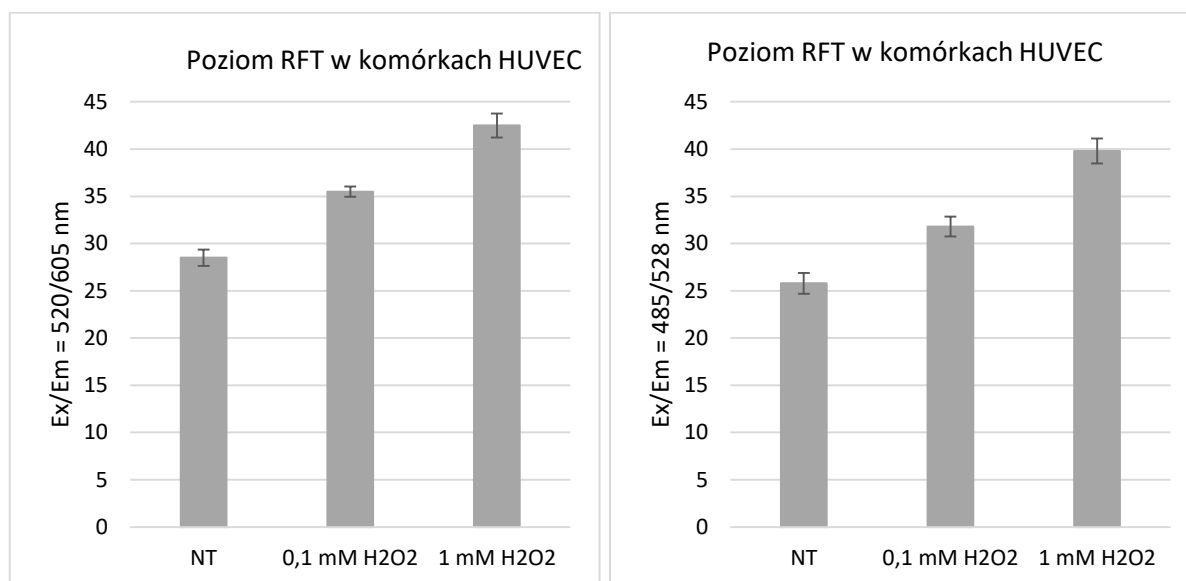
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC

Na poniższych wykresach (Ryc. 5 i 6) przedstawiono poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HUVEC (25000 na dołek) stymulowanych dwoma stężeniami nadtlenu wodoru (0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali

emisji $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 5 i 6 Poziom RFT w komórkach HUVEC oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

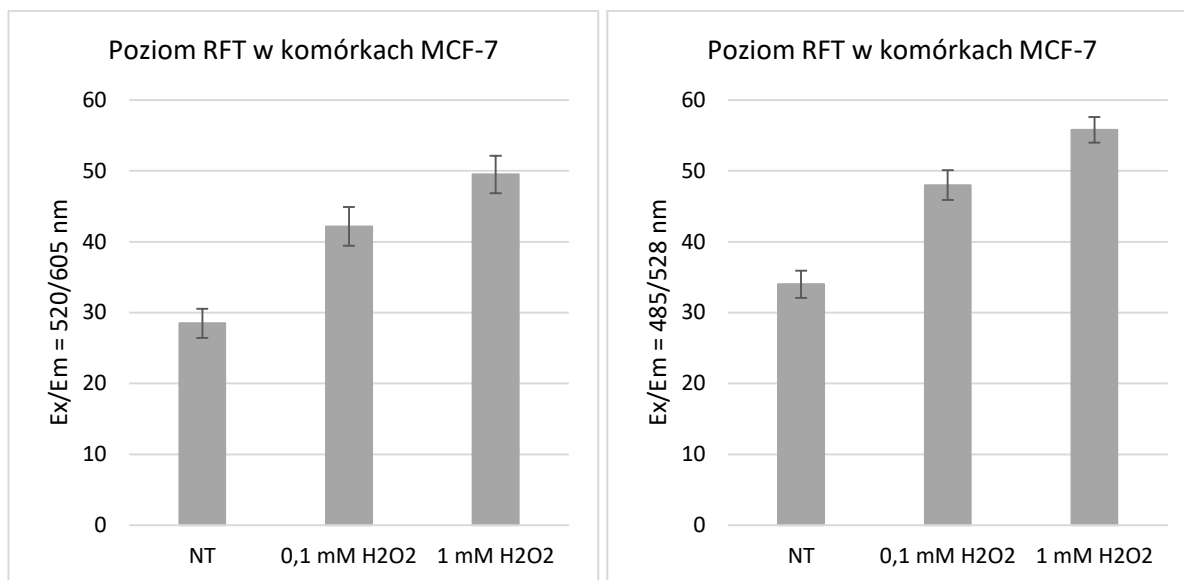
Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż komórki HUVEC stymulowane nadtlenkiem wodoru wydzielają RFT w sposób dawko-zależny. Wraz ze wzrostem stężenia nadtlenu wodoru, komórki generują większą pulę RFT. Uzyskane rezultaty potwierdzają prawidłowy stan fizjologiczno-metaboliczny komórek ze względu na fakt, iż tylko żywe komórki są w stanie produkować RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny, jakim jest nadtlenek wodoru.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w ludzkich komórkach raka piersi MCF-7

Na poniższych wykresach (Ryc. 7 i 8) przedstawiono poziom RFT w komórkach nowotworowych MCF-7 stymulowanych dwoma stężeniami nadtlenu wodoru (0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ do fali emisji $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ (w

przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 7 i 8 Poziom RFT w komórkach MCF-7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

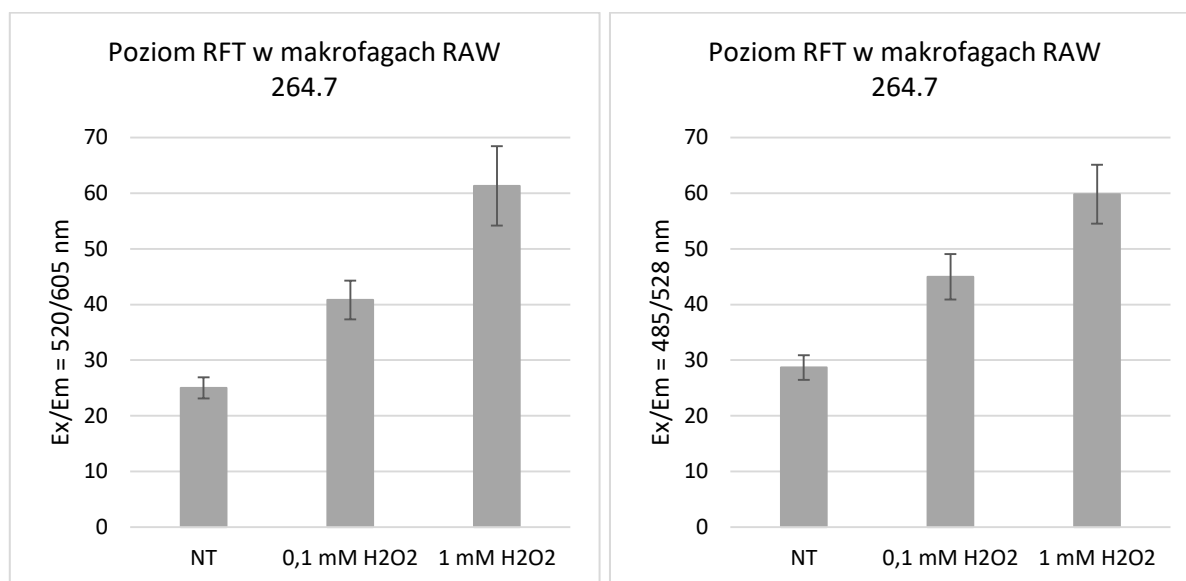
Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż komórki nowotworowe MCF-7 stymulowane nadtlaniem wodoru wydzielają RFT w sposób dawko-zależny. Uzyskane rezultaty potwierdzają prawidłowy stan fizjologiczno-metaboliczny komórek ze względu na fakt, iż tylko żywe komórki są w stanie produkować RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RTF) w mysich makrofagach RAW 264.7

Na poniższych wykresach (Ryc. 9 i 10) przedstawiono poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 stymulowanych nadtlaniem wodoru w stężeniach 0,1mM i 1mM w porównaniu do komórek niczym nie stymulowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-

Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 9 i 10 Poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż makrofagi RAW 264.7 stymulowane nadtlaniem wodoru wydzielają bardzo duże ilości RFT w sposób dawko-zależny, wprost proporcjonalny do użytego stężenia nadtlenu wodoru. Uzyskane rezultaty wskazują, iż cała procedura wykonana z użyciem komory umożliwiła uzyskanie hodowli makrofagów - podstawowych komórek układu wrodzonego, które posiadały zdolność do wytwarzania RFT – jednego z podstawowych mechanizmów obronnych organizmu przed infekcjami.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z fluorymetrycznym oznaczaniem wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu jednoznacznie wykazały przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w opisywanych testach immunologicznych w warunkach in vitro. W przypadku wszystkich trzech badanych linii komórkowych zaobserwowano dawko-zależny wzrost poziomu RFT w komórkach stymulowanych nadtlaniem wodoru w dwóch stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM w porównaniu do

komórek niczym nietraktowanych (inkubowanych kontrolnie z PBS). Nadtlenek wodoru jest powszechnie używanym w badaniach induktorem stresu oksydacyjnego, który podczas wykonywania doświadczeń wykorzystywany jest jako tzw. „kontrola pozytywna” dla uzyskiwanych wyników. Przedstawione rezultaty zostały potwierdzone dwoma rodzajami testów: komercyjnym firmy Sigma oraz wykorzystującym związek 2',7'-diocetan dichlorofluoresceiny. Zgodnie z zasadą obu wymienionych testów, tylko komórki żywe posiadają zdolność produkowania RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny, jakim jest nadtlenek wodoru. Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłaby z kolei nadmierna produkcja RFT przez komórki niczym niestymulowane. Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłaby nadmierna produkcja RFT przez komórki niczym niestymulowane.

4.3. Ocena stężenia mediatorów immunologicznych wydzielanych przez komórki wybranych linii

W ramach procedury oceniono użyteczność komory pod kątem wykonywania oznaczeń techniką immunoenzymatyczną ELISA stężenia mediatorów immunologicznych: białka HMGB1, interleukiny (IL)-8 oraz czynnika martwicy nowotworów-alfa (TNF- α) w supernatantach uzyskanych po hodowli ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC, mysich makrofagów RAW 264.7 oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7 stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) *in vitro* w trzech stężeniach: 100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 μ g/ml.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości

surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),

- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Stymulacja ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Po osiągnięciu przez komórki 70-80 % stanu konfluencji, z butelki hodowlanej usunięto starą pożywkę, wykonano proces odrywania komórek od podłoża przy użyciu 0,025% roztwór trypsyna/EDTA, który umożliwi oderwanie komórek od powierzchni butelki (tzw. proces trypsynizacji), a następnie zliczono komórki występujące w uzyskanej zawieszynie.
2. Komórki wysiano na 24-dółkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano przez 24 godziny.
3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pohodowlane zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

Stymulacja ludzkich komórek raka piersi MCF-7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża przy użyciu 0,25% roztworu trypsyna/EDTA.
2. Po wykonaniu zliczenia komórek przy użyciu komory Bürkera, komórki wysiano na 24-dółkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.

3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant z nad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pochodzące zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

Stymulacja mysich makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

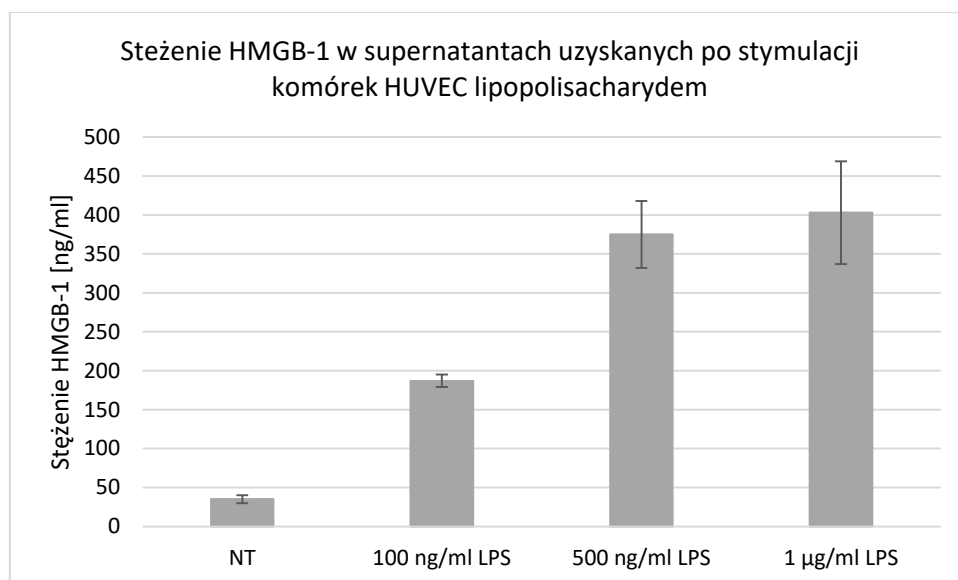
1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża mechanicznie przy użyciu skrobaka.
2. Zliczenie komórek przy użyciu komory Bürkera.
3. Wysianie komórek na 24-dolkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowanie ich w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
4. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant z nad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
5. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
6. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pochodzące zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

Immunoenzymatyczne oznaczanie techniką ELISA stężenia białka HMGB1

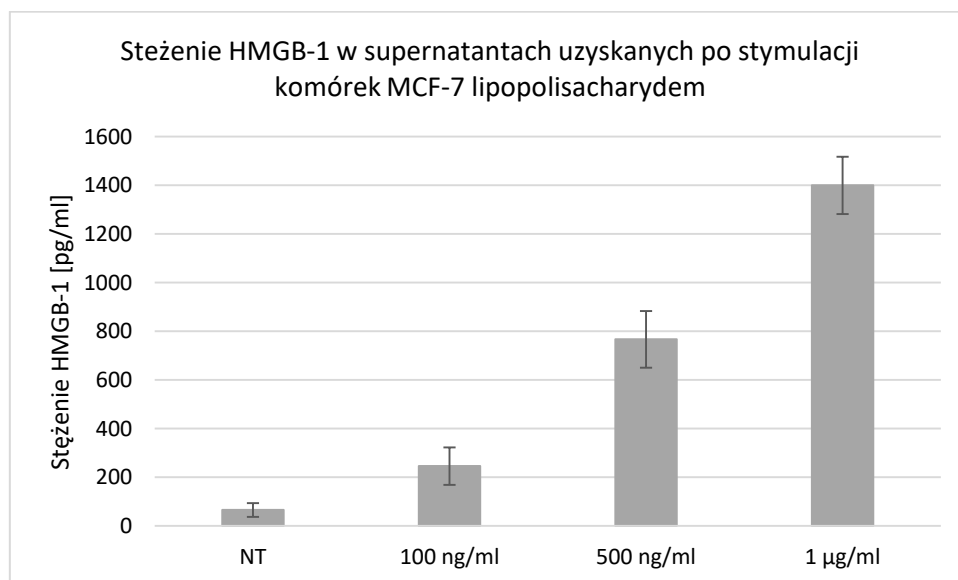
Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy EIAab® (nr katalogowy E0399h) w przypadku komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu EIAab® (nr katalogowy E0399m) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

Na poniższych wykresach (Ryc. 11, 12 i 13) przedstawiono wyniki analizy stężenia białka HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 oraz RAW 264.7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24

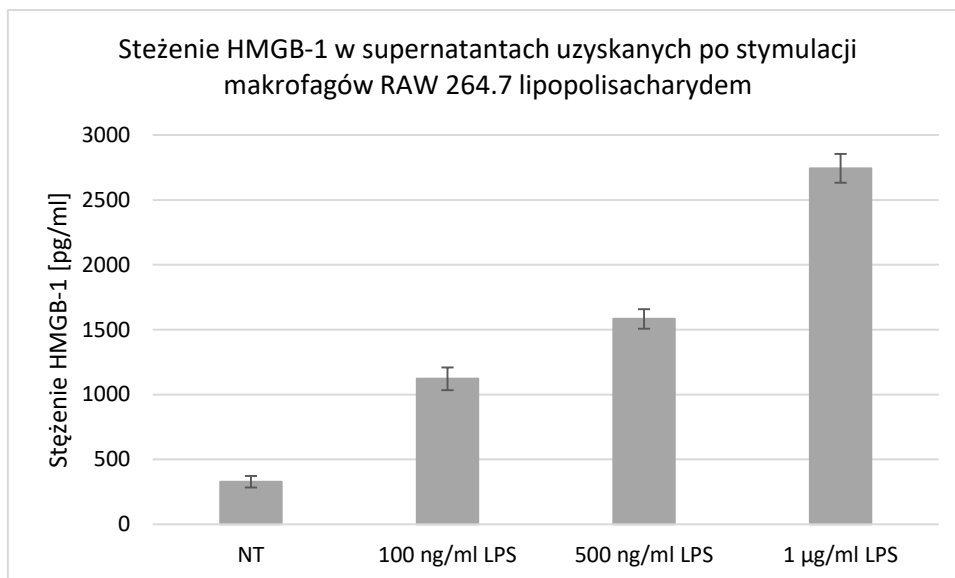
godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 11 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 12 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem



Ryc. 13 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem

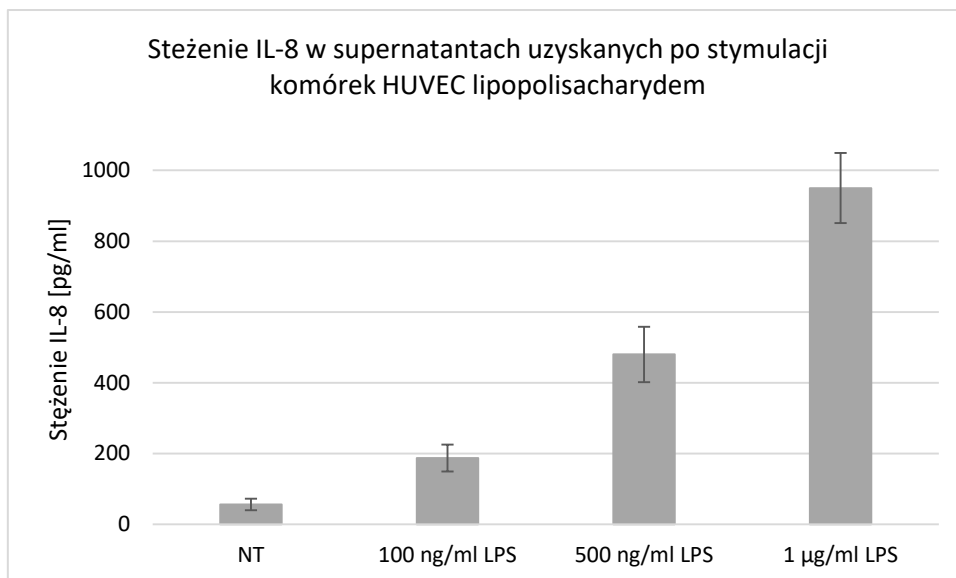
Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru stężenia HMGB-1 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 i RAW 264.7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem LPS wydzielają białko HMGB-1. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki znajdują się w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję HMGB-1 pod wpływem czynnika stymulującego.

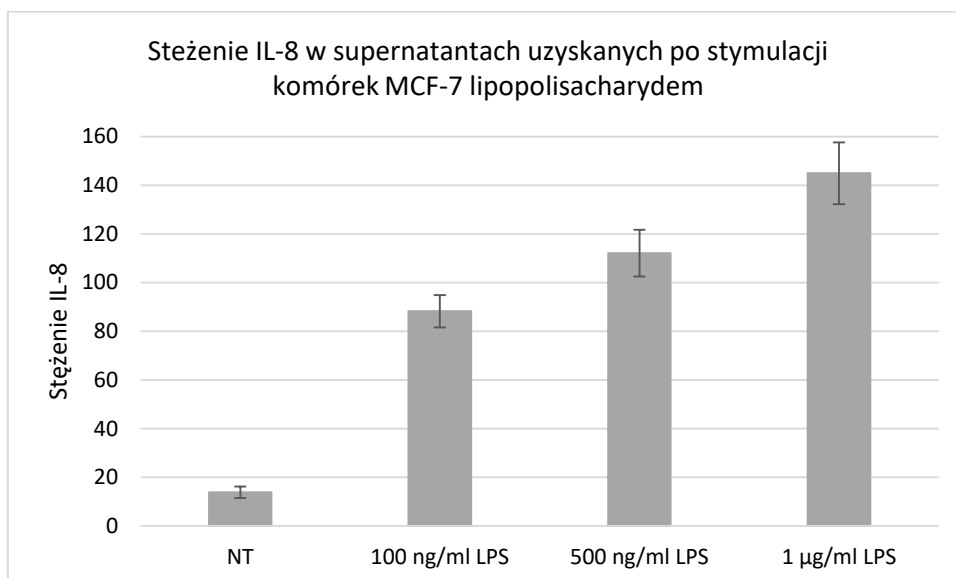
Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia IL-8

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy D8000C). Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

Na poniższych wykresach (Ryc. 14 i 15) przedstawiono wyniki analizy IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 14 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 15 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

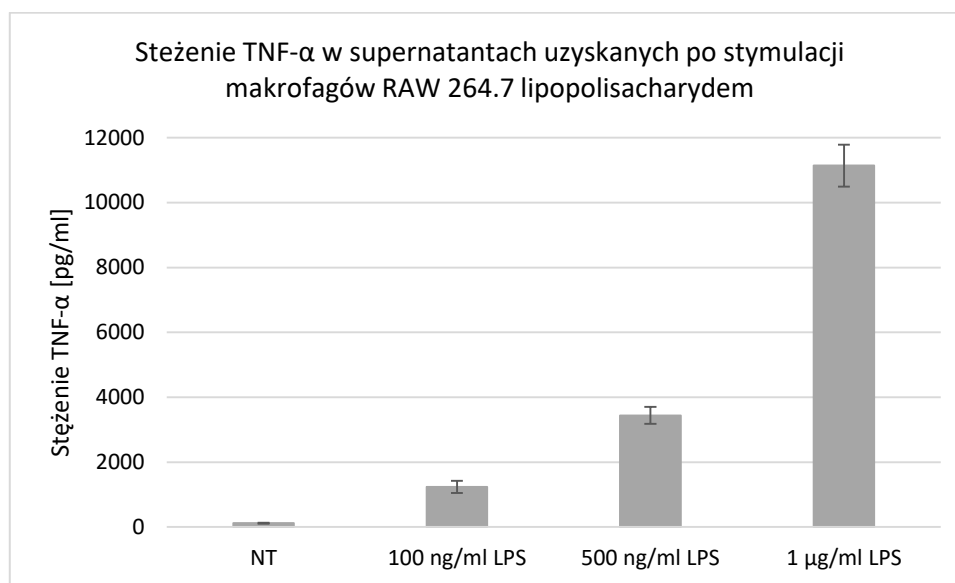
Przedstawione wyniki pomiaru stężenia IL-8 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem użytego stymulatora pochodzenia bakteryjnego wydzielają IL-8. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki

znajdują się w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję IL-8 pod wpływem LPS.

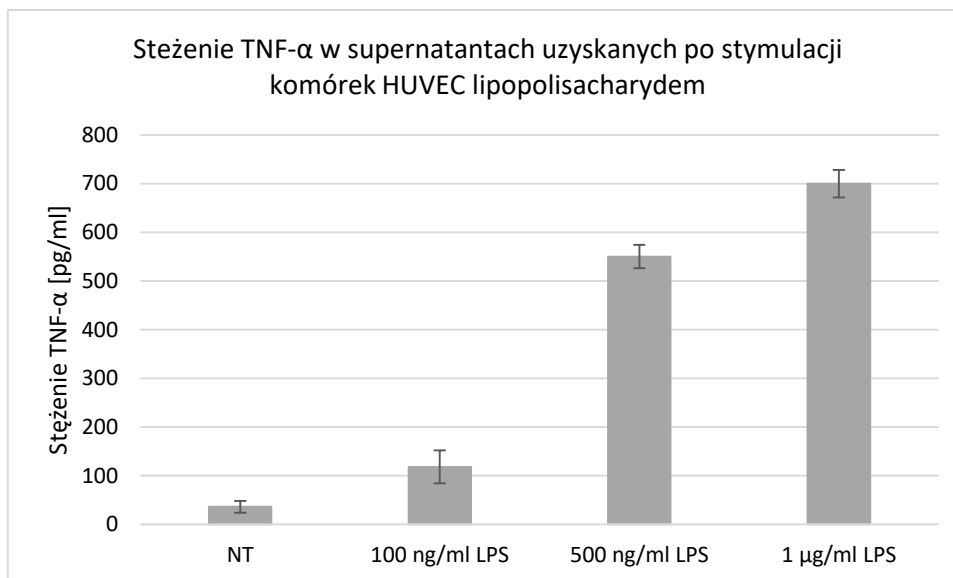
Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia TNF- α

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy DTA00C) w przypadku komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy MTA00B) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

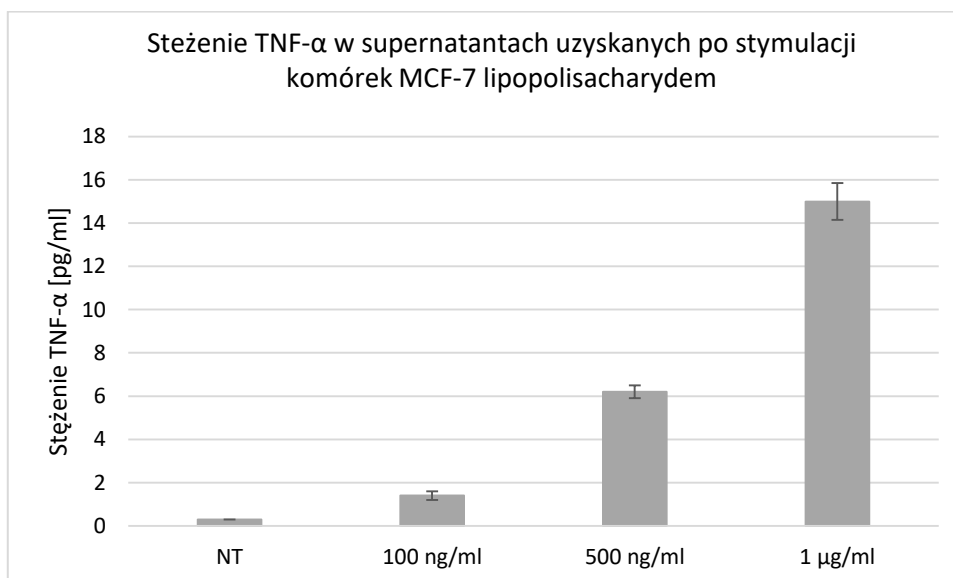
Na poniższych wykresach (Ryc. 16, 17 i 18) przedstawiono wyniki analizy stężenia TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 μ g/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 16 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem



Ryc. 17 Stężenie TNF-α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 18 Stężenie TNF-α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru poziomu TNF-α metodą ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 jednoznacznie wskazują, iż wraz ze wzrostem użytego do stymulacji stężenia LPS, komórki produkują większe ilości badanej cytokiny. Na wykresach można również zaobserwować, iż poziom TNF-α uwolnionego do medium hodowlanego przez komórki nowotworowe MCF-7 jest znacznie niższy w porównaniu do komórek RAW 264.7 i śródbłonna naczyń HUVEC. Uzyskane wyniki są całkowicie zgodne

z danymi literaturowymi, które potwierdzają dawko-zależną produkcję TNF- α przez te badane linie komórkowe stymulowane LPS. Na tej podstawie można stwierdzić, iż komórki hodowane i stymulowane pod badaną komorą znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym, a same hodowle komórkowe nie były zainfekowane.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z oznaczaniem stężenia mediatorów immunologicznych (białka HMGB-1, IL-8 i TNF- α) produkowanych przez trzy badane linie komórkowe (ludzkie komórki śródbłonna HUVEC, mysie makrofagi RAW 264.7 i ludzkie komórki raka piersi MCF-7) stymulowane lipopolisacharydem bakteryjnym jednoznacznie wykazały na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania do tego rodzaju testów immunologicznych. Wszystkie uzyskane wyniki badań są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, iż komórki układu odpornościowego (HUVEC i RAW 264.7), jak i nowotworowe (MCF-7) pod wpływem czynnika pirogenego (LPS) są zdolne do produkcji mediatorów immunologicznych, takich jak: IL-8, HMGB-1 czy TNF- α .

Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej i fizjologicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o zaburzeniach w funkcjonowaniu komórek, byłyby utrata przez nie zdolności do wydzielania mediatorów immunologicznych pod wpływem LPS. Nadmierna produkcja badanych cytokin przez komórki kontrolne, niczym niestymulowane (NT) świadczyłaby z kolei o wystąpieniu infekcji w prowadzonych hodowlach komórkowych.

Podsumowanie:

- **Testowana komora wyposażona została w system filtrów, które skutecznie zatrzymują drobnoustroje krążące w powietrzu.**
- **Lampa UV, w którą wyposażona była testowana komora skutecznie eliminowała drobnoustroje na całej powierzchni blatu roboczego.**
- **Komora właściwie zabezpieczała odczynniki i badany materiał podczas zakładania i prowadzenia hodowli ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.**
- **Przeprowadzone badania wykazały przydatność komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*.**

- **Sugerowane jest lepsze dopasowanie blatu roboczego do rozmiarów komory (tak, aby przy demontażu i montażu nie ocierał on o boczne ściany) lub wyposażenie urządzenia w dzielony blat roboczy.**
- **Komora ustawiona na stelażu z kółkami jest niestabilna. Sugerowane jest wprowadzenie zmian konstrukcyjnych poprawiających stabilność takiego rozwiązania.**
- **Sugerowane jest usunięcie portów USB z wnętrza komory lub odpowiednie zabezpieczenie ich zaślepkami.**
- **Sugerowana jest zmiana funkcjonalności wyświetlacza wewnątrz komory. Preferowana jest wymiana na ekran dotykowy wyświetlający zawartość zewnętrznych nośników wpinanych w port USB (zapisaną np. w plikach pdf). Przy czym port USB winien być zlokalizowany na zewnątrz komory w łatwo dostępnym miejscu.**
- **Port VGA umiejscowiony jest w miejscu bardzo trudno dostępnym. Aby podłączyć nowoczesny laptop (z portem HDMI) do urządzenia konieczny jest odpowiedni adapter. Sugerujemy dodanie portu HDMI.**
- **Sugerowane jest wykonanie uszczelek w szybach bocznych komory z innego materiału, bardziej odpornego na dekontaminację.**
- **Sugerowane jest wykonanie obudowy chroniącej filtr sufitowy z materiału umożliwiającego dezynfekcję.**
- **Sugerowane jest wprowadzenie niewielkich poprawek w panelu dotykowym sterującym pracą komory tak, aby ułatwić jego obsługę osobom o grubszych palcach.**

Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 150 cm
w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.

Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

Zespół realizujący badania:

.....
dr hab. Sylwia Wrotek

.....
dr Tomasz Jędrzejewski

.....
dr Jakub Piotrowski

.....
prof. dr hab. Wiesław Kozak

1. Ocena konstrukcji komory, jakości użytych materiałów, ergonomii pracy oraz łatwości przeprowadzania dekontaminacji podczas prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych oraz w trakcie wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

1.1. Ocena konstrukcji komory laminarnej oraz ergonomii pracy pod komorą

Ocena stabilności komory

Komorą laminarną dostarczoną do testowania cechowała się bardzo wysoką stabilnością. Nie doświadczone, aby tak podczas procedur dekontaminacji, jak i samego użytkowania konstrukcja chwiała się. Ma to duże znaczenie dla użytkowników, którzy chcą pod komorą umieszczać sprzęt, który wymaga stabilnego podłoża.

Ocena łatwości montażu poszczególnych elementów i zakresu regulacji położenia blatu roboczego

Testowana komora wyposażona była w jednolity (niedzielony) blat roboczy. Choć dobór konstrukcji blatu zależy od preferencji eksperymentatora i jego przeznaczenia, to każde rozwiązanie niesie za sobą korzyści i wady. Blat jednolity zabezpiecza przed spływaniem cieczy, jest łatwiejszy w codziennym utrzymaniu czystości pracy, a odpowiednio wypoziomowany jest stabilniejszy. Wadą takiego rozwiązania jest natomiast duża waga i nieporęczność. Aby wyjąć blat spod komory w celu dokładnej dekontaminacji potrzebne są co najmniej dwie osoby i duża przestrzeń w laboratorium, aby swobodnie nim manewrować.

Blat roboczy w testowanej komorze laminarnej był również niespasowany do rozmiarów otworu w panelu przednim, przez co przy wyjmowaniu rysował krawędzie boczne (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 1). Należy przy tym pamiętać, że zawsze wszelkie zarysowania powierzchni stanowią potencjalne siedlisko do rozwoju bakterii.



Fot. 1 Zarysowane elementy obudowy przez blat roboczy

Dostarczona do testów komora nie posiadała możliwości regulacji wysokości położenia blatu roboczego. Wysokość położenia blatu roboczego jest odpowiednia, jednak wyższe osoby mogą mieć problem podczas długotrwałego korzystania z urządzenia. Uważamy, iż wyposażenie komory w statyw umożliwiający regulację wysokości położenia blatu roboczego w znacznym stopniu przyczyni się do poprawienia ergonomii pracy z urządzeniem.

Ocena rozmiaru i wykonania blatu roboczego

Duża powierzchnia blatu roboczego w stosunku do rozmiarów komory pozwala na komfortową pracę. Dostępność do wszystkich materiałów standardowo umieszczanych pod komorą podczas pracy doświadczalnej jest bardzo dobra. Blat roboczy został wykonany bardzo solidnie, nie ugina się podczas pracy.

Ocena ilości i umiejscowienia gniazd zasilających, ich zabezpieczenie, położenie oraz szczelność zabezpieczenia otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika

Gniazda zasilające w dostarczonej komorze zostały zaprojektowane w wystarczającej ilości. Wszystkie trzy gniazda umieszczono jednak obok siebie przy lewej krawędzi komory (jak na

zdjęciu poniżej, Fot. 2). Wymusza to konieczność prowadzenia kabli do sprzętów, które użytkowane są w prawej części komory. Sugerujemy, aby jedno gniazdo przenieść bliżej prawej strony komory.



Fot. 2 Umieszczenie gniazd zasilających

Same gniazda zostały bardzo dobrze zabezpieczone przed ewentualnym zachlapaniem. Zastosowane zaślepki bardzo dobrze izolują również wewnętrzną część gniazd od wnętrza komory.

Testowana komora nie zawierała otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika. Wyposażona została w dwa krany doprowadzające gaz. Wyposażono je również w odpowiednie zaślepki zabezpieczające (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 3).



Fot. 3 Kran doprowadzający gaz zabezpieczony odpowiednią zaślepką (po prawej)

Ocena funkcjonalności panelu sterującego pracą komory

Dostarczona do testów komora wyposażona została w dotykowy panel sterujący stanowiący jednocześnie wyświetlacz monitorujący parametry pracy jak również w tradycyjny sterownik. Pracę z panelami sterującymi oceniamy bardzo wysoko i nie napotkaliśmy na problemy podczas pracy. Panel dotykowy jest bardzo responsywny nawet, gdy użytkownik ma założone rękawiczki. Czytelność wyświetlacza jest również bardzo dobra, pod różnymi kątami widzenia. Obsługa panelu jest prosta i intuicyjna, zapoznanie się z nią zajmuje kilka minut. Wskaźniki monitorowania przepływu powietrza jak również czujniki temperatury działają bezproblemowo. Sugerujemy jednak, aby zmienić nieco interface wyświetlacza, tak by wspomniane wyżej wskaźniki zajmowały mniej miejsca lub były ukryte w menu (dla przykładu z możliwością ich ukrycia lub przywrócenia na wyświetlacz). To sprawi, że elementy związane ze sterowaniem pracą komory będą mogły być większe. Przesuwanie ikon sterowania pracą komory w menu sprawiało bowiem małe problemy osobom o grubszych palcach, które zamiast trafić w symbol strzałki uruchamiały przypadkowo opcję z menu. Sugerujemy również dodanie monitorowania stanu zużycia filtrów powietrza. Umożliwi to użytkownikowi odpowiednio wcześniej zaopatrzenie się w zestaw filtrów do wymiany, aby zachować ciągłość pracy badawczej.

Ocena zabezpieczenia przestrzeni wewnętrznej komory po całkowitym zamknięciu

Po zamknięciu otworu roboczego szyba bardzo szczelnie przylega do uszczelki całkowicie izolując wnętrze komory od otoczenia. Zastosowane rozwiązanie konstrukcyjnie oceniamy bardzo wysoko. Nawet po pozostawieniu komory zamkniętej na kilka dni nie zaobserwowaliśmy, aby wewnątrz gromadziły się drobiny kurzu.

Ocena skuteczności działania blokad położenia panelu przedniego

Panel przedni komory prawidłowo blokuje się na odpowiedniej wysokości zgodnie z opcją wybraną w menu. Nie napotkaliśmy na problemy podczas użytkowania komory.

Ocena głośności komory i jakości oświetlenia

Zastosowane w komorze oświetlenie bardzo dobrze i równomiernie oświetla całą powierzchnię komory jednocześnie nie męcząc oczu eksperymentatora.

Komora w trybie pracy jest stosunkowo cicha, w porównaniu tak do komory testowej o szerokości 180cm jak i konkurencyjnych urządzeń. Pozwala to na komfortowe komunikowanie się dwóch osób, które jednocześnie pod nią pracują i nie przeszkadza w prowadzeniu niezależnych eksperymentów w pomieszczeniu laboratoryjnym.

Ocena działania alarmów zaburzenia laminarnego przepływu powietrza, braku zasilania i niewłaściwego położenia panelu przedniego i przerywania procedury naświetlania lampą UV

Testowana komora w prawidłowy sposób informuje o problemach z przepływem powietrza (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 4).



Fot. 4 Monit alarmujący o zaburzeniu przepływu powietrza

Wyświetla również informacje alarmowe, jeśli proces naświetlania lampą UV zostanie zakłócony. Sygnał dźwiękowy jest donośny, słychać go nawet z sąsiedniego pomieszczenia, co pozwala szybko zareagować na problem. Podobnie, wyświetlana jest również informacja alarmowa, jeśli pojawił się problem z zasilaniem. Natomiast komora nie wydaje dźwięku alarmującego o braku zasilania. Sugerujemy, aby wyposażyć komorę w taki system, pozwala on bowiem szybko zareagować eksperymentatorowi.

System automatycznego sterowania pracą komory, który oceniamy bardzo wysoko niesie za sobą jednak problem. W przypadku braku zasilania nie ma możliwości mechanicznego zamknięcia komory i zabezpieczenia jej wnętrza przed utratą sterylności.

Przy włączonym oświetleniu nie widać migającej na czerwono diody alarmowej. Sugerujemy, aby wprowadzić zmiany w oprogramowaniu sterującym oświetleniem tak, aby światło diody alarmowej było bardziej zauważalne dla eksperymentatora.

1.2. Ocena wytrzymałości materiałów na środki chemiczne stosowane do dezynfekcji oraz na zarysowania. Ocena łatwości przeprowadzenia dekontaminacji komory.

Ocena wytrzymałości materiałów, z których wykonano komorę na dekontaminację

Przez cały okres prowadzonych testów elementy komory były poddawane działaniu środków stosowanych do dezynfekcji chemicznej:

- 70% alkoholu etylowego,
- preparatu Neodisher,
- preparatu Puresept,
- preparatu Meliseptol,
- łagodnego mleczka do czyszczenia.

Wymienione środki chemiczne nanoszone były bezpośrednio na czyszczone powierzchnie, rozprowadzane za pomocą ręczników papierowych i wycierane do sucha.

Zastosowane środki chemiczne nie pozostawiły trwałych śladów na powierzchni elementów komory. Natomiast czarne uszczelki doszczelniające boczne szyby komory, pozostawiały czarne pozostałości na papierze (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 5), nawet po wielokrotnym czyszczeniu.



Fot. 5 Ślady na papierze po czyszczeniu uszczelki w ścianie bocznej

Ocena łatwości demontażu elementów blatu roboczego

Testowana komora laminarna wyposażona została w jednolity blat roboczy. Z tego względu element ten jest ciężki i wymaga co najmniej dwóch osób do demontażu i montażu. W testowanym egzemplarzu nie został on również spasowany z otworem przednim komory, przez co przy wyjmowaniu i wkładaniu przyciera boczne ścianki otworu przedniego, co w konsekwencji prowadzi do zarysowania obu elementów.

Sam blat, ze względu na znaczne rozmiary jest dość trudny w czyszczeniu, tym bardziej, iż laboratoria nie są wyposażane w bardzo duże zlewy. Nie zawiera on jednak trudno dostępnych miejsc, a otwory i krawędzie są prawidłowo wykonane chroniąc przed skałeczeniem.

Sugerujemy również nawiercenie dodatkowych otworów w blacie roboczym ułatwiających wyjmowanie i wkładanie go do komory. Przykładowy otwór (zamieszczony na Fot. 6), w który wyposażona jest komora Thermo Sci MSC Advantage użytkowana w Zakładzie Immunologii UMK przedstawiono na zdjęciu poniżej:



Fot. 6 Element blatu roboczego z otworem ułatwiający wyjmowanie i wkładanie w komorze Thermo Sci MSC Advantage

Ocena łatwości przeprowadzenia procesu dezynfekcji chemicznej komory

Konstrukcja komory została dobrze przemyślana, w związku z powyższym ilość trudno dostępnych miejsc jest ograniczona a czyszczenie komory nie sprawia problemów. Znacznie lepiej niż w przypadku testowanego modelu o długości 180cm zaprojektowano przestrzeń między blatem roboczym a panelem przednim (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 7).



Fot. 7 Szczelina między blatem komory a obudową

Jest ona łatwiejsza w czyszczeniu, choć podobnie, i co więcej, w przeciwieństwie do modeli o długości 180cm i 120cm, nie umieszczono w niej czujnika położenia panelu przedniego, co ułatwia proces dekontaminacji. Gniazda elektryczne są dobrze zabezpieczone, a ich dokładne wyczyszczenie nie sprawia trudności.

Ponieważ testowany model uległ uszkodzeniu w czasie transportu i ze względów bezpieczeństwa konieczne było zespolenie elementów obudowy (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 8) niemożliwe było otwarcie górnego panelu chroniącego szybę przednią w celu dokładnego wyczyszczenia.



Fot. 8 Zespolone elementy obudowy komory

Ocena wytrzymałości blatu roboczego na zarysowania

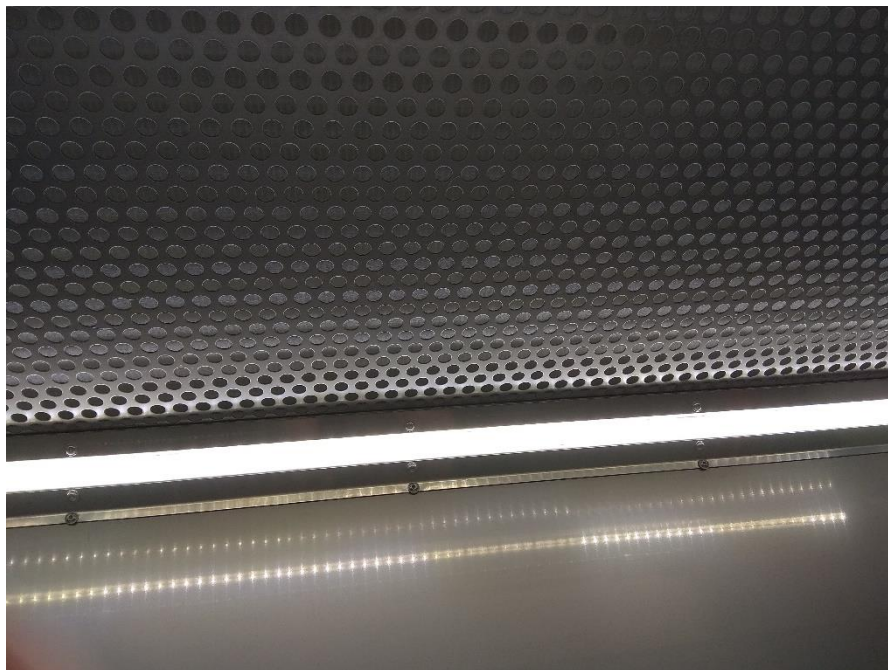
Materiał, z którego wykonano blat roboczy cechował przeciętną odpornością na zarysowania, przez co w trakcie pracy powstało ich wiele (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 9). Badania prowadzone w Zakładzie Immunologii wykazują, iż takie zarysowania stanowią nisze sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów. Utrudniają również utrzymanie komory w czystości. Znacznie wyżej oceniamy wykonanie blatu w komorze o długości 180cm. Sugerujemy zatem zmianę materiału, z którego wykonany jest blat roboczy lub pokrycie go odpowiednią warstwą zabezpieczającą.



Fot. 9 Zarysowania na blacie roboczym

Dodatkowe uwagi

W przeciwieństwie do wcześniej testowanych modeli, komorę wyposażono w odpowiednią osłonę filtru sufitowego (jak na zdjęciu poniżej, Fot. 10).



Fot. 10 Osłona filtru sufitowego

2. Analiza skuteczności działania filtrów powietrza i lampy ultrafioletowej w trakcie prowadzenia hodowli linii komórkowych i wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

2.1. Ocena skuteczności działania filtrów powietrza

Ocena skuteczności działania komory obejmowała sprawdzenie laminarnego przepływu powietrza po umieszczeniu w niej materiałów (pudełka z końcówkami, pipety automatyczne, wytrząsarka laboratoryjna, pipetor, pojemnik na odpady), które standardowo używane są w trakcie hodowli komórkowych *in vitro* i testów immunologicznych.

Wykonano również analizę skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu atmosferycznym w następujących wariantach czasowych: przed rozpoczęciem pracy pod komorą oraz po upływie 15 minut, 60 minut, 3 i 5 godzin od chwili włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Do oceny czystości mikrobiologicznej powietrza wykorzystane zostały następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży
- płytki odciskowe (kontaktowe) BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów;
- płytki odciskowe Sabouraud - do oznaczania drożdży i pleśni.

Odniesieniem do wyników pomiarów było analogiczne badanie czystości mikrobiologicznej powietrza w laboratorium, w którym znajdowała się komora. Próby pobrano z powierzchni blatów laboratoryjnych. Uzyskane wyniki zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 1), gdzie „-” oznacza negatywny wynik testu; „+” niewielką infekcję; „++” silną infekcję; „+++” bardzo silną infekcję.

Tab. 1 Zestawienie wyników analizy skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu

Nazwa testu	Wariant czasowy	Testowane miejsce	Wynik testu
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-

Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-

Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Biocount PCA	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Hygicult TPC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-

CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
CompactDry TC	Kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-

Obserwacja: analiza mikrobiologiczna przeprowadzona za pomocą testów Biocount Sabouard i PCA; Hygicult TPC i YF; CompactDry TC i YM nie wykazała obecności mikroorganizmów na blacie komory.

Wykonano również ocenę skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB (bogatego w substancje odżywcze: peptydy, aminokwasy witaminy rozpuszczalne w wodzie oraz węglowodany), które stanowi wysoce podatną na infekcje pożywkę do hodowli bakterii. Sterylną pożywkę LB rozlano pod komorą do szalek Petriego tak, aby tworzyła ona na dnie kilkumilimetrową warstwę. Pożywkę rozlewano po 15 minutach, 60 minutach, 3 i 5 godzinach od włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Szalki z otwartym wieczkiem pozostawiono pod komorą na 10 minut (tak zwany test otwartej płytki). Ocenę czystości mikrobiologicznej wykonano z użyciem testów HYGICULT TPC i CompactDry TC. Wyniki badania zestawiono w tabeli poniżej (Tab. 2), gdzie „-„ oznacza brak infekcji, „+” oznacza stwierdzoną infekcję:

Tab. 2 Wyniki oceny skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB

Lokalizacja szalki	Wariant czasowy	Wynik
Środek blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Lewy brzeg blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Prawy brzeg blatu komory	15'	-

	60'	-
	3h	-
	5h	-
Kontrola (poza komorą)	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-

Obserwacja: Za pomocą testu otwartej płytki nie wykryto skażenia mikrobiologicznego w komorze w żadnym z wariantów czasowych. Również pogłębiona analiza pożywki LB, za pomocą testów Hygicult TPC i CompactDry TC nie wykazała skażenia.

Wnioski:

Badana komora w prawidłowy sposób generowała laminarny przepływ powietrza, którego nie zaburzało ustawienie na jej blacie materiałów i drobnego sprzętu laboratoryjnego.

System monitorowania przepływu powietrza prawidłowo diagnozował problemy z przepływem (po zasłonięciu otworów w blacie roboczym) i wydawał głośny sygnał alarmowy.

Nie stwierdzono obecności mikroorganizmów na blacie roboczym komory, nawet po długim czasie pracy urządzenia, co potwierdza skuteczność działania filtrów powietrza.

2.2. Ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowego działania lampy UV

Ocenie podlegało umiejscowienie lampy UV pod komorą warunkujące ekspozycję na promieniowanie całej powierzchni blatu roboczego. Ze względów bezpieczeństwa i higieny pracy oceniono również zabezpieczenie przed włączeniem lampy, jeśli panel przedni komory nie jest zamknięty lub czy uniemożliwia on podniesienie panelu w trakcie naświetlania. Oceniono możliwość zaprogramowania czasu pracy lampy UV oraz zaprogramowania włączenia lampy UV z opóźnieniem czasowym umożliwiające opuszczenie pomieszczenia badawczego przez eksperymentatora. Ocenie podlegała również poprawność automatycznego wyłączenia naświetlania po zakończeniu ekspozycji oraz wskazania licznika czasu pracy lampy UV.

Ocena skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonana została metodą kontaktową z użyciem płytek odciskowych. Czystość mikrobiologiczna miejsc trudno dostępnych, łączenia elementów i zakrzywionych powierzchni została oceniona metodą wymazową z użyciem

zwilżonego jałowego wacika. Materiał do badań pobrany został przed i po naświetlaniu lampą UV, stosując standardowy czas ekspozycji 30 minut. Oceniona została czystość mikrobiologiczna blatu roboczego oraz zewnętrznych powierzchni materiałów znajdujących się pod komorą (pudełka na końcówki, pipety automatyczne, statyw na probówki), na które bezpośrednio oddziaływały promienie UV. Do oceny skuteczności bakteriobójczej lampy UV wykorzystano następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii
- płytki odciskowe (kontaktowe) typu BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów.

Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 3), gdzie „-”, oznacza brak infekcji; „+” oznacza stwierdzoną infekcję.

Tab. 3 Wyniki oceny skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonanej metodą kontaktową

Nazwa testu	Testowane miejsce	Wynik przed sterylizacją	Wynik po sterylizacji
Biocount PCA	Blat komory	-	-
Biocount PCA	Pipety pod komorą	-	-
Biocount PCA	Pudełko z końcówkami pod komorą	-	-
Hygicult TPC	Blat komory	-	-
Hygicult TPC	Górny lewy róg komory (od wewnątrz)	-	-
Hygicult TPC	Filtr sufitowy	-	-
Hygicult TPC	Tyłna ścianka ze stali kwasoodpornej	-	-
Hygicult TPC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-
CompactDry TC	Szpary między płytami blatu ze stali kwasoodpornej	-	-
CompactDry TC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-

CompactDry TC	Powierzchnia wokół gniazd prądu	-	-
CompactDry TC	Powierzchnia wokół i w kranach	-	-

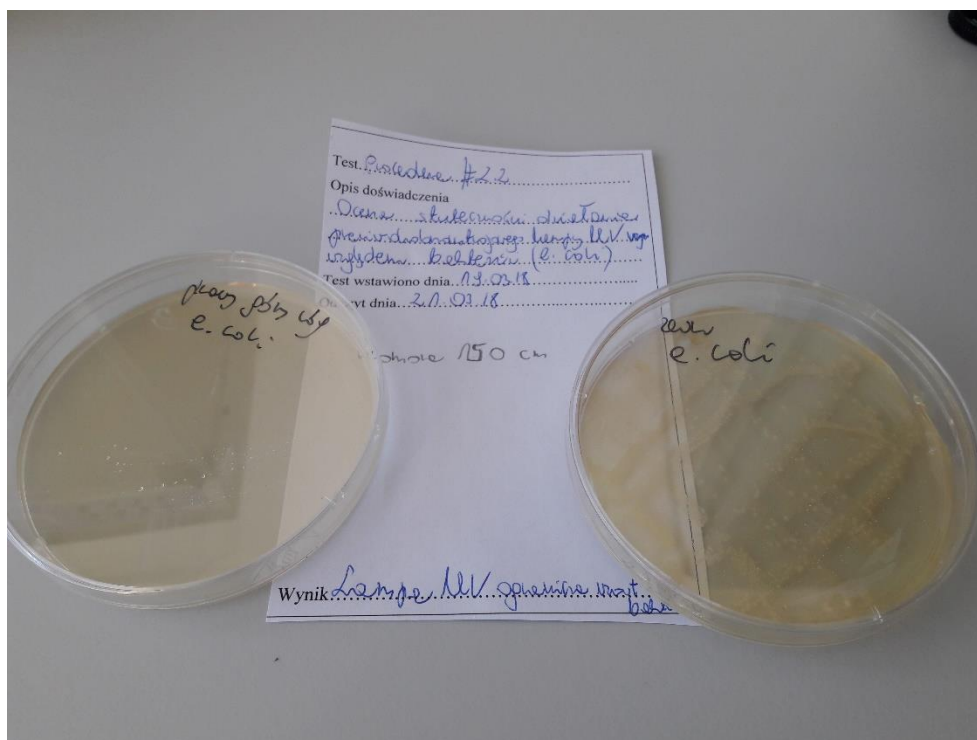
Obserwacja: Lampa UV, w którą wyposażona została testowana komora skutecznie niszczyła drobnoustroje na testowanych powierzchniach, zarówno na blacie, materiałach umieszczonych pod komorą.

Skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego lampy UV oceniono również względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli* wysianych na podłożu stałym (agar) na szalce Petriego. Szalki z posiewem bakteryjnym umieszczono w wybranych miejscach na blacie roboczym (w centralnym punkcie oraz w narożnikach), po czym poddane zostały działaniu lampy UV przez 30 minut. Po zakończeniu ekspozycji szlaki zostały przeniesione do inkubatora ustawionego na 37°C na 24 godziny. Szalki kontrolne natychmiast po wysianiu umieszczono w inkubatorze w temp. 37°C. Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 4), gdzie „-„ oznacza brak kolonii; „+” oznacza jedną kolonię; „++” oznacza kilka kolonii; „+++” oznacza nieograniczony wzrost bakterii.

Tab. 4 Ocena działania przeciwdrobnoustrojowego lampy UV względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli*

Lokalizacja szalki z <i>E. coli</i>	Wynik
Blat komory środek, przód	-
Blat komory środek, tył	-
Blat komory lewa strona	-
Blat komory prawa strona	-
Kontrola	+++
Kontrola	+++
Kontrola	+++

Przykładowy wynik testu przedstawia poniższe zdjęcie:



Fot. 4 Kontrolna szalka z posiewem *E. coli* (po prawej) nie poddana działaniu promieniowania UV (widoczne liczne kolonie bakteryjne). Po lewej posiew *E. coli* po zakończeniu 30 minutowego programu sterylizacji UV. Szalka ustawiona była w prawym brzegu blatu roboczego (brak kolonii bakteryjnych)

Wnioski:

Lampa ultrafioletowa, w którą wyposażona została komora skutecznie naświetlała całą powierzchnię blatu roboczego. Nie stwierdzono infekcji tak na samym blacie roboczym, jak i na powierzchni materiałów używanych pod komorą oraz w trudno dostępnych miejscach.

Poziom zabezpieczeń komory jest również bardzo dobry. Możliwe jest zaprogramowanie czasu naświetlania, jak również opóźnienia czasowego włączenia ekspozycji. Pozwala to na opuszczenie pomieszczenia przez eksperymentatora, na co bardzo dużą uwagę zwraca inspekcja BHP. Niemożliwe jest również uruchomienie procedury naświetlania bez opuszczenia przedniego panelu komory, jak również podniesienie go w trakcie działania lampy UV. Szczelnie przylegający przedni panel komory skutecznie zabezpiecza przed działaniem promieni UV.

Po zakończeniu naświetlania proces jest prawidłowo kończony i odpowiednia informacja wyświetlana jest na panelu sterującym. Podobna informacja wyświetlana jest, gdy urządzenie jest ponownie uruchamiane.

Przeprowadzona procedura sterylizacji lampą UV skutecznie eliminowała posiew bakterii *E. coli* w szalkach rozstawionych w różnych częściach blatu roboczego.

Materiał wyścielający górną część komory, który prawdopodobnie pełni funkcje filtracyjne nie pozwala na skuteczne czyszczenie i sterylizację. Choć w przeciwieństwie do testowanej komory o długości 180 cm, nie stwierdzono w tym miejscu infekcji, sugerujemy zmiany konstrukcyjne mające na celu wyeliminowanie tego problemu, dla przykładu, zastosowanie odpowiedniej maskownicy ze stali kwasoodpornej.

3. Ocena przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

3.1. Badanie czystości mikrobiologicznej pożywek oraz odczynników wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych przygotowywanych pod komorą laminarną

W opisywanych badaniach wykorzystano następujące pożywki hodowlane oraz odczynniki:

- pożywkę RPMI 1640,
- pożywkę DMEM,
- pożywkę Medium 200,
- płodową surowicę bydlęcą (FBS),
- buforowaną fosforanami sól fizjologiczną (PBS),
- medium do separacji limfocytów (LSM).

Wszystkie powyższe pożywki i odczynniki są powszechnie wykorzystywane w praktyce laboratoryjnej do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, co więcej są bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Stąd też praca z ich użyciem musi odbywać się pod prawidłowo działającą komorą laminarną.

Wszystkie pożywki i odczynniki użyte w badaniu stanowiły sterylne, komercyjne roztwory dostarczone w butelkach zabezpieczonych plastikową plombą. Po otwarciu butelek pod komorą laminarną badane roztwory inkubowane były w otwartych naczyniach hodowlanych:

- płytkach 96-dołkowych (w objętości 200 μ L),
- płytkach 24-dołkowych (w objętości 1 mL),
- płytkach 12-dołkowych (w objętości 2 mL),
- butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² (w objętości 200 μ L).

Są to naczynia hodowlane najczęściej używane w laboratorium do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, jak również w doświadczeniach z ich wykorzystaniem. W butelkach hodowlanych nie inkubowano płodowej surowicy bydlęcej i medium do separacji limfocytów, ponieważ w praktyce laboratoryjnej nie ma przykładów takiego ich użycia.

W przebiegu badań odczynniki i pożywki w różnych naczyniach inkubowane były przez 15 minut, 30 minut lub godzinę. Czasy inkubacji dobrano tak, aby odpowiadały standardowym procedurom wykonywanym pod komorą laminarną w trakcie prowadzonych badań. Po zakończeniu inkubacji wszystkie roztwory zostały zebrane do sterylnych probówek typu falcon i inkubowane były w cieplarni przez 48 h w temperaturze 35°C w celu zapewnienia warunków do wzrostu mikroorganizmom, które mogłyby zainfekować badane roztwory.

Następnie wykonana została specjalistyczna analiza czystości mikrobiologicznej każdego badanego roztworu, w każdym użytym naczyniu hodowlanym i po każdym z wymienionych czasów inkubacji pod komorą. Użyto w niej komercyjnych testów:

- Hygicult TPC (do oceny ogólnej liczby drobnoustrojów),
- CompactDry TC (do oznaczania ogólnej liczby bakterii),
- Hygicult Y+F (do oceny zakażenia pleśniami lub drożdżami),
- CompactDry YM (do oznaczania pleśni i drożdży).

Wyniki przeprowadzonych testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 5).

Tab. 5 Wyniki analizy czystości mikrobiologicznej pożywek inkubowanych w różnych typach naczyń hodowlanych pod komorą

Stosowany roztwór	Naczynie hodowlane	Czas inkubacji	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Pożywka RPMI 1640	Płytko 96-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko 96-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko 96-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko 24-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko 24-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko 24-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

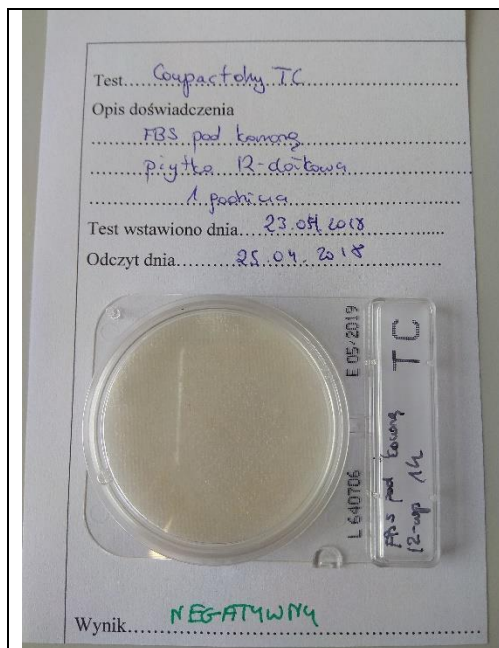
Pożywka RPMI 1640	Płytki 12-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytki 12-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytki 12-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelki hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelki hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelki hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 96-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 96-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 96-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 24-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 24-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 24-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 12-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 12-dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytki 12-dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelki hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelki hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelki hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 96-dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Pożywka Medium200	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelki hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelki hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelki hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

PBS	Płytki 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytki 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

LSM	Płytko 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytko 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytko 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

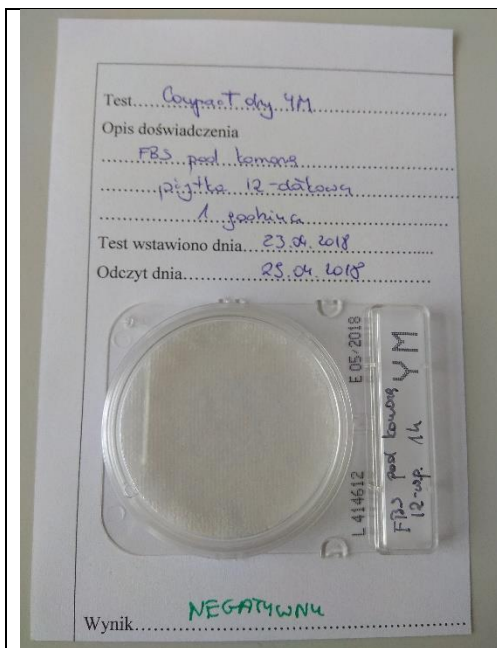
Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



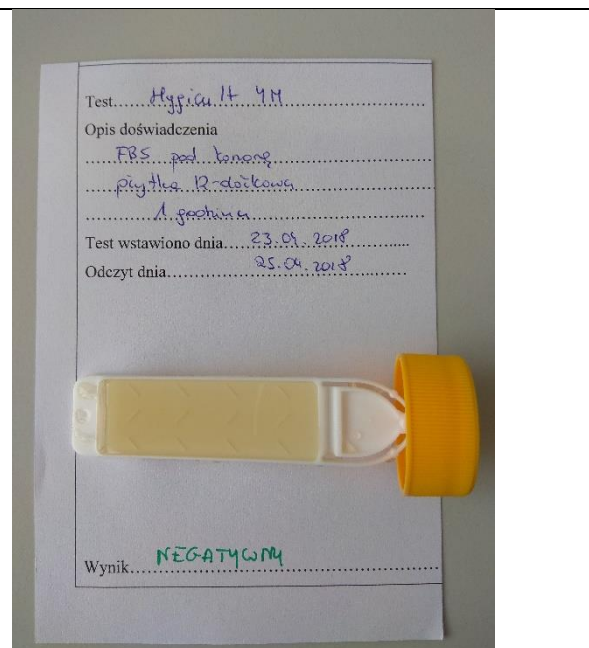
Fot. 5 Płodowa surowica bydłęca (FBS) inkubowana **pod komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (brak infekcji bakteryjnej)



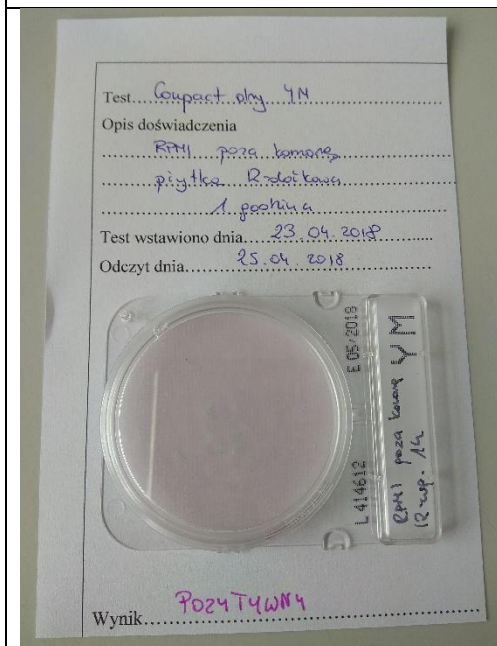
Fot. 6 Płodowa surowica bydłęca (FBS) inkubowana **pod komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (brak infekcji bakteryjnej)



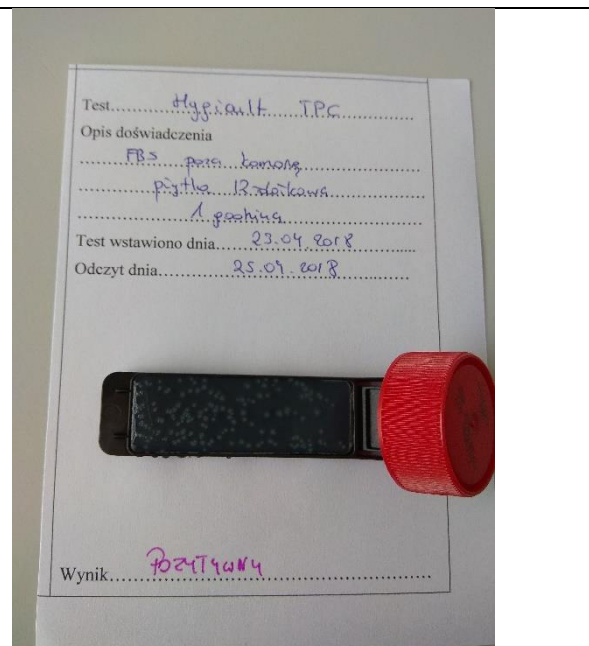
Fot. 7 Płodowa surowica bydlęca (FBS) inkubowana **pod komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 8 Płodowa surowica bydlęca (FBS) inkubowana **pod komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 9 Pożywka RPMI 1640 inkubowana **poza komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (znaczna infekcja bakteryjna)



Fot. 10 Płodowa surowica bydlęca FBS inkubowana **poza komorą** przez godzinę na płytce 12-dołkowej (widoczne liczne bakteryjne)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami testowanych pożywek hodowlanych i odczynników inkubowanych pod komorą laminarną w naczyniach hodowlanych. Porównanie tych wyników z dodatkowymi badaniami kontrolnymi prowadzonymi w niesterylnych warunkach, poza komorą, które wykazały infekcje dowodzi, iż system filtrów, w jakie komora została wyposażona skutecznie chroni powietrze przed mikroorganizmami.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do przygotowywania i korzystania z pożywek oraz odczynników standardowo wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.2. Ocena przydatności komory podczas zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

W ramach oceny przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych, wykonano procedury związane z zakładaniem i prowadzeniem hodowli linii ludzkich:

- komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC; nr katalogowy C0035C), pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*),
- komórki MCF-7 (Lot. 13K023), pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*).

i zwierzęcych:

- mysie fibroblasty L929 (NCTC klon 929; numer CCL-1) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).
- mysie makrofagi RAW 264.7 (nr katalogowy TIB-71) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną. Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- Fibroblasty L929 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC – w pożywce Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierającej 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (LSGS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 97 ml Medium 200, 2 ml LSGS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Komórki MCF-7 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS), mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (NAA). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 88 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS, 1 ml roztworu antybiotyków oraz 1 ml NAA.
- Mysie makrofagi RAW 264.7 – w pożywce DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej i mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki DMEM, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.

Czystość mikrobiologiczną pożywek oceniono przed założeniem hodowli komórkowej (w celu wyeliminowania ryzyka, iż komórki podczas zakładania hodowli będą przenoszone do zainfekowanej pożywki) oraz po wykonaniu jednego pasażu komórek, po upływie 2-3 dni od momentu założenia hodowli komórkowej (w zależności od momentu osiągnięcia przez hodowlę stanu konfluencji wynoszącego 70-80%).

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

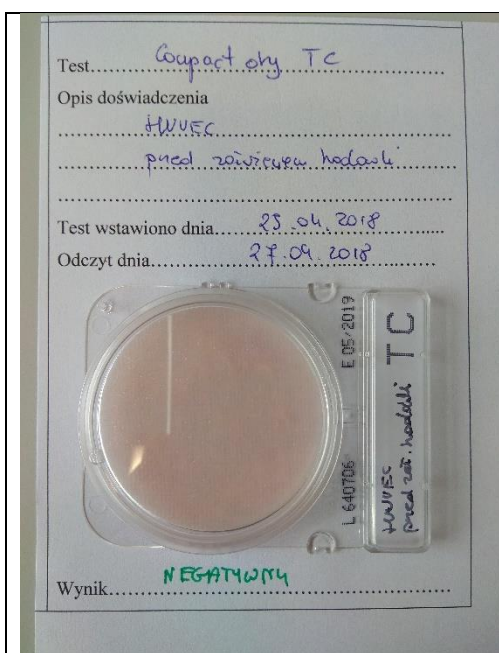
- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F - do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 6).

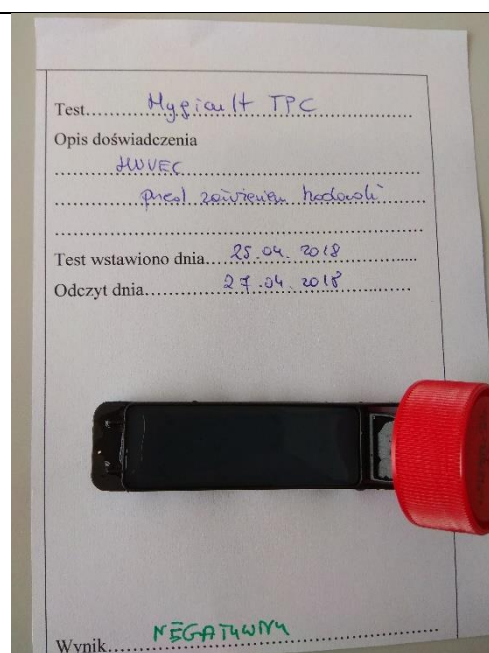
Tab. 6 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej pożywek przed założeniem hodowli komórkowej i po wykonaniu pasażu

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Fibroblasty L929	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Fibroblasty L929	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



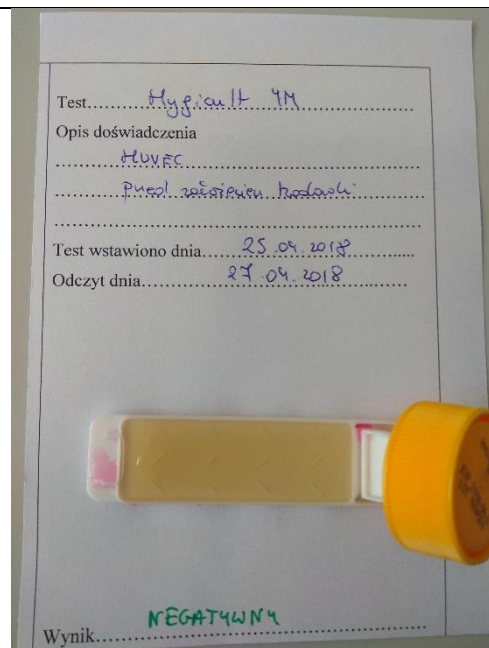
Fot. 11 Wyjściowa zawiesina komórek HUVEC przygotowana pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 12 Wyjściowa zawiesina komórek HUVEC przygotowana pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 13 Wyjściowa zawiesina komórek HUVEC przygotowana pod komorą (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 14 Wyjściowa zawiesina komórek HUVEC przygotowana pod komorą (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek hodowlanych używanych do prowadzenia hodowli komórkowych, które przygotowywane były pod testowaną komorą.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro*, po wykonaniu jednego pasażu komórek.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.3. Izolacja i hodowla *in vitro* pierwotnych zwierzęcych linii komórkowych

Oceniona została czystość mikrobiologiczna hodowli *in vitro* komórek mononuklearnych krwi obwodowej – PBMC (z ang. *peripheral blood mononuclear cells*) izolowanych pod testowaną komorą laminarną.

Źródłem komórek była krew obwodowa szczura rasy WISTAR, zdrowego samca ważącego 250 g pochodzącego z jednostki uprawnionej do prowadzenia hodowli zwierząt doświadczalnych (zarejestrowanej przez MNiSW). Krew pobrano na sterylny roztwór antykoagulantu (wersenian tripatasowy, K₃EDTA). Procedurę wykonano w sterylnym pomieszczeniu chirurgicznym z wykorzystaniem sterylnych i jednorazowych materiałów chirurgicznych. Pozostałe etapy izolacji frakcji mononuklearnej (PBMC) z krwi pełnej przeprowadzono pod testowaną komorą laminarną. Składały się na nie:

1. Nawarstwienie krwi rozcieńczonej w stosunku 1:1 sterylnym buforem PBS na roztwór generujący gradient gęstości – medium do separacji limfocytów (LSM) w sterylnej probówce wirówkowej typu Falcon.
2. Wirowanie w gradiencie gęstości LSM (400 x g przez 30 minut).
3. Zebranie frakcji komórek PBMC, która tworzy dobrze widoczny pierścień na granicy osocza i medium do separacji limfocytów.
4. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości medium do separacji limfocytów.
5. Hemoliza erytrocytów w 0,85% sterylnym roztworze chlorku amonu.
6. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości chlorku amonu.

Wyizolowane komórki PBMC hodowano następnie w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającą 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu stężonych antybiotyków.

Hodowlę prowadzono na płytkach 24-dołkowych (1 milion komórek na mililitr pożywki) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 95% wilgotności w inkubatorze. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji podczas hodowli, przed użyciem inkubator wysterylizowano w temperaturze 186°C.

Po upływie 24 i 48 godzin zawartość dołków została zebrana w celu wykonania analizy czystości mikrobiologicznej. Analizie poddana została również wyjściowa zawiesina komórek stanowiąca bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

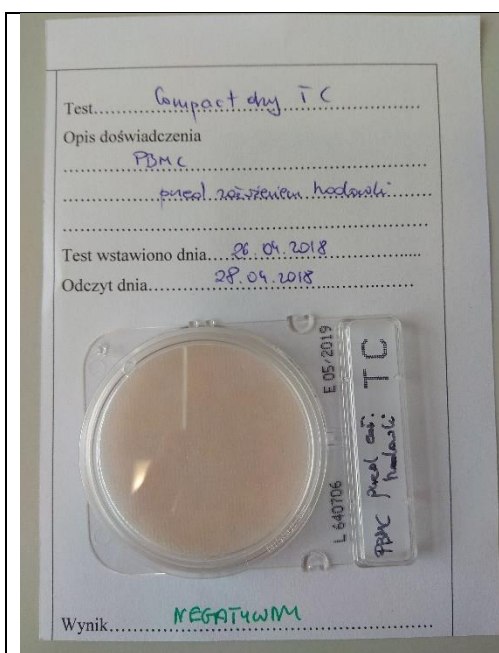
- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 7).

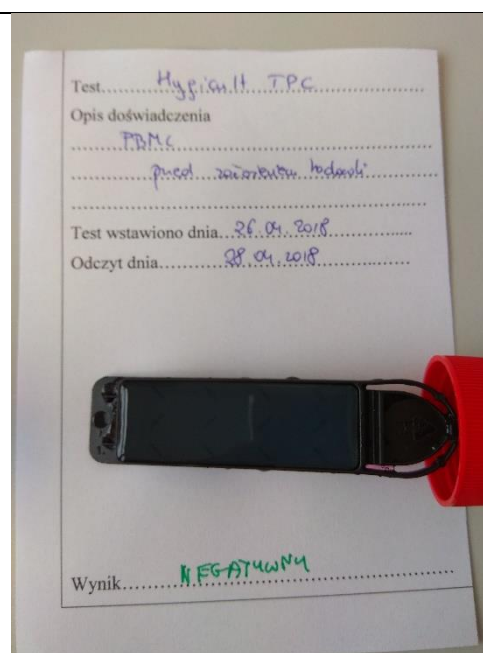
Tab. 7 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej wyjściowej zawiesiny komórek PBMC oraz hodowli po upływie 24 i 48 h od założenia hodowli

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
PBMC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 24 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 48 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

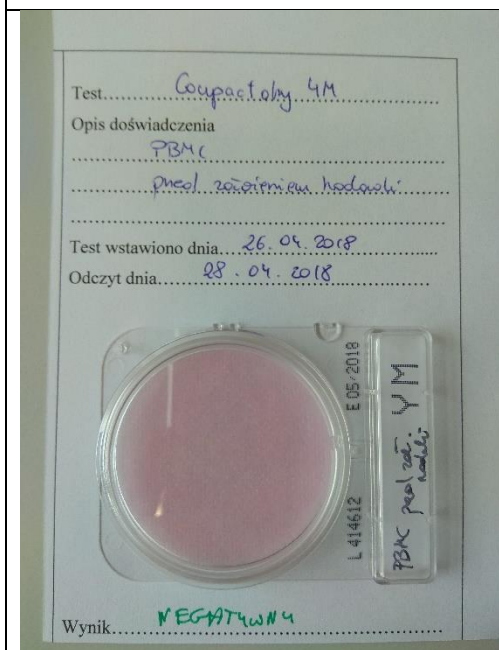
Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiono na zdjęciach poniżej.



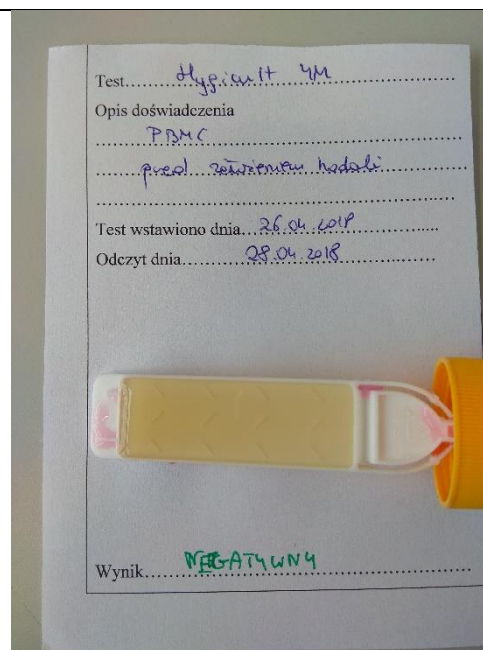
Fot. 15 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 16 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 17 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 18 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami wyjściowej zawiesiny komórek PBMC stanowiącej bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywki po upływie 24 h i 48 h od założenia hodowli.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do prowadzenia izolacji i hodowli *in vitro* pierwotnych linii komórkowych.

4. Ocena przydatności komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*

4.1. Oznaczenie przeżywalności i wskaźnika proliferacji wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w wykonywaniu oznaczeń aktywności metabolicznej (po 24 godzinach) oraz stopnia proliferacji (po 48 i 72 godzinach) komórek należących do czterech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC, mysich fibroblastów L929, mysich makrofagów RAW 264.7 (wszystkie trzy linie pochodzą z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC; z ang. *American Type Culture Collection*) oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7 pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*). Ocena przeżywalności i wskaźnika proliferacji komórek została wykonana z użyciem testu MTT. Zasada testu MTT oparta jest na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej aktywnej w żywych komórkach do przekształcania soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy) do niebieskiego formazanu, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie. Wartość zmierzonej absorpcji jest wprost proporcjonalna do ilości żywych, aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach płytki hodowlanej.

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

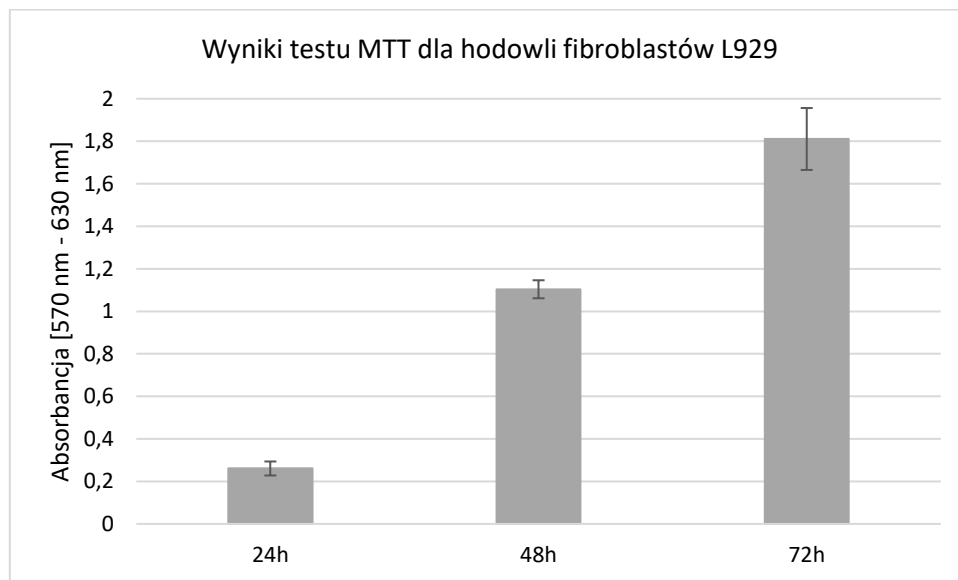
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla mysich fibroblastów L929 - pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicę bydlęcą (z ang. fetal bovine serum; FBS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),

- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich fibroblastów L929

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji mysich fibroblastów L929 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 1) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu ± błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 1 Wyniki testu MTT dla hodowli fibroblastów L929

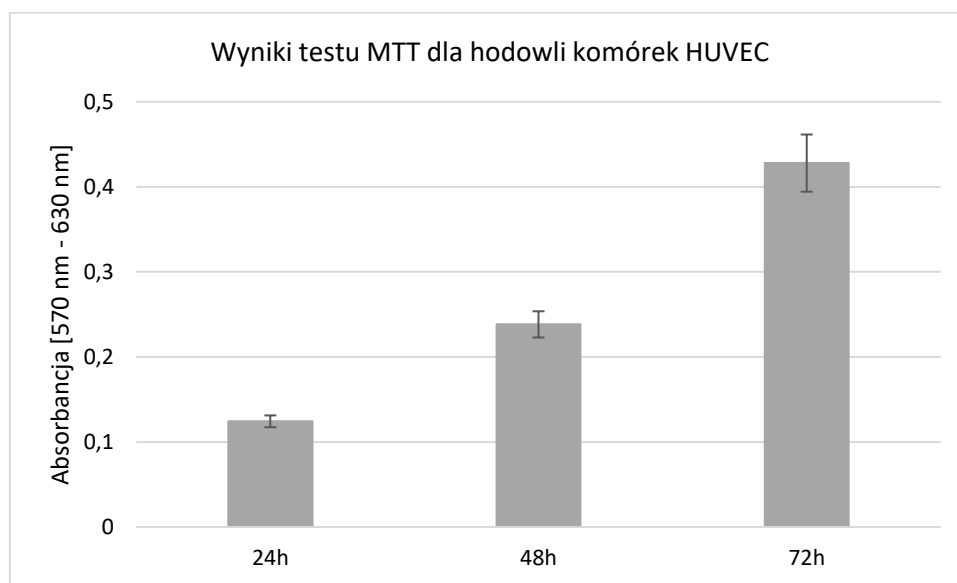
Obserwacja:

Jak można zaobserwować na powyższej rycinie wraz ze wydłużeniem czasu inkubacji, odnotowano znaczący wzrost liczby żywych komórek, świadczący o wysokim stopniu ich proliferacji. Uzyskany wynik jest zgodny z powszechną wiedzą dotyczącą zdolności mysich fibroblastów L929 do spontanicznej proliferacji, bez konieczności stosowania związków o charakterze mitogenów, których celem jest pobudzenie tego procesu. Na podstawie

przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas zakładania hodowli komórkowej, jak i przeprowadzania samej procedury MTT z wykorzystaniem komory, nie doszło do zainfekowania komórek patogenami. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji ze względu na fakt, iż zainfekowane linie komórkowe charakteryzują się obniżoną przeżywalnością oraz spadkiem tempa proliferacji.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek HUVEC (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 2) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 2 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek HUVEC

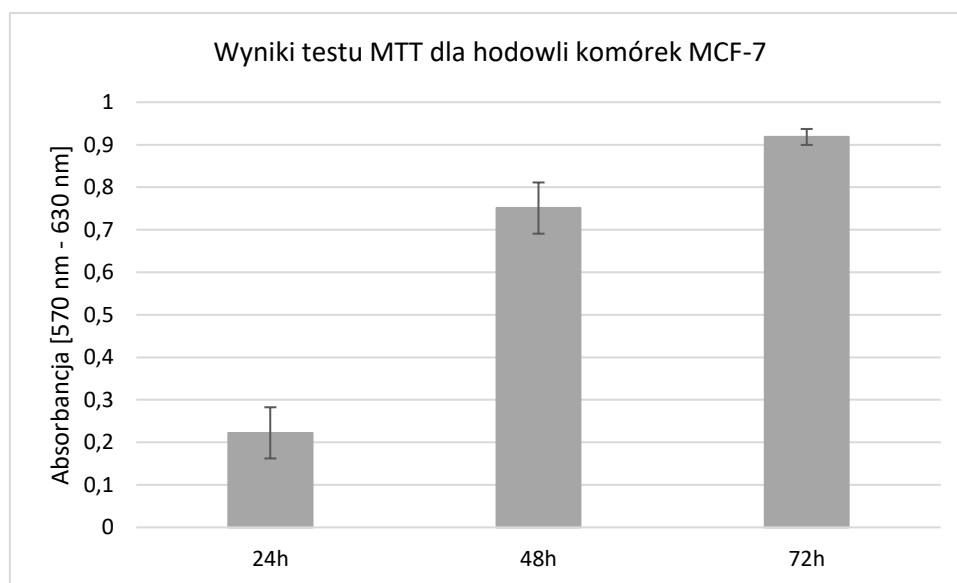
Obserwacja:

Uzyskane wyniki wykazały, iż wraz z wydłużeniem czasu inkubacji nastąpił wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach w obrębie 96-dolkowej płytki hodowlanej. Komórki HUVEC stanowią linie komórkową, która nie wymaga użycia czynnika

(mitogenu) indukującego proces ich proliferacji. Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji można stwierdzić, iż użyte podczas procedury komórki znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym i ich procesy metaboliczne nie były zakłócone, co w znaczący sposób wyklucza wystąpienie infekcji podczas przeprowadzania całej procedury.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek raka piersi MCF-7

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek MCF-7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 3) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 3 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek MCF-7

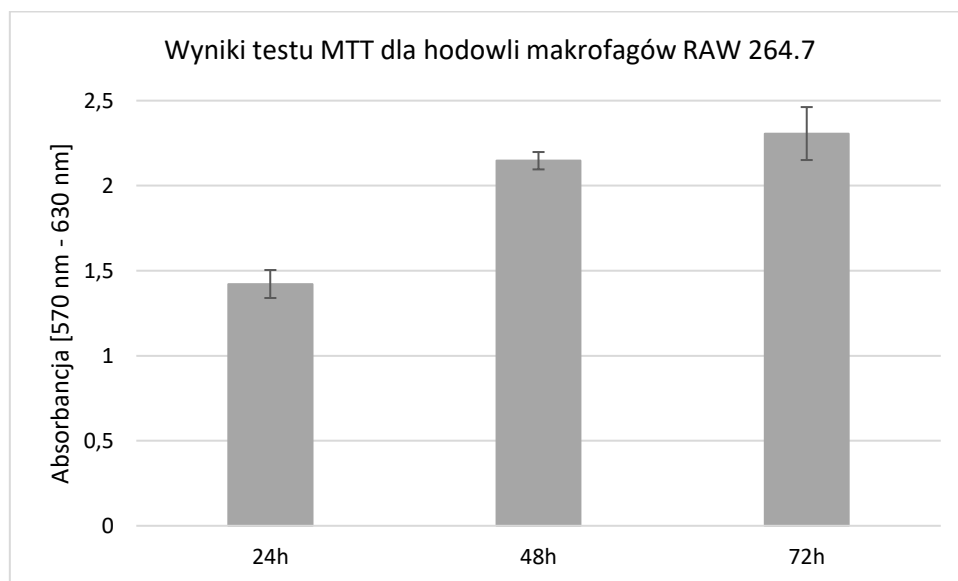
Obserwacja:

Wyniki uzyskane na podstawie testu MTT jednoznacznie wskazują, że wraz z wydłużeniem czasu hodowli, zwiększa się liczba aktywnych metabolicznie komórek MCF-7, o czym świadczą wyższe wartości pomiaru absorbancji. Komórki MCF-7 jako klasyczna linia komórek nowotworowych charakteryzuje się wysokim tempem proliferacji. Na powyższej rycinie można także zaobserwować stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w porównaniu do 72-godzinnego

czasu hodowli. Wynika to z faktu, iż ze względu na intensywny proces proliferacji komórek nowotworowych po upływie 48 godzin uzyskiwany jest niemal 100% stan konfluencji, który ogranicza dalsze podziały komórkowe. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko podczas prowadzenia hodowli komórkowych. Zostało ono potwierdzone przy użyciu mikroskopu z odwróconą optyką i wskazuje jednoznacznie na prawidłowy stan fizjologiczny i aktywność metaboliczną hodowanych komórek.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich makrofagów RAW 264.7

Poniższy wykres (Ryc. 4) przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek RAW 264.7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 4 Wyniki testu MTT dla hodowli makrofagów RAW 264.7

Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru absorbancji wykonane po zakończeniu testu MTT jednoznacznie wskazują na dużą aktywność metaboliczną mysich makrofagów RAW 264.7, o czym świadczy wzrost wartości absorbancji wraz z wydłużeniem czasu hodowli komórek. Badana linia komórkowa charakteryzuje się bardzo dużym wskaźnikiem tempa proliferacji, co

potwierdzają uzyskane wysokie wartości absorbancji rzędu przekraczające wartość 2 jednostek. Zaobserwowano także stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w stosunku do 72-godzinnego czasu hodowli. Przy użyciu mikroskopu świetlnego z odwróconą optyką, zauważono, iż po upływie 48 godzin hodowli niemal cała powierzchnia dołka na płycie hodowlanej była porośnięta żywymi komórkami o charakterystycznym wydłużonym kształcie. W związku z uzyskaniem przez komórki niemal 100% stanu konfluencji, została ograniczona wolna przestrzeń dla ich dalszych podziałów, co tłumaczy niewielkie różnice w wartościach absorbancji pomiędzy 48- i 72-godzinnym czasem inkubacji. Tak jak już wspomniano powyżej, jest to zjawisko korzystne w kontekście prowadzenia hodowli aktywnych metabolicznie komórek przeznaczonych do testów immunologicznych *in vitro*.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur dotyczących oznaczania przeżywalności i wskaźnika proliferacji czterech komercyjnie dostępnych linii komórkowych jednoznacznie wskazują na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w omówionych testach immunologicznych *in vitro* (teście MTT). W przypadku wszystkich wykonanych analiz zaobserwowano, iż wraz z wydłużeniem czasu hodowli następował wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek, co potwierdzały wyniki pomiarów absorbancji. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko, które świadczy o prawidłowym stanie fizjologicznym, jak i o dużej aktywności metabolicznej komórek.

Na podstawie przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas prowadzenia hodowli komórkowych, jak i wykonywania testów MTT z wykorzystaniem komory nie doszło do zainfekowania badanych linii komórkowych. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji.

4.2. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu przez komórki należące do wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w prowadzeniu fluorymetrycznych oznaczeń poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT), które to pomiary są jednym z podstawowych wskaźników stanu fizjologicznego komórek. Badania te przeprowadzono z użyciem trzech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek raka piersi MCF-7, ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i mysich makrofagów

RAW 264.7 stymulowanych nadtlakiem wodoru w dwu stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM. Ilość wolnych rodniów w komórkach zmierzono z użyciem gotowego zestawu fluorymetrycznego firmy Sigma-Aldrich (nr katalogowy MAK143 Sigma) oraz 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (2',7'DCF-DA). W obu przypadkach intensywność fluorescencji była proporcjonalna do ilości powstających RFT.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

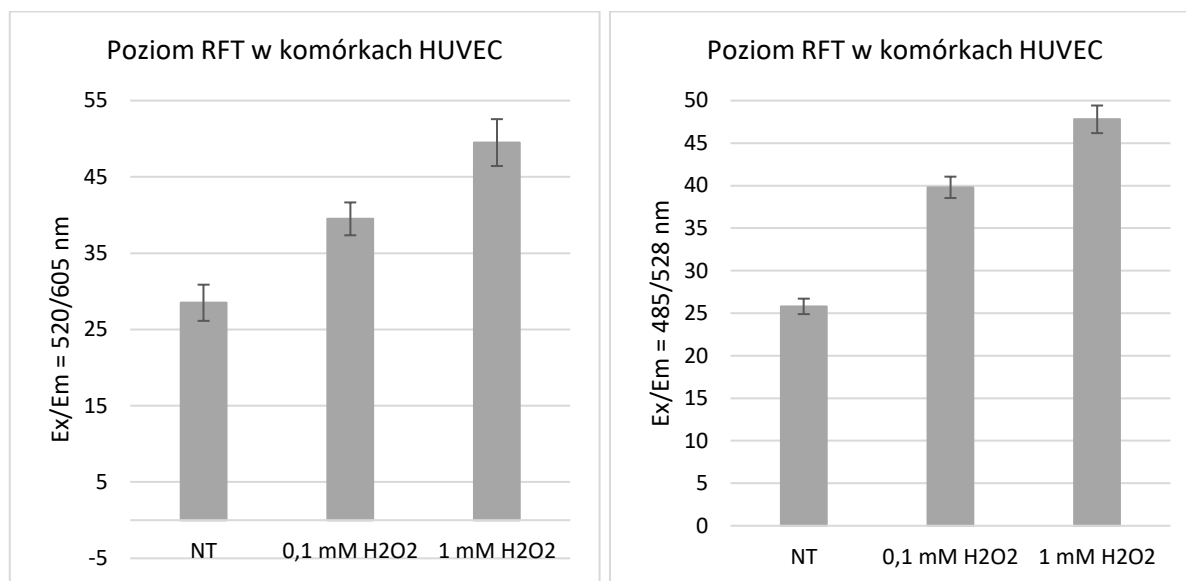
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłona żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RTF) w ludzkich komórkach śródbłona żyły pępowinowej HUVEC

Na poniższych wykresach (Ryc. 5 i 6) przedstawiono poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HUVEC (25000 na dołek) stymulowanych dwoma stężeniami nadtlaku wodoru (0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny),

uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 5 i 6 Poziom RFT w komórkach HUVEC oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

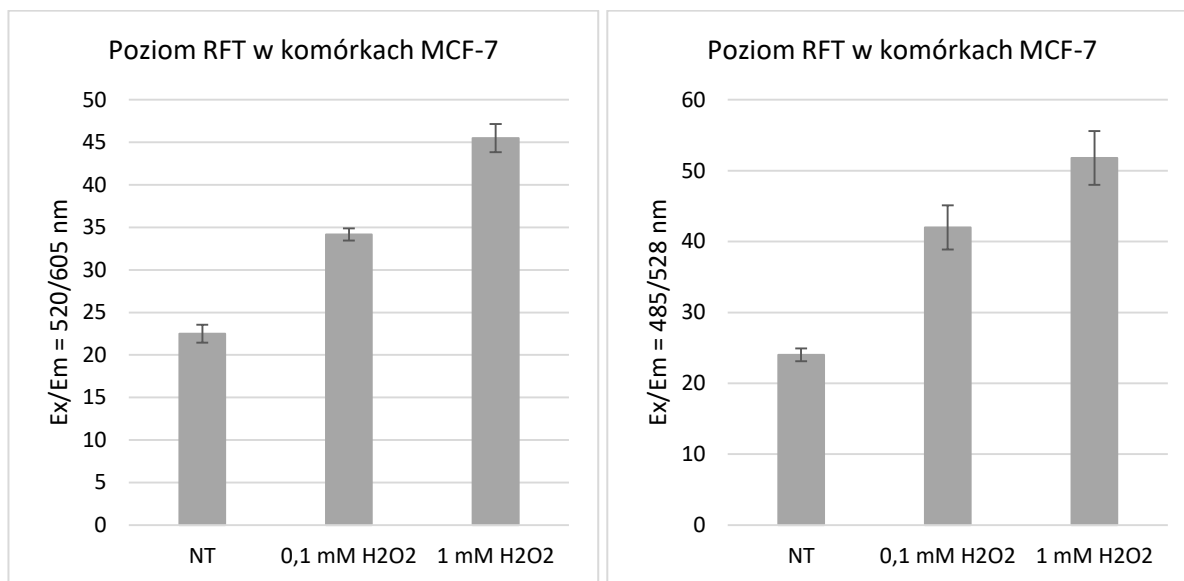
Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż komórki HUVEC stymulowane nadtlaniem wodoru wydzielają RFT w sposób dawko-zależny. Wraz ze wzrostem stężenia nadtlenu wodoru, komórki generują większą pulę RFT. Uzyskane rezultaty potwierdzają prawidłowy stan fizjologiczno-metaboliczny komórek ze względu na fakt, iż tylko żywe komórki są w stanie produkować RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny, jakim jest nadtlenek wodoru.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w ludzkich komórkach raka piersi MCF-7

Na poniższych wykresach (Ryc. 7 i 8) przedstawiono poziom RFT w komórkach nowotworowych MCF-7 stymulowanych dwoma stężeniami nadtlenu wodoru (0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali

emisji $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 7 i 8 Poziom RFT w komórkach MCF-7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

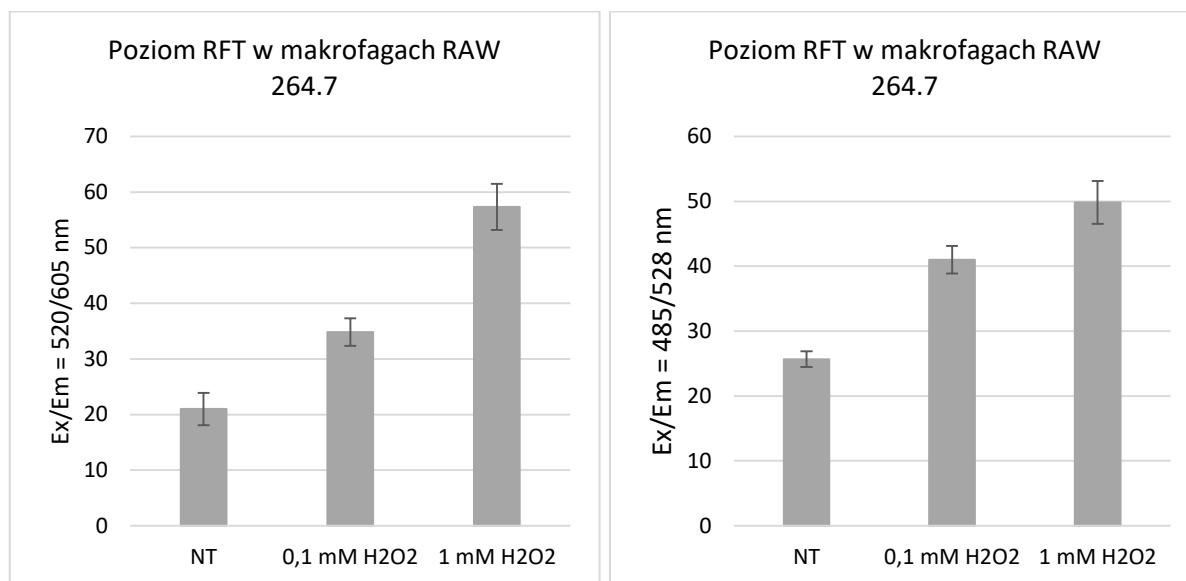
Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż komórki nowotworowe MCF-7 stymulowane nadtleniem wodoru wydzielają RFT w sposób dawko-zależny. Uzyskane rezultaty potwierdzają prawidłowy stan fizjologiczno-metaboliczny komórek ze względu na fakt, iż tylko żywe komórki są w stanie produkować RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RTF) w mysich makrofagach RAW 264.7

Na poniższych wykresach (Ryc. 9 i 10) przedstawiono poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 stymulowanych nadtleniem wodoru w stężeniach 0,1mM i 1mM w porównaniu do komórek niczym nie stymulowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ do fali emisji $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ (w przypadku

wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 9 i 10 Poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wykazały, iż makrofagi RAW 264.7 stymulowane nadtlenkiem wodoru wydzielają bardzo duże ilości RFT w sposób dawko-zależny, wprost proporcjonalny do użytego stężenia nadtlenku wodoru. Uzyskane rezultaty wskazują, iż cała procedura wykonana z użyciem komory umożliwiła uzyskanie hodowli makrofagów - podstawowych komórek układu wrodzonego, które posiadały zdolność do wytwarzania RFT – jednego z podstawowych mechanizmów obronnych organizmu przed infekcjami.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z fluorymetrycznym oznaczaniem wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu jednoznacznie wykazały przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w opisywanych testach immunologicznych w warunkach *in vitro*. W przypadku wszystkich trzech badanych linii komórkowych zaobserwowano dawko-zależny wzrost poziomu RFT w komórkach stymulowanych nadtlenkiem wodoru w dwóch stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM w porównaniu do komórek niczym nietraktowanych (inkubowanych kontrolnie z PBS). Nadtlenek wodoru jest

powszechnie używanym w badaniach induktorem stresu oksydacyjnego, który podczas wykonywania doświadczeń wykorzystywany jest jako, tzw. „kontrola pozytywna” dla uzyskiwanych wyników. Przedstawione rezultaty zostały potwierdzone dwoma rodzajami testów: komercyjnym firmy Sigma oraz wykorzystującym związek 2',7'-diocetan dichlorofluoresceiny. Zgodnie z zasadą obu wymienionych testów, tylko komórki żywe posiadają zdolność produkowania RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny, jakim jest nadtlenek wodoru. Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłaby z kolei nadmierna produkcja RFT przez komórki niczym niestymulowane.

4.3. Ocena stężenia mediatorów immunologicznych wydzielanych przez komórki wybranych linii

W ramach procedury oceniono użyteczność komory pod kątem wykonywania oznaczeń techniką immunoenzymatyczną ELISA stężenia mediatorów immunologicznych: białka HMGB1, interleukiny (IL)-8 oraz czynnika martwicy nowotworów-alfa (TNF- α) w supernatantach uzyskanych po hodowli ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC, mysich makrofagów RAW 264.7 oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7 stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) *in vitro* w trzech stężeniach: 100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 μ g/ml.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 μ g/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 μ g/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),

- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Stymulacja ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Po osiągnięciu przez komórki 70-80 % stanu konfluencji, z butelki hodowlanej usunięto starą pożywkę, wykonano proces odrywania komórek od podłoża przy użyciu 0,025% roztwór trypsyna/EDTA, który umożliwi oderwanie komórek od powierzchni butelki (tzw. proces trypsynizacji), a następnie zliczono komórki występujące w uzyskanej zawieszynie.
2. Komórki wysiano na 24-dółkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano przez 24 godziny.
3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pohodowlane zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

Stymulacja ludzkich komórek raka piersi MCF-7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża przy użyciu 0,25% roztworu trypsyna/EDTA.
2. Po wykonaniu zliczenia komórek przy użyciu komory Bürkera, komórki wysiano na 24-dółkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.

5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pochodzące zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF- α techniką ELISA.

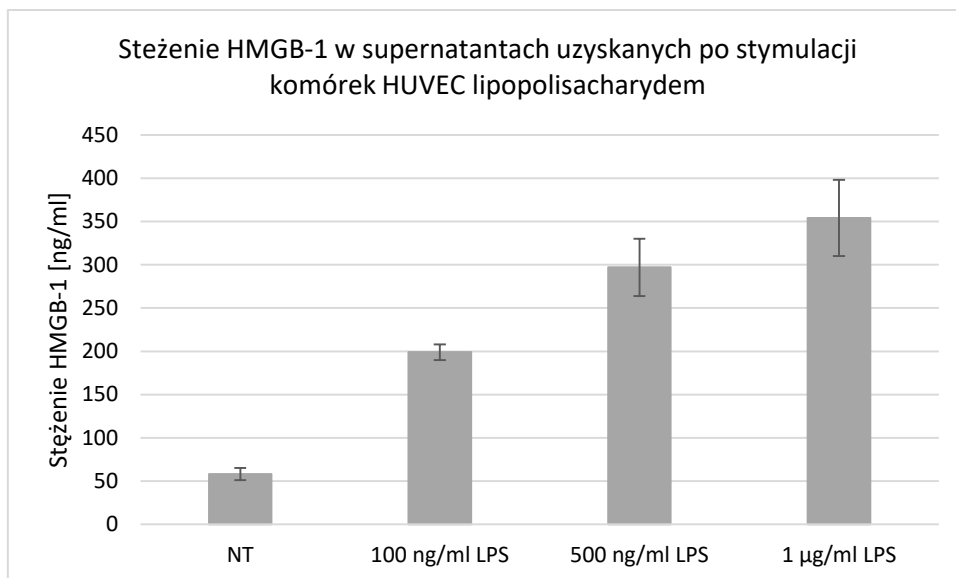
Stymulacja mysich makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża mechanicznie przy użyciu skrobaka.
2. Zliczenie komórek przy użyciu komory Bürkera.
3. Wysianie komórek na 24-dolkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowanie ich w inkubatorze CO_2 na 24 godziny.
4. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant z nad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/ 10^6 komórek, 500 ng/ml/ 10^6 i 1 $\mu\text{g/ml}/10^6$ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
5. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO_2 na 24 godziny.
6. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pochodzące zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF- α techniką ELISA.

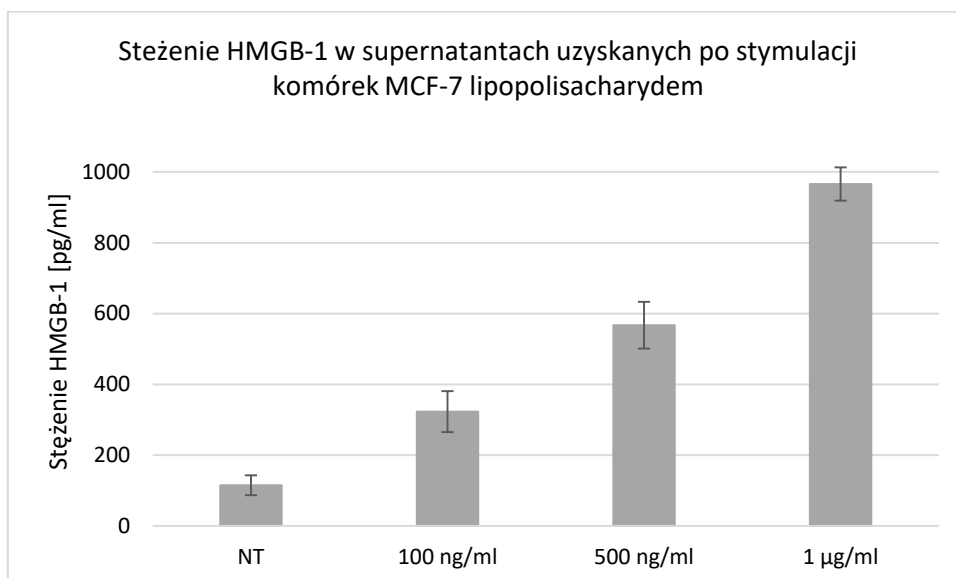
Immunoenzymatyczne oznaczanie techniką ELISA stężenia białka HMGB1

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy EIAab® (nr katalogowy E0399h) w przypadku komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu EIAab® (nr katalogowy E0399m) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

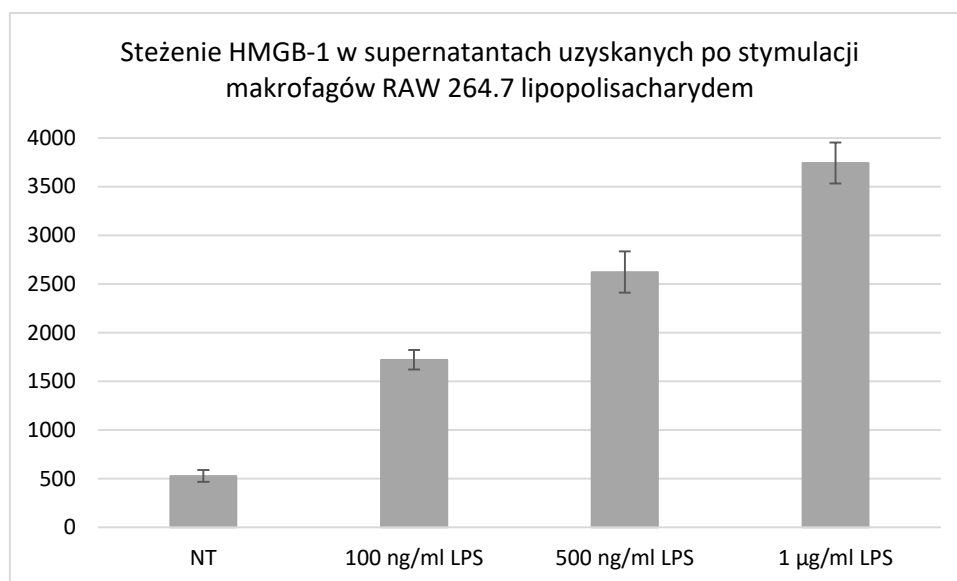
Na poniższych wykresach (Ryc. 11, 12 i 13) przedstawiono wyniki analizy stężenia białka HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 oraz RAW 264.7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 $\mu\text{g/ml}$) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 11 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 12 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem



Ryc. 13 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem

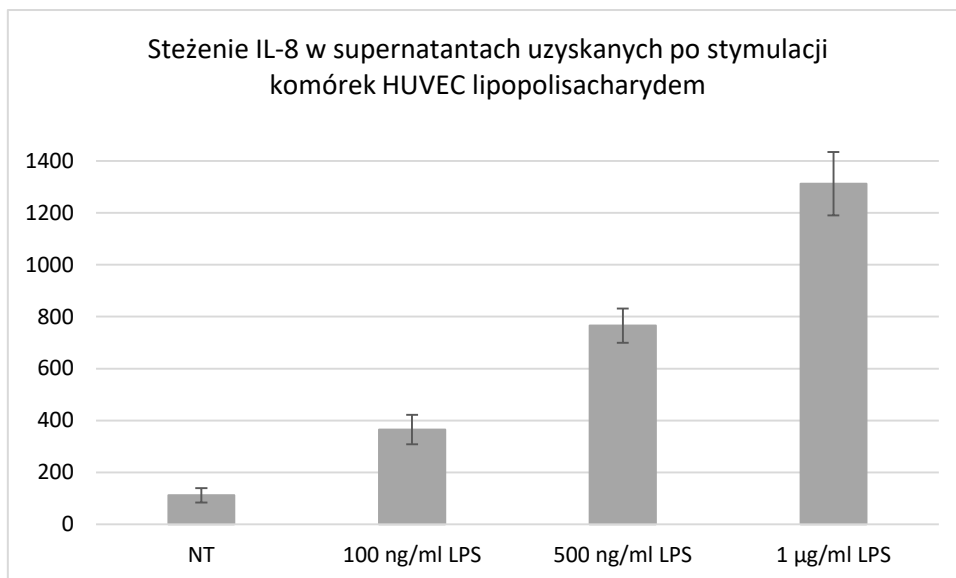
Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru stężenia HMGB-1 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 i RAW 264.7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem LPS wydzielają białko HMGB-1. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki znajdują się w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję HMGB-1 pod wpływem czynnika stymulującego.

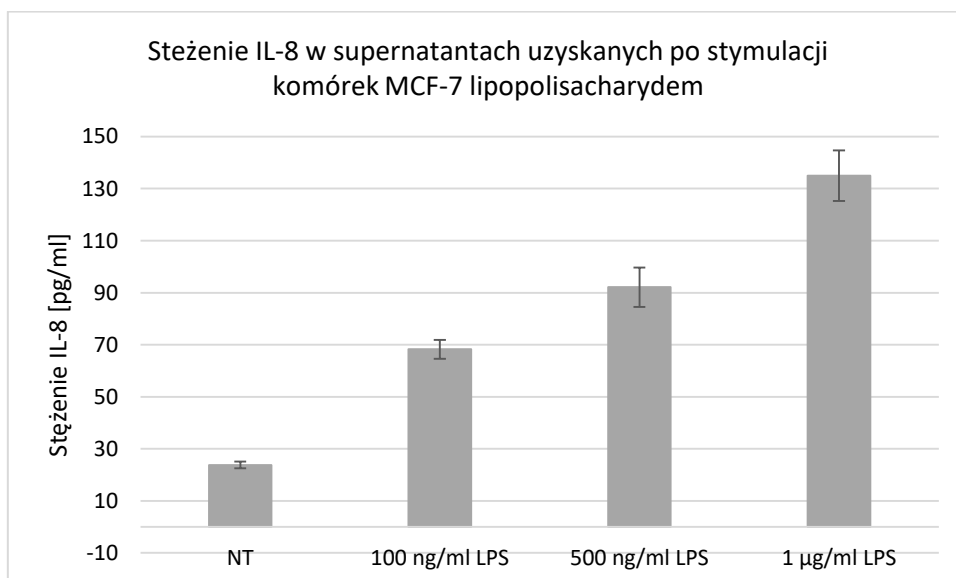
Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia IL-8

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy D8000C). Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

Na poniższych wykresach (Ryc. 14 i 15) przedstawiono wyniki analizy IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niezbyt traktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 14 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 15 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

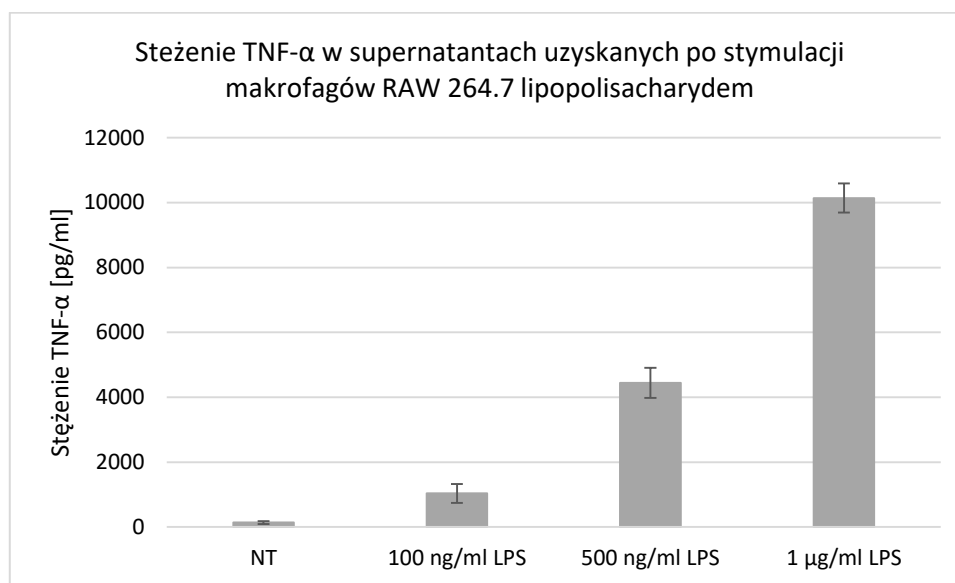
Przedstawione wyniki pomiaru stężenia IL-8 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem użytego stymulatora pochodzenia bakteryjnego wydzielają IL-8. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki

znajdują się w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję IL-8 pod wpływem LPS.

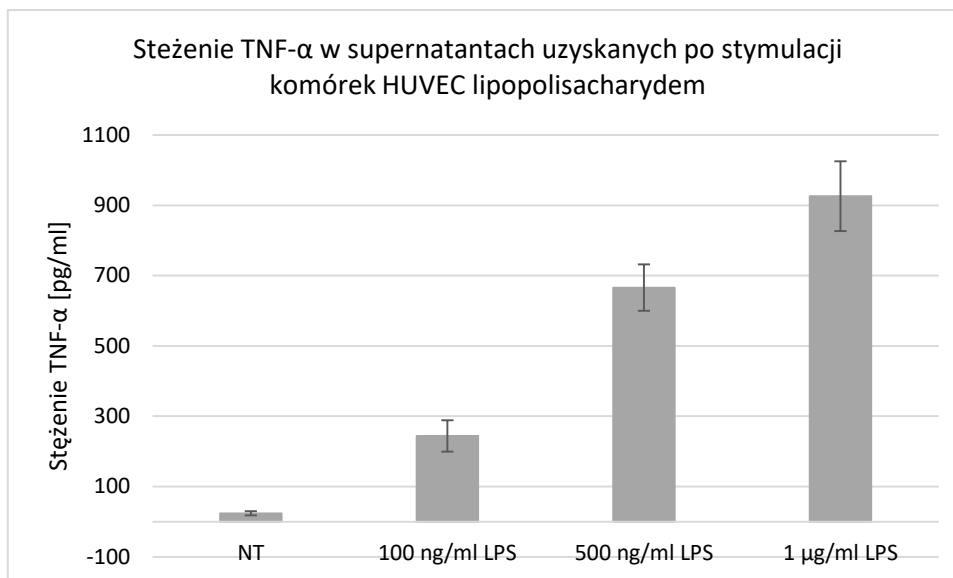
Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia TNF- α

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy DTA00C) w przypadku komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy MTA00B) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

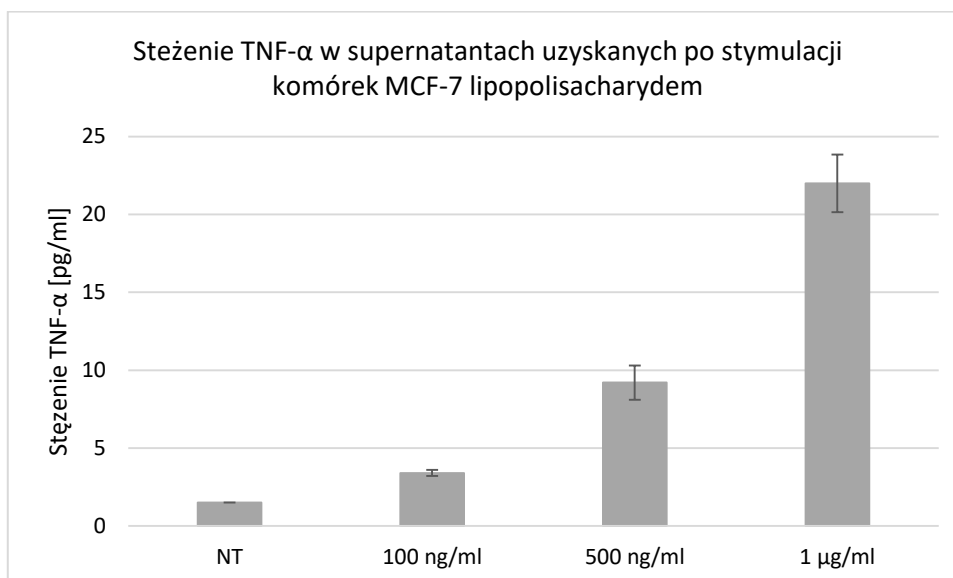
Na poniższych wykresach (Ryc. 16, 17 i 18) przedstawiono wyniki analizy stężenia TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 μ g/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 16 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem



Ryc. 17 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 18 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru poziomu TNF- α metodą ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 jednoznacznie wskazują, iż wraz ze wzrostem użytego do stymulacji stężenia LPS, komórki produkują większe ilości badanej cytokiny. Na wykresach można również zaobserwować, iż poziom TNF- α uwolnionego do medium hodowlanego przez komórki nowotworowe MCF-7 jest znacznie niższy w porównaniu do komórek RAW 264.7 i śródbłonna naczyń HUVEC. Uzyskane wyniki są całkowicie zgodne

z danymi literaturowymi, które potwierdzają dawko-zależną produkcję TNF- α przez te badane linie komórkowe stymulowane LPS. Na tej podstawie można stwierdzić, iż komórki hodowane i stymulowane pod badaną komorą znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym, a same hodowle komórkowe nie były zainfekowane.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z oznaczaniem stężenia mediatorów immunologicznych (białka HMGB-1, IL-8 i TNF- α) produkowanych przez trzy badane linie komórkowe (ludzkie komórki śródbłonna HUVEC, mysie makrofagi RAW 264.7 i ludzkie komórki raka piersi MCF-7) stymulowane lipopolisacharydem bakteryjnym jednoznacznie wykazały na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania do tego rodzaju testów immunologicznych. Wszystkie uzyskane wyniki badań są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, iż komórki układu odpornościowego (HUVEC i RAW 264.7), jak i nowotworowe (MCF-7) pod wpływem czynnika pirogenego (LPS) są zdolne do produkcji mediatorów immunologicznych, takich jak: IL-8, HMGB-1 czy TNF- α .

Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej i fizjologicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o zaburzeniach w funkcjonowaniu komórek, byłby utrata przez nie zdolności do wydzielania mediatorów immunologicznych pod wpływem LPS. Nadmierna produkcja badanych cytokin przez komórki kontrolne, niczym niestymulowane (NT) świadczyłaby z kolei o wystąpieniu infekcji w prowadzonych hodowlach komórkowych.

Podsumowanie:

- Testowana komora wyposażona została w system filtrów, które skutecznie zatrzymują drobnoustroje krążące w powietrzu.
- Lampa UV, w którą wyposażona była testowana komora skutecznie eliminowała drobnoustroje na całej powierzchni blatu roboczego.
- Komora właściwie zabezpieczała odczynniki i badany materiał podczas zakładania i prowadzenia hodowli ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.
- Przeprowadzone badania wykazały przydatność komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*.
- Zmiany konstrukcyjne wprowadzone do testowanego modelu, w porównaniu do wcześniej testowanych komór o szerokości 180 i 120 cm, w znaczący sposób przyczyniły się do poprawienia sterylności pracy pod komorą jak i łatwości przeprowadzania dekontaminacji.
- Sugerujemy przeniesienie jednego gniazda zasilającego bliżej prawej części komory.
- Sugerujemy poprawienie dopasowania blatu roboczego do wymiarów komory lub zamianę go na blat dzielony.

Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 180 cm
w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.

Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

Zespół realizujący badania:

.....
dr hab. Sylwia Wrotek

.....
dr Tomasz Jędrzejewski

.....
dr Jakub Piotrowski

.....
prof. dr hab. Wiesław Kozak

1. Ocena konstrukcji komory, jakości użytych materiałów, ergonomii pracy oraz łatwości przeprowadzania dekontaminacji podczas prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych oraz w trakcie wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

1.1. Ocena konstrukcji komory laminarnej oraz ergonomii pracy pod komorą

Ocena stabilności komory

Komorą laminarną dostarczoną do testowania cechowała się bardzo wysoką stabilnością. Nie doświadczone, aby tak podczas procedur dekontaminacji, jak i samego użytkowania konstrukcja chwiała się. Ma to duże znaczenie dla użytkowników, którzy chcą pod komorą umieszczać sprzęt, który wymaga stabilnego podłoża.

Ocena łatwości montażu poszczególnych elementów i zakresu regulacji położenia blatu roboczego

Mimo rozmiarów testowanej komory (o długości 180 cm) i niewielkich rozmiarów pomieszczenia, które przeznaczono do testów, komorę udało się bez problemów zainstalować. Jest to duży wyróżnik tej konstrukcji, pozwala to bowiem na zamontowanie komory w mniejszych laboratoriach, które chcą wydzielić zwykle niewielkie pomieszczenia do pracy w warunkach sterylnych. Dostarczona do testów komora nie posiadała możliwości regulacji wysokości położenia blatu roboczego. Dla osoby o średnim wzroście, do 180 cm, nie przysparza to większych problemów, bowiem domyślna wysokość położenia blatu roboczego jest odpowiednia, jednak wyższe osoby mogą mieć problem podczas długotrwałego korzystania z urządzenia.

Ocena rozmiaru i wykonania blatu roboczego

Bardzo duża powierzchnia blatu roboczego w dostarczonym urządzeniu pozwala na bardzo komfortową pracę dwóch eksperymentatorów jednocześnie, co sprawia, że jednocześnie mogą być prowadzone dwa niezależne eksperymenty. Dostępność do wszystkich materiałów standardowo umieszczanych pod komorą podczas pracy doświadczalnej jest bardzo dobra. Elementy blatu roboczego zostały wykonane bardzo solidnie, nie uginają się podczas pracy.

Ocena ilości i umiejscowienia gniazd zasilających, ich zabezpieczenie, położenie oraz szczelność zabezpieczenia otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika

Gniazda zasilające w dostarczonej komorze zostały zaprojektowane w wystarczającej ilości oraz rozmieszczone w prawidłowy sposób, który umożliwia wygodne z nich korzystanie. Same

gniazda zostały bardzo dobrze zabezpieczone przed ewentualnym zachlapaniem. Zastosowane zaślepki bardzo dobrze izolują również wewnętrzną część gniazd od wnętrza komory. Testowana komora nie zawierała otworu służącego do doprowadzenia gazu do palnika. Wyposażona została w dwa krany doprowadzające gaz. Sugerujemy, aby wraz z kranami dostarczane były odpowiednie nasadki, które można by na nie założyć w celu zabezpieczenia otworów w kranach, których nie da się odpowiednio zdezynfekować. Pozostawienie tych otworów bez zabezpieczenia może stanowić niszę dla rozwoju drobnoustrojów. Sugerujemy również, aby krany umieszczane były nieco wyżej, tak by możliwe było umieszczenie pod nimi materiałów używanych podczas pracy z komorą. Sugerujemy również, aby wyposażenie komory w krany było opcjonalne dla kupującego.

Ocena funkcjonalności panelu sterującego pracą komory

Dostarczona do testów komora wyposażona została w dotykowy panel sterujący stanowiący jednocześnie wyświetlacz monitorujący parametry pracy, jak również w tradycyjny sterownik. Pracę z panelami sterującymi oceniamy bardzo wysoko i nie napotkaliśmy na problemy podczas pracy z urządzeniem. Panel dotykowy jest bardzo responsywny, nawet gdy użytkownik ma założone rękawiczki. Czytelność wyświetlacza jest również bardzo dobra, pod różnymi kątami widzenia. Obsługa panelu jest prosta i intuicyjna, zapoznanie się z nią zajmuje kilka minut. Wskaźniki monitorowania przepływu powietrza jak również czujniki temperatury działają bezproblemowo. Sugerujemy jednak aby zmienić nieco "interface" wyświetlacza, tak by wspomniane wyżej wskaźniki zajmowały mniej miejsca lub były ukryte w menu (dla przykładu z możliwością ich ukrycia lub przywrócenia na wyświetlacz). To sprawi, że elementy związane ze sterowaniem pracą komory będą mogły być większe. Przesuwanie ikon sterowania pracą komory w menu sprawiało bowiem małe problemy osobom o grubszych palcach, które zamiast trafić w symbol strzałki uruchamiały przypadkowo opcję z menu. Sugerujemy również dodanie monitorowania stanu zużycia filtrów powietrza. Umożliwi to użytkownikowi odpowiednio wcześniej zaopatrzenie się w zestaw filtrów do wymiany, aby zachować ciągłość pracy badawczej.

Ocena zabezpieczenia przestrzeni wewnętrznej komory po całkowitym zamknięciu

Po zamknięciu otworu roboczego szyba bardzo szczelnie przylega do uszczelki całkowicie izolując wnętrze komory od otoczenia. Zastosowane rozwiązanie konstrukcyjnie oceniamy bardzo wysoko. Nawet po pozostawieniu komory zamkniętej na kilka dni nie zaobserwowaliśmy, aby wewnątrz gromadziły się drobiny kurzu.

Ocena skuteczności działania blokad położenia panelu przedniego

Panel przedni komory prawidłowo blokuje się na odpowiedniej wysokości zgodnie z opcją wybraną w menu. Nie napotkaliśmy na problemy podczas użytkowania komory.

Ocena głośności komory i jakości oświetlenia

Zastosowane w komorze oświetlenie bardzo dobrze i równomiernie oświetla całą powierzchnię komory jednocześnie nie męcząc oczu eksperymentatora. Komora w trybie pracy jest dość głośna, choć nie jest to uciążliwe dla osoby pracującej, nawet po kilku godzinach, to jednak utrudnia komunikowanie się dwóch osób pracujących jednocześnie pod komorą.

Ocena działania alarmów zaburzenia laminarnego przepływu powietrza, braku zasilania i niewłaściwego położenia panelu przedniego i przerwania procedury naświetlania lampą UV

Testowana komora w prawidłowy sposób informuje o problemach z przepływem powietrza. Wyświetla również informacje alarmowe, jeśli proces naświetlania lampą UV zostanie zakłócony. Podobnie, wyświetlana jest również informacja alarmowa, jeśli pojawił się problem z zasilaniem. Natomiast komora nie wydaje dźwięku alarmującego o braku zasilania. Sugerujemy, aby wyposażyć komorę w taki system, pozwala on bowiem zareagować eksperymentatorowi w takim przypadku, jeśli dla przykładu pracuje w sąsiednim pomieszczeniu, a pozostawił odczynniki pod komorą.

System automatycznego sterowania pracą komory, który oceniamy bardzo wysoko niesie za sobą jednak problem. W przypadku braku zasilania nie ma możliwości mechanicznego/ręcznego zamknięcia komory i zabezpieczenia jej wnętrza przed utratą sterylności.

Dodatkowe uwagi

Sugerujemy, aby zewnętrzne elementy komory (na zdjęciach poniżej, Fot. 1 i 2) bardziej do siebie przylegały, co nie stwarzałoby ryzyka zaczepienia o nie i nie pozostawiałoby przestrzeni trudnych do wyczyszczenia.



Fot. 1 Odstający element na obudowie komory



Fot. 2 Niespasowane elementy obudowy komory

Panel pod blatem roboczym powinien być wykonany lepiej, choć jak sądzimy jest to spowodowane faktem, iż testowano egzemplarz prototypowy, który nosił znamiona nanoszenia poprawek konstrukcyjnych.

1.2. Ocena wytrzymałości materiałów na środki chemiczne stosowane do dezynfekcji oraz na zarysowania. Ocena łatwości przeprowadzenia dekontaminacji komory.

Ocena wytrzymałości materiałów, z których wykonano komorę na dekontaminację

Przez cały okres prowadzonych testów elementy komory były poddawane działaniu środków stosowanych do dezynfekcji chemicznej:

- 70% alkoholu etylowego,
- preparatu Neodisher,
- preparatu Puresept,
- preparatu Meliseptol,

- łagodnego mleczka do czyszczenia.

Wymienione środki chemiczne nanoszone były bezpośrednio na czyszczone powierzchnie, rozprowadzane za pomocą ręczników papierowych i wycierane do sucha.

Zastosowane środki chemiczne nie pozostawiły trwałych śladów na powierzchni elementów komory. Problem stanowiły natomiast uszczelki doszczelniające boczne szyby komory, które pozostawiały czarne pozostałości na papierze, nawet po wielokrotnym przetarciu. Można przypuszczać, iż tego rodzaju materiał przy długotrwałym użytkowaniu komory może zacząć się zużywać lub stanowić źródło zagrożenia mikrobiologicznego.

Ocena łatwości demontażu elementów blatu roboczego

Elementy blatu roboczego (na zdjęciu poniżej, Fot. 3) dają się łatwo rozmontować i zamontować, co znacznie ułatwia utrzymanie komory w czystości mikrobiologicznej. Nieznaczna waga poszczególnych elementów sprawia, iż do wyczyszczenia komory jak również blatu roboczego wystarczy jedna osoba. Problem stanowi jednakże wyjęcie pierwszego elementu oraz włożenie ostatniego podczas montażu.



Fot. 3 Element blatu roboczego

Sugerujemy, aby wyposażyć wymienione elementy (lub tylko jeden z nich) w obrębie otworów wentylacyjnych w kolisty otwór na palec, który ułatwi jego wkładanie i wyjmowanie. Przykładowy otwór (zamieszczony na Fot. 4), w który wyposażona jest komora Thermo Sci MSC Advantage użytkowana w Zakładzie Immunologii UMK przedstawiono na zdjęciu poniżej:



Fot. 4 Element blatu roboczego z otworem ułatwiający wyjmowanie i wkładanie w komorze Thermo Sci MSC Advantage

Same elementy blatu są łatwe w czyszczeniu i nie posiadają trudno dostępnych miejsc. Są również odpowiednio zabezpieczone, chroniąc laboranta przed skaleczeniem.

Ocena łatwości przeprowadzenia procesu dezynfekcji chemicznej komory

Konstrukcja komory została dobrze przemyślana, w związku z powyższym ilość trudno dostępnych miejsc jest ograniczona, a czyszczenie komory nie sprawia problemów. Takim trudno dostępnym miejscem jest na pewno przestrzeń między panelem przednim komory a blatem roboczym (na zdjęciu poniżej, Fot. 5), której wyczyszczenie przysparza problemów.



Fot. 5 Przestrzeń między blatem roboczym a obudową komory

Należy zachować również szczególną uwagę, aby nie uszkodzić delikatnego czujnika poziomu opuszczenia komory w prawym dolnym rogu (na Fot. 6). Sugerujemy przemyślenie zmian konstrukcyjnych, aby odpowiednio zabezpieczyć ten element.



Fot. 6 Czujnik opuszczenia panelu przedniego komory

Gniazda elektryczne są dobrze zabezpieczone a ich dokładne wyczyszczenie nie sprawia trudności. Problem taki stanowią jednak niewątpliwie niezabezpieczone otwory w kranikach. Sugerujemy wyposażenie ich w odpowiednie zaślepki.

Ocena wytrzymałości blatu roboczego na zarysowania

Jakość wykonania i powierzchni blatu roboczego oceniamy bardzo wysoko. Była bardzo odporna na zarysowania spowodowane przesuwaniem plastikowych płytek hodowlanych o ostrych krawędziach, pudełek i innych materiałów standardowo używanych podczas pracy pod komorą laminarną.

Dodatkowe uwagi dotyczące konstrukcji komory

Testowana komora o długości 180 cm wyposażona jest w odpowiednio długą szybę, z którą ze względu na charakter zastosowanego materiału należy szczególnie uważać. Sprawia to, iż dokładne wyczyszczenie jej od wewnątrz jest nieco utrudnione.

Chłonny materiał, z której wykonana jest górna „sufitowa” część wnętrza komory uniemożliwia użycie środków chemicznych standardowo używanych do dezynfekcji. Może zatem stanowić źródło zakażeń, co potwierdziły badania (**Procedura 2.2** niniejszego raportu).

System zamykający komorę i jednocześnie doszczelniający jej wnętrze oceniamy bardzo wysoko. Nie napotkaliśmy żadnych problemów podczas pracy. Bardzo skutecznie zabezpiecza on wnętrze komory przed dostępem do jej wnętrza kurzu i pyłu.

2. Analiza skuteczności działania filtrów powietrza i lampy ultrafioletowej w trakcie prowadzenia hodowli linii komórkowych i wykonywania testów immunologicznych *in vitro*

2.1. Ocena skuteczności działania filtrów powietrza

Ocena skuteczności działania komory obejmowała sprawdzenie laminarnego przepływu powietrza po umieszczeniu w niej materiałów (pudełka z końcówkami, pipety automatyczne, wytrząsarka laboratoryjna, pipetor, pojemnik na odpady), które standardowo używane są w trakcie hodowli komórkowych *in vitro* i testów immunologicznych.

Wykonano również analizę skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu atmosferycznym w następujących wariantach czasowych: przed rozpoczęciem pracy pod komorą oraz po upływie 15 minut, 60 minut, 3 i 5 godzin od chwili włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Do oceny czystości mikrobiologicznej powietrza wykorzystane zostały następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży
- płytki odciskowe (kontaktowe) BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów;
- płytki odciskowe Sabouraud - do oznaczania drożdży i pleśni.

Odniesieniem do wyników pomiarów było analogiczne badanie czystości mikrobiologicznej powietrza w laboratorium, w którym znajdowała się komora. Próby pobrano z powierzchni blatów laboratoryjnych. Uzyskane wyniki zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 1), gdzie „-” oznacza negatywny wynik testu; „+” niewielką infekcję; „++” silną infekcję; „+++” bardzo silną infekcję.

Tab. 1 Zestawienie wyników analizy skuteczności działania filtrów względem drobnoustrojów krążących w powietrzu

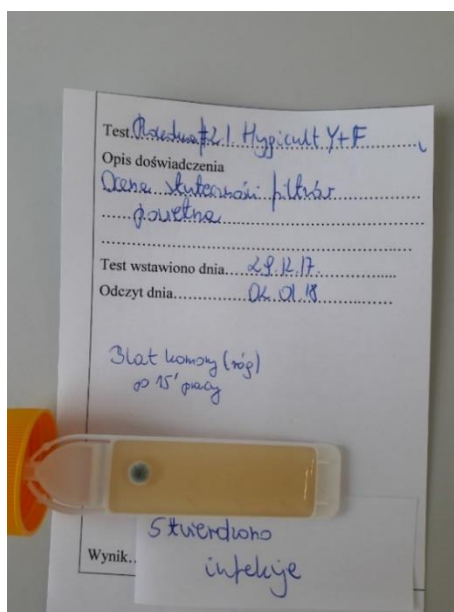
Test	Wariant czasowy	Testowane miejsce	Wynik testu
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-

Biocount Sabouard	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Biocount Sabouard	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Biocount Sabouard	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 15 min pracy	Blat komory róg	+
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Hygicult Y+F	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Hygicult Y+F	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Przed sterylizacją	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-

Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 3h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory środek	-
Compact Dry YM	Po 5h pracy	Blat komory róg	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Compact Dry YM	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Biocount PCA	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Biocount PCA	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Biocount PCA	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
Hygicult TPC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
Hygicult TPC	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	++
Hygicult TPC	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+++
CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory środek	-

CompactDry TC	Po 15 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 30 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory środek	-
CompactDry TC	Po 60 min pracy	Blat komory róg	-
CompactDry TC	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	-
CompactDry TC	kontrola	Blat laboratoryjny (poza komorą)	+

Obserwacja: Za pomocą testu Hygicult Y+F wykryto skażenie mikrobiologiczne w narożniku blatu komory po 15 minutach pracy. Wyhodowano pojedynczą kolonię grzybów (na zdjęciu poniżej, Fot. 7). W pozostałych wariantach czasowych i za pomocą testów Biocant Sabouard i Compact Dry YM infekcji grzybiczych nie stwierdzono. Podobnie, analiza przeprowadzona za pomocą testów Biocount PCA, Hygicult TPC i CompactDry TC nie wykazała obecności mikroorganizmów na blacie komory.



Fot. 7 Infekcja grzybicza w narożniku komory wykryta za pomocą testu Hygicult Y+F

Wykonano również ocenę skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB (bogatego w substancje odżywcze: peptydy, aminokwasy witaminy rozpuszczalne w wodzie oraz węglowodany), które stanowi wysoce podatną na infekcje pożywkę do hodowli bakterii. Sterylną pożywkę LB rozlano pod komorą do szalek Petriego tak, aby tworzyła ona na dnie kilkumilimetrową warstwę. Pożywkę rozlewano po 15 minutach, 60 minutach, 3 i 5 godzinach od włączenia nawiewu sterylnego powietrza. Szalki z otwartym wieczkiem pozostawiono pod komorą na 10 minut (tak zwany test otwartej płytki). Ocenę czystości mikrobiologicznej wykonano z użyciem testów HYGICULT TPC i CompactDry TC. Wyniki badania zestawiono w tabeli poniżej (Tab. 2), gdzie „-” oznacza brak infekcji, „+” oznacza stwierdzoną infekcję:

Tab. 2 Wyniki oceny skuteczności działania filtrów powietrza z wykorzystaniem podłoża LB

Lokalizacja szalki	Wariant czasowy	Wynik
Środek blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Lewy brzeg blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Prawy brzeg blatu komory	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-
Kontrola (poza komorą)	15'	-
	60'	-
	3h	-
	5h	-

Obserwacja: Za pomocą testu otwartej płytki nie wykryto skażenia mikrobiologicznego w komorze w żadnym z wariantów czasowych. Również pogłębiona analiza pożywki LB, za

pomocą testów Hygicult TPC i CompactDry TC nie wykazała skażenia.

Wnioski:

Badana komora w prawidłowy sposób generowała laminarny przepływ powietrza, którego nie zaburzało ustawienie na jej blacie materiałów i drobnego sprzętu laboratoryjnego.

System monitorowania przepływu powietrza prawidłowo diagnozował problemy z przepływem (po zasłonięciu otworów w blacie roboczym) i wydawał głośny sygnał alarmowy.

Podczas pracy pod komorą w miejscach, gdzie nie dociera promieniowanie UV możliwe jest przetrwanie pojedynczych komórek grzybów.

Umieszczenie wykrytej infekcji, oraz wariant czasowy wskazują jednak na problem z prawidłowym funkcjonowaniem lampy UV, a nie filtrów powietrza, co potwierdziły analizy opisane w następnej części raportu.

2.2. Ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowego działania lampy UV

Ocenie podlegało umiejscowienie lampy UV pod komorą warunkujące ekspozycję na promieniowanie całej powierzchni blatu roboczego. Ze względów bezpieczeństwa i higieny pracy oceniono również zabezpieczenie przed włączeniem lampy, jeśli panel przedni komory nie jest zamknięty lub czy uniemożliwia on podniesienie panelu w trakcie naświetlania. Oceniono możliwość zaprogramowania czasu pracy lampy UV oraz zaprogramowania włączenia lampy UV z opóźnieniem czasowym umożliwiające opuszczenie pomieszczenia badawczego przez eksperymentatora. Ocenie podlegała również poprawność automatycznego wyłączenia naświetlania po zakończeniu ekspozycji oraz wskazania licznika czasu pracy lampy UV.

Ocena skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonana została metodą kontaktową z użyciem płytek odciskowych. Czystość mikrobiologiczna miejsc trudno dostępnych, łączenia elementów i zakrzywionych powierzchni została oceniona metodą wymazową z użyciem zwilżonego jałowego wacika. Materiał do badań pobrany został przed i po naświetlaniu lampą UV, stosując standardowy czas ekspozycji 30 minut. Oceniona została czystość mikrobiologiczna blatu roboczego oraz zewnętrznych powierzchni materiałów znajdujących się pod komorą (pudełka na końcówki, pipety automatyczne, statyw na próbki), na które

bezpośrednio oddziaływały promienie UV. Do oceny skuteczności bakteriobójczej lampy UV wykorzystano następujące testy:

- HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii
- płytki odciskowe (kontaktowe) typu BIOCOUNT PCA - do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów.

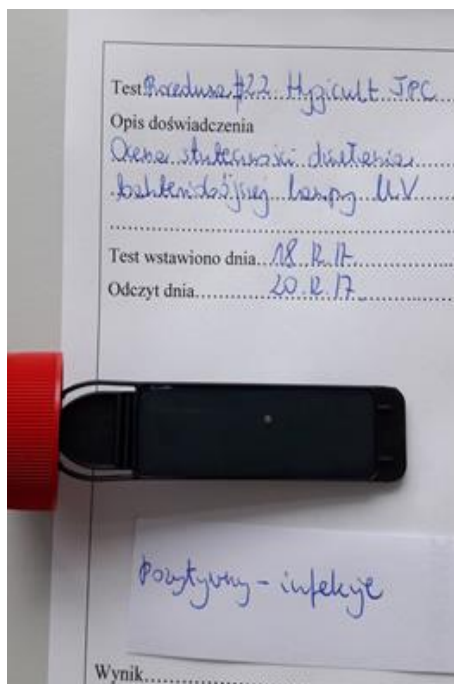
Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 3), gdzie „-„ oznacza brak infekcji; „+” oznacza stwierdzoną infekcję.

Tab. 3 Wyniki oceny skuteczności działania bakteriobójczej lampy UV wykonanej metodą kontaktową

Test	Testowane miejsce	Wynik przed sterylizacją	Wynik po sterylizacji
Biocount PCA	Blat komory	-	-
Biocount PCA	Pipety pod komorą	-	-
Biocount PCA	Pudełko z końcówkami pod komorą	-	-
Hygicult TPC	Blat komory	-	-
Hygicult TPC	Górny lewy róg komory (od wewnątrz)	-	-
Hygicult TPC	Filtr sufitowy	+	+
Hygicult TPC	Tylna ścianka ze stali kwasoodpornej	-	-
Hygicult TPC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-
CompactDry TC	Szpary między płytami blatu ze stali kwasoodpornej	-	-
CompactDry TC	Gumowa uszczelka wokół szyb	-	-
CompactDry TC	Powierzchnia wokół gniazd prądu	-	-
CompactDry TC	Powierzchnia wokół i w kranach	-	-

Obserwacja: Lampa UV, w którą wyposażona została testowana komora skutecznie niszczyła drobnoustroje na testowanych powierzchniach, zarówno na blacie, materiałach umieszczonych pod komorą, jak i trudno dostępnych miejscach.

Jednakże za pomocą testu Hygicult TPC wykryto skażenie mikrobiologiczne na materiałowym filtrze sufitowym, co obrazuje poniższe zdjęcie (Fot. 8). Przeprowadzona procedura sterylizacji lampą UV nie eliminuje w tym miejscu drobnoustrojów, co potwierdziło badanie wykonane po wykonaniu procedury naświetlania.



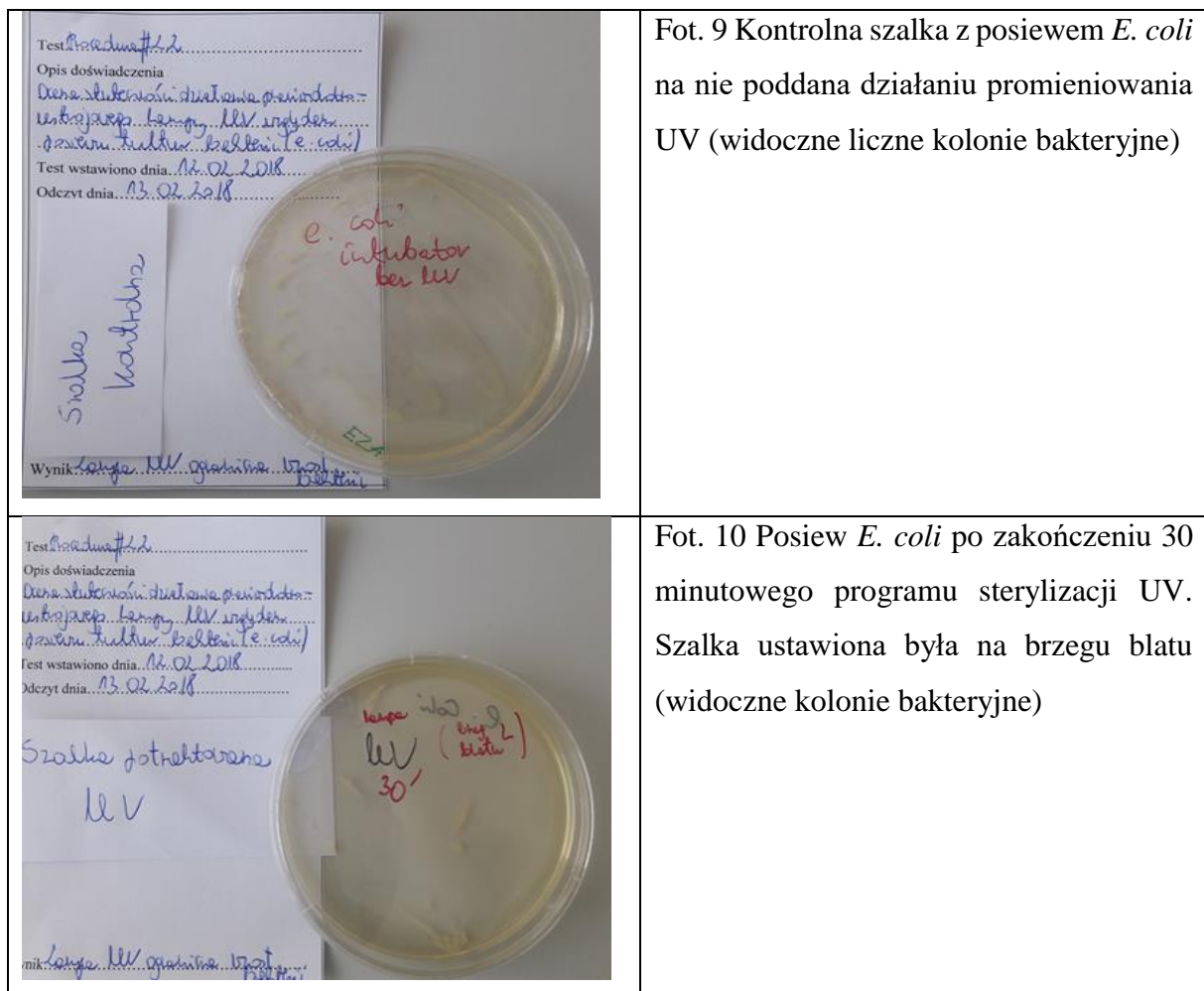
Fot. 8 Skażenie mikrobiologiczne na materiałowym filtrze sufitowym wykryte za pomocą testu Hygicult TPC

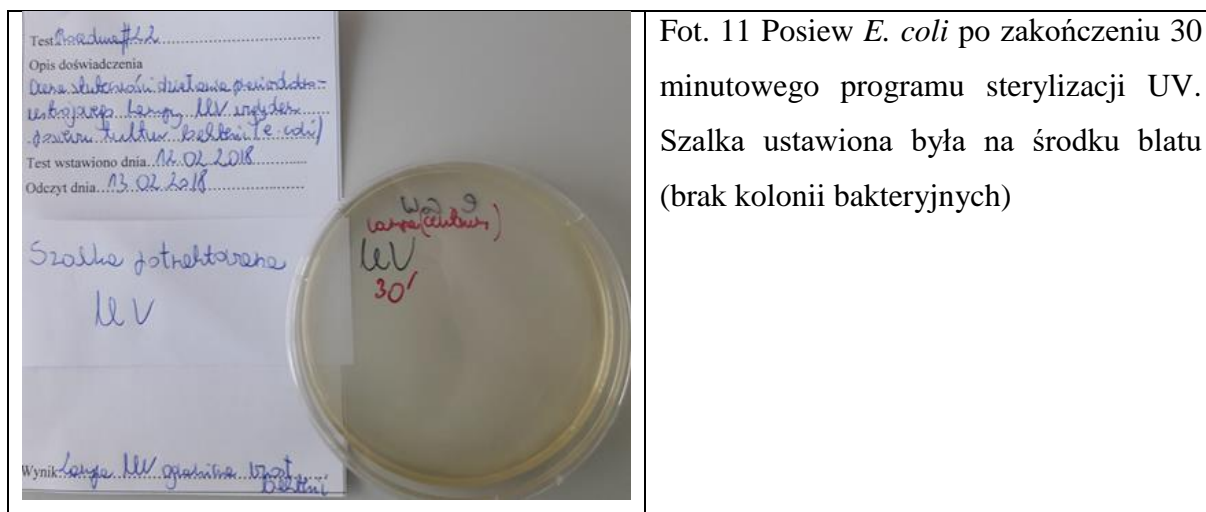
Skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowej lampy UV oceniono również względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli* wysianych na podłożu stałym (agar) na szalce Petriego. Szalki z posiewem bakteryjnym umieszczono w wybranych miejscach na blacie roboczym (w centralnym punkcie oraz w narożnikach), po czym poddane zostały działaniu lampy UV przez 30 minut. Po zakończeniu ekspozycji szalki zostały przeniesione do inkubatora ustawionego na 37°C na 24 godziny. Szalki kontrolne natychmiast po wysianiu umieszczono w inkubatorze w temp. 37°C. Wyniki testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 4), gdzie „-” oznacza brak kolonii; „+” oznacza jedną kolonię; „++” oznacza kilka kolonii; „+++” oznacza nieograniczony wzrost bakterii.

Tab. 4 Ocena działania przeciwdrobnoustrojowego lampy UV względem posiewu kultur bakterii *Escherichia coli*

Lokalizacja szalki z <i>E. coli</i>	Wynik
Blat komory środek, przód	-
Blat komory środek, tył	+
Blat komory lewa strona	++
Blat komory prawa strona	++
Kontrola	+++
Kontrola	+++
Kontrola	+++

Przykładowe wyniki testów przedstawiają poniższe zdjęcia:





Fot. 11 Posiew *E. coli* po zakończeniu 30 minutowego programu sterylizacji UV. Szalka ustawiona była na środku blatu (brak kolonii bakteryjnych)

Wnioski:

Chłonny materiałowy filtr znajdujący się w górnej części komory nie pozwala na skuteczne czyszczenie i sterylizację. Umieszczenie lampy UV sprawia, iż nie jest on również sterylizowany promieniami UV. Jak wskazują wyniki badań, stanowić może źródło infekcji. Sugerujemy zmiany konstrukcyjne mające na celu wyeliminowanie tego problemu, dla przykładu, przez zastosowanie odpowiedniej maskownicy ze stali kwasoodpornej.

Poziom zabezpieczeń komory jest natomiast bardzo dobry. Możliwe jest zaprogramowanie czasu naświetlania, jak również opóźnienia czasowego włączenia ekspozycji. Pozwala to na opuszczenie pomieszczenia przez eksperymentatora, na co bardzo dużą uwagę zwraca inspekcja BHP. Niemożliwe jest również uruchomienie procedury naświetlania bez opuszczenia przedniego panelu komory, jak również podniesienie go w trakcie działania lampy UV bez przerywania procedury sterylizacji. Co więcej, szczelnie przylegający przedni panel komory skutecznie zabezpiecza eksperymentatora przed działaniem promieni UV.

Po zakończeniu naświetlania proces jest prawidłowo kończony i odpowiednia informacja wyświetlana jest na panelu sterującym. Podobna informacja wyświetlana jest, gdy urządzenie jest ponownie uruchamiane.

Przeprowadzona procedura sterylizacji lampą UV nie eliminowała równie skutecznie bakterii *E. coli* na powierzchni całego blatu roboczego. W przypadku szalek ustawionych na środku lampa UV działała prawidłowo, jednakże w przypadku szalek ustawianych przy krawędziach blatu roboczego, nie doprowadzała do ich całkowitego wyeliminowania. Sądymy, iż jest to skutek zamontowania w testowanym egzemplarzu zbyt krótkiej lampy UV i sugerujemy

wyposażenie urządzenia w dłuższą lampę UV, która odpowiednio naświetli całą powierzchnię komory.

3. Ocena przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

3.1. Badanie czystości mikrobiologicznej pożywek oraz odczynników wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych przygotowywanych pod komorą laminarną

W opisywanych badaniach wykorzystano następujące pożywki hodowlane oraz odczynniki:

- pożywkę RPMI 1640,
- pożywkę DMEM,
- pożywkę Medium 200,
- płodową surowicę bydlęcą (FBS),
- buforowaną fosforanami sól fizjologiczną (PBS),
- medium do separacji limfocytów (LSM).

Wszystkie powyższe pożywki i odczynniki są powszechnie wykorzystywane w praktyce laboratoryjnej do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, co więcej są bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Stąd też praca z ich użyciem musi odbywać się pod prawidłowo działającą komorą laminarną.

Wszystkie pożywki i odczynniki użyte w badaniu stanowiły sterylne, komercyjne roztwory dostarczone w butelkach zabezpieczonych plastikową plombą. Po otwarciu butelek pod komorą laminarną badane roztwory inkubowane były w otwartych naczyniach hodowlanych:

- płytkach 96-dołkowych (w objętości 200 μ L),
- płytkach 24-dołkowych (w objętości 1 mL),
- płytkach 12-dołkowych (w objętości 2 mL),
- butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² (w objętości 200 μ L).

Są to naczynia hodowlane najczęściej używane w laboratorium do prowadzenia hodowli komórkowych *in vitro*, jak również w doświadczeniach z ich wykorzystaniem. W butelkach hodowlanych nie inkubowano płodowej surowicy bydlęcej i medium do separacji limfocytów, ponieważ w praktyce laboratoryjnej nie ma przykładów takiego ich użycia.

W przebiegu badań odczynniki i pożywki w różnych naczyniach inkubowane były przez 15 minut, 30 minut lub godzinę. Czasy inkubacji dobrano tak, aby odpowiadały standardowym procedurom wykonywanym pod komorą laminarną w trakcie prowadzonych badań.

Po zakończeniu inkubacji wszystkie roztwory zostały zebrane do sterylnych probówek typu falcon i inkubowane były w cieplarni przez 48 h w temperaturze 35°C w celu zapewnienia warunków do wzrostu mikroorganizmom, które mogłyby zainfekować badane roztwory.

Następnie wykonana została specjalistyczna analiza czystości mikrobiologicznej każdego badanego roztworu, w każdym użytym naczyniu hodowlanym i po każdym z wymienionych czasów inkubacji pod komorą. Użyto w niej komercyjnych testów:

- Hygicult TPC (do oceny ogólnej liczby drobnoustrojów),
- CompactDry TC (do oznaczania ogólnej liczby bakterii),
- Hygicult Y+F (do oceny zakażenia pleśniami lub drożdżami),
- CompactDry YM (do oznaczania pleśni i drożdży).

Wyniki przeprowadzonych testów zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 5).

Tab. 5 Wyniki analizy czystości mikrobiologicznej pożywek inkubowanych w różnych typach naczyń hodowlanych pod komorą

Stosowany roztwór	Naczynie hodowlane	Czas inkubacji	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 96-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 24-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

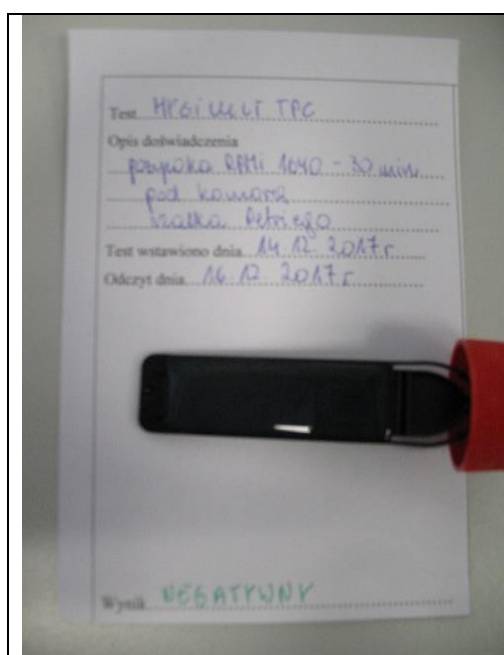
Pożywka RPMI 1640	Płytko dołkowa 12-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka RPMI 1640	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 96-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 24-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Płytko dołkowa 12-	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka DMEM	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytko dołkowa 96-	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytko dołkowa 96-	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Pożywka Medium200	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Płytki 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Pożywka Medium200	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Płytki 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

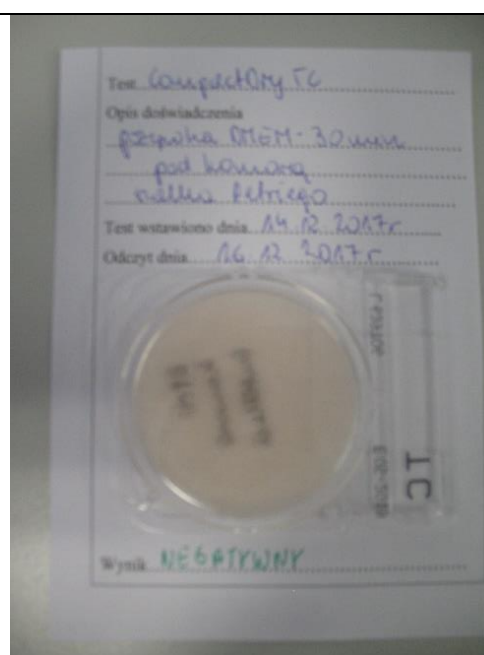
PBS	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBS	Butelka hodowlana	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
FBS	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 96- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 24- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 24- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

LSM	Płytką 24- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	15 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	30 minut	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
LSM	Płytką 12- dołkowa	1 godzina	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



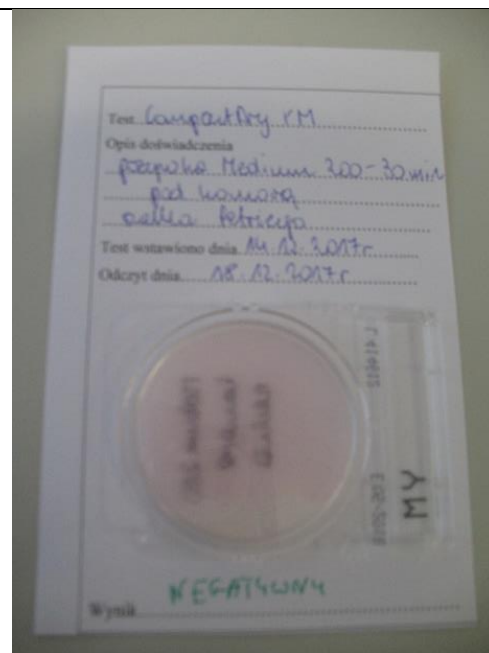
Fot. 12 Pożywka RPMI 1640 inkubowana pod komorą przez 30 minut na szalce Petriego (brak infekcji bakteryjnej)



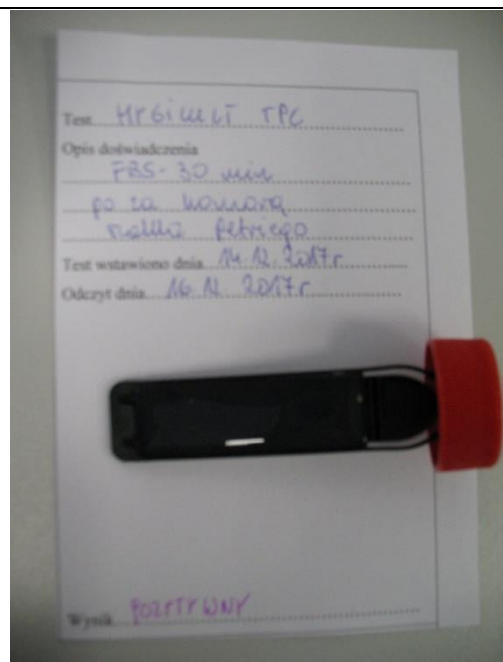
Fot. 13 Pożywka DMEM inkubowana pod komorą przez 30 minut na szalce Petriego (brak infekcji bakteryjnej)



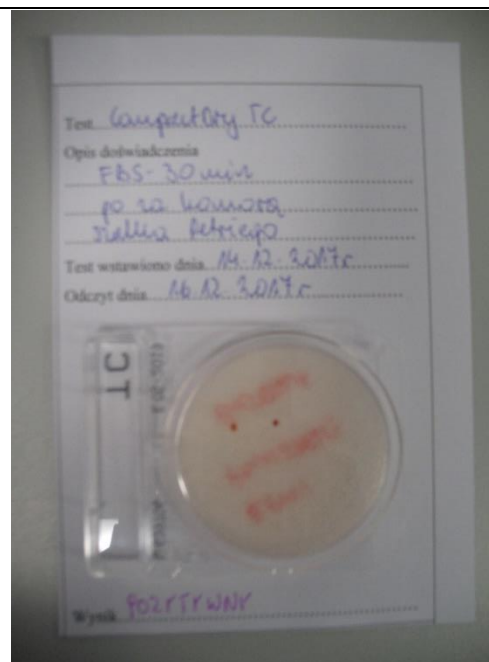
Fot. 14 Pożywka DMEM inkubowana pod komorą przez 30 minut na szalce Petriego (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 15 Pożywka Medium 200 inkubowana pod komorą przez 30 minut na szalce Petriego (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 16 Płodowa surowica bydlęca FBS inkubowana poza komorą przez 30 minut na szalce Petriego (znaczną infekcją bakteryjną)



Fot. 17 Płodowa surowica bydlęca FBS inkubowana poza komorą przez 30 minut na szalce Petriego (widoczne dwie kolonie bakteryjne)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami testowanych pożywek hodowlanych i odczynników inkubowanych pod komorą laminarną w naczyniach hodowlanych. Porównanie tych wyników z dodatkowymi badaniami kontrolnymi prowadzonymi w niesterylnych warunkach, poza komorą, które wykazały infekcje dowodzi, iż system filtrów, w jakie komora została wyposażona skutecznie chroni powietrze przed mikroorganizmami.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do przygotowywania i korzystania z pożywek oraz odczynników standardowo wykorzystywanych podczas prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.2. Ocena przydatności komory podczas zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych

W ramach oceny przydatności komory laminarnej do prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych, wykonano procedury związane z zakładaniem i prowadzeniem hodowli linii ludzkich:

- komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC; nr katalogowy C0035C), pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*),
- komórki MCF-7 (Lot. 13K023), pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*).

i zwierzęcych:

- mysie fibroblasty L929 (NCTC klon 929; numer CCL-1) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).
- mysie makrofagi RAW 264.7 (nr katalogowy TIB-71) pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC (z ang. *American Type Culture Collection*).

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną. Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- Fibroblasty L929 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC – w pożywce Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierającej 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (LSGS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 97 ml Medium 200, 2 ml LSGS i 1 ml roztworu antybiotyków.
- Komórki MCF-7 – w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS), mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (NAA). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 88 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS, 1 ml roztworu antybiotyków oraz 1 ml NAA.
- Mysie makrofagi RAW 264.7 – w pożywce DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającej 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej i mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki DMEM, 10 ml FBS i 1 ml roztworu antybiotyków.

Czystość mikrobiologiczną pożywek oceniono przed założeniem hodowli komórkowej (w celu wyeliminowania ryzyka, iż komórki podczas zakładania hodowli będą przenoszone do zainfekowanej pożywki) oraz po wykonaniu jednego pasażu komórek, po upływie 2-3 dni od momentu założenia hodowli komórkowej (w zależności od momentu osiągnięcia przez hodowlę stanu konfluencji wynoszącego 70-80%).

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F - do oznaczania pleśni i drożdży,

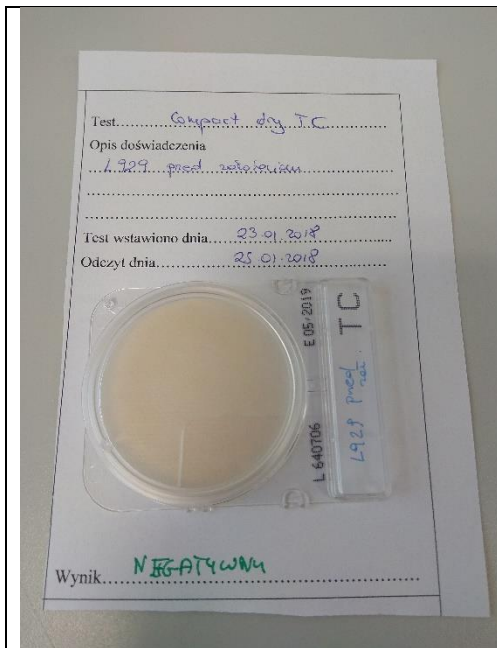
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 6).

Tab. 6 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej pożywek przed założeniem hodowli komórkowej i po wykonaniu pasażu

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
Fibroblasty L929	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Fibroblasty L929	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki HUVEC	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Komórki MCF-7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
Makrofagi RAW 264.7	Po pasażu	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

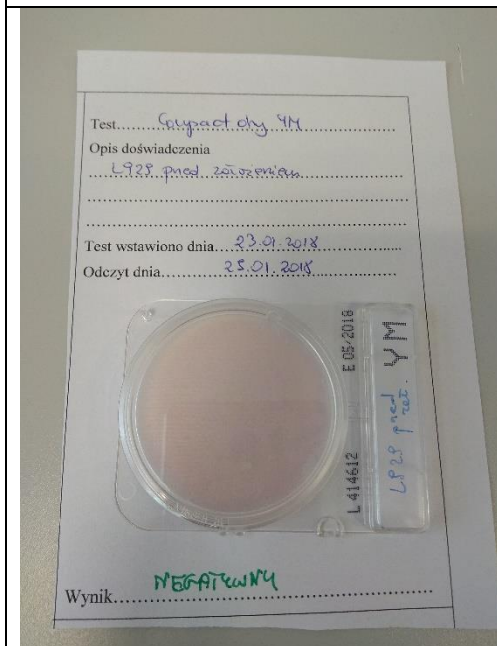
Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiają poniższe zdjęcia:



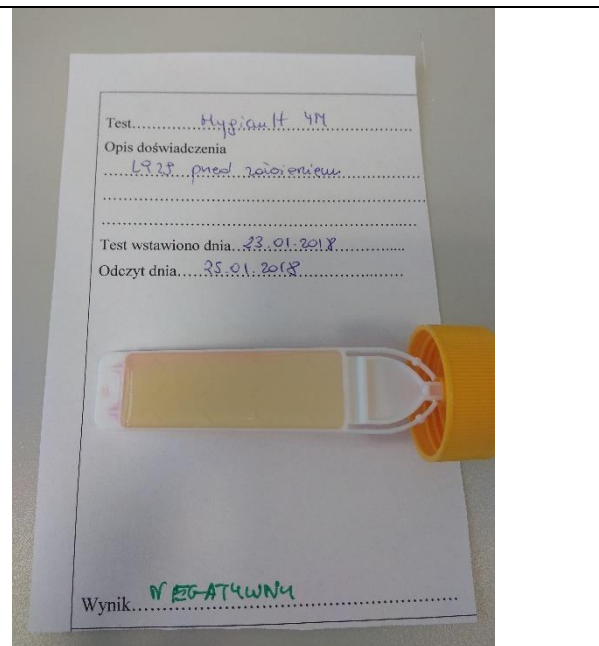
Fot. 18 Wzbogacona pożywka dla fibroblastów linii L929 sporządzona pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 19 Wzbogacona pożywka dla fibroblastów linii L929 sporządzona pod komorą (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 20 Wzbogacona pożywka dla fibroblastów linii L929 sporządzona pod komorą (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 21 Wzbogacona pożywka dla fibroblastów linii L929 sporządzona pod komorą (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek hodowlanych używanych do prowadzenia hodowli komórkowych, które przygotowywane były pod testowaną komorą.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywek w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro*, po wykonaniu jednego pasażu komórek.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do zakładania i prowadzenia hodowli *in vitro* ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.

3.3. Izolacja i hodowla *in vitro* pierwotnych zwierzęcych linii komórkowych

Oceniona została czystość mikrobiologiczna hodowli *in vitro* komórek mononuklearnych krwi obwodowej – PBMC (z ang. *peripheral blood mononuclear cells*) izolowanych pod testowaną komorą laminarną.

Źródłem komórek była krew obwodowa szczura rasy WISTAR, zdrowego samca ważącego 250 g pochodzącego z jednostki uprawnionej do prowadzenia hodowli zwierząt doświadczalnych (zarejestrowanej przez MNiSW). Krew pobrano na sterylny roztwór antykoagulantu (wersenian tripatasowy, K₃EDTA). Procedurę wykonano w sterylnym pomieszczeniu chirurgicznym z wykorzystaniem sterylnych i jednorazowych materiałów chirurgicznych. Pozostałe etapy izolacji frakcji mononuklearnej (PBMC) z krwi pełnej przeprowadzono pod testowaną komorą laminarną. Składały się na nie:

1. Nawarstwienie krwi rozcieńczonej w stosunku 1:1 sterylnym buforem PBS na roztwór generujący gradient gęstości – medium do separacji limfocytów (LSM) w sterylnej probówce wirówkowej typu Falcon.
2. Wirowanie w gradiencie gęstości LSM (400 x g przez 30 minut).
3. Zebranie frakcji komórek PBMC, która tworzy dobrze widoczny pierścień na granicy osocza i medium do separacji limfocytów.
4. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości medium do separacji limfocytów.
5. Hemoliza erytrocytów w 0,85% sterylnym roztworze chlorku amonu.
6. Odpłukanie komórek buforem PBS z pozostałości chlorku amonu.

Wyizolowane komórki PBMC hodowano następnie w pożywce RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierającą 10% płodowej surowicy bydlęcej

(FBS) oraz mieszaninę antybiotyków 100 razy stężonych: streptomycyny (100 µg/ml) i penicyliny (100 U/ml). W celu przygotowania 100 ml wzbogaconej pożywki zmieszano 89 ml pożywki RPMI 1640, 10 ml FBS i 1 ml roztworu stężonych antybiotyków.

Hodowlę prowadzono na płytkach 24-dołkowych (1 milion komórek na mililitr pożywki) w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ i 95% wilgotności w inkubatorze. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji podczas hodowli, przed użyciem inkubator wysterylizowano w temperaturze 186°C.

Po upływie 24 i 48 godzin zawartość dołków została zebrana w celu wykonania analizy czystości mikrobiologicznej. Analizie poddana została również wyjściowa zawiesina komórek stanowiąca bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Do oceny czystości mikrobiologicznej wykorzystano testy:

- HYGICULT (HYGICULT TPC – do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów,
- CompactDry TC – do oznaczania ogólnej liczby bakterii,
- HYGICULT Y+F – do oznaczania pleśni i drożdży,
- CompactDry YM – do oznaczania pleśni i drożdży.

Wyniki analiz zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 7).

Tab. 7 Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej wyjściowej zawiesiny komórek PBMC oraz hodowli po upływie 24 i 48 h od założenia hodowli

Linia komórkowa	Wariant doświadczalny	Wynik testu Hygicult TPC	Wynik testu CompactDry TC	Wynik testu Hygicult Y+F	Wynik testu CompactDry YM
PBMC	Przed założeniem hodowli	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 24 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny
PBMC	Po upływie 48 h	negatywny	negatywny	negatywny	negatywny

Przykładowe wyniki testów mikrobiologicznych przedstawiono na zdjęciach poniżej.



Fot. 22 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 23 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC (brak infekcji bakteryjnej)



Fot. 24 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)



Fot. 25 Wyjściowa zawiesina komórek PBMC (brak infekcji grzybiczej lub drożdżowej)

Wniosek:

Nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami wyjściowej zawiesiny komórek PBMC stanowiącej bazę do założenia hodowli pierwotnej.

Podobnie, nie stwierdzono zakażenia mikroorganizmami pożywki po upływie 24 h i 48 h od założenia hodowli.

Wyniki przeprowadzonych testów świadczą o użyteczności testowanej komory laminarnej do prowadzenia izolacji i hodowli *in vitro* pierwotnych linii komórkowych.

4. Ocena przydatności komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*

4.1. Oznaczenie przeżywalności i wskaźnika proliferacji wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w wykonywaniu oznaczeń aktywności metabolicznej (po 24 godzinach) oraz stopnia proliferacji (po 48 i 72 godzinach) komórek należących do czterech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC, mysich fibroblastów L929, mysich makrofagów RAW 264.7 (wszystkie trzy linie pochodzą z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC; z ang. *American Type Culture Collection*) oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7 pochodzących z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (z ang. *European Collection of Cell Cultures*). Ocena przeżywalności i wskaźnika proliferacji komórek została wykonana z użyciem testu MTT. Zasada testu MTT oparta jest na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej aktywnej w żywych komórkach do przekształcania soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy) do niebieskiego formazanu, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie. Wartość zmierzonej absorbancji jest wprost proporcjonalna do ilości żywych, aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach płytki hodowlanej.

Wszystkie hodowle zakładane i pasażowane były pod testowaną komorą laminarną.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

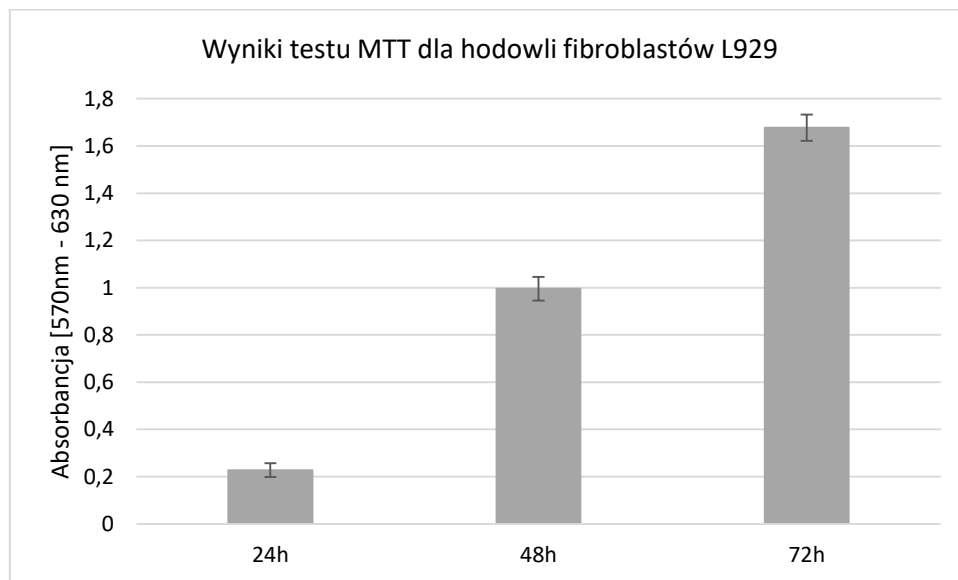
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla mysich fibroblastów L929 - pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowaną termicznie płodową surowicę bydlęcą (z ang. fetal bovine serum; FBS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),

- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich fibroblastów L929

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji mysich fibroblastów L929 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 1) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu ± błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 1 Wyniki testu MTT dla hodowli fibroblastów L929

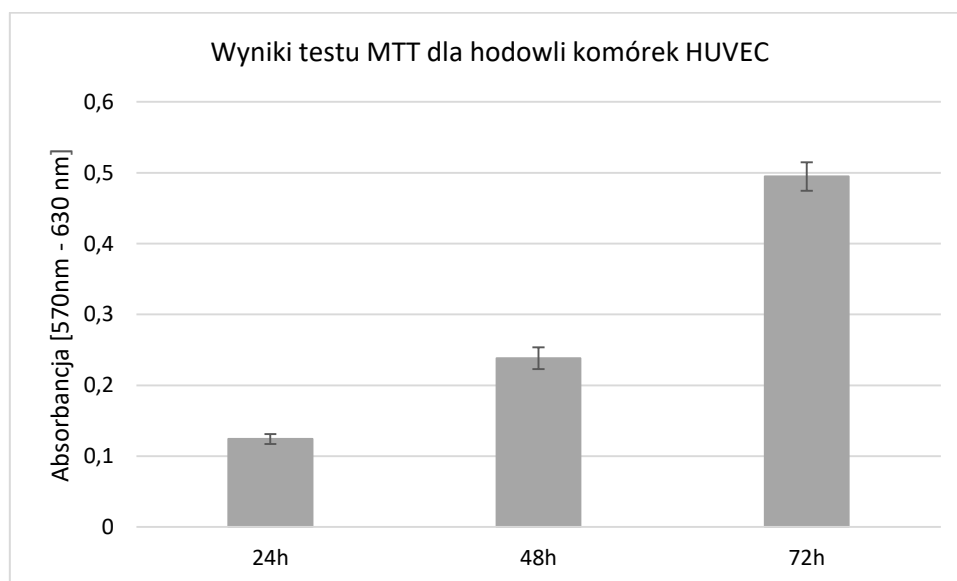
Obserwacja:

Jak można zaobserwować na powyższej rycinie wraz ze wydłużeniem czasu inkubacji, odnotowano znaczący wzrost liczby żywych komórek, świadczący o wysokim stopniu ich proliferacji. Uzyskany wynik jest zgodny z powszechną wiedzą dotyczącą zdolności mysich fibroblastów L929 do spontanicznej proliferacji, bez konieczności stosowania związków o charakterze mitogenów, których celem jest pobudzenie tego procesu. Na podstawie

przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas zakładania hodowli komórkowej, jak i przeprowadzania samej procedury MTT z wykorzystaniem komory, nie doszło do zainfekowania komórek grzybami, bakteriami lub wirusami. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji ze względu na fakt, iż zainfekowane linie komórkowe charakteryzują się obniżoną przeżywalnością oraz spadkiem tempa proliferacji.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek HUVEC (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 2) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 2 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek HUVEC

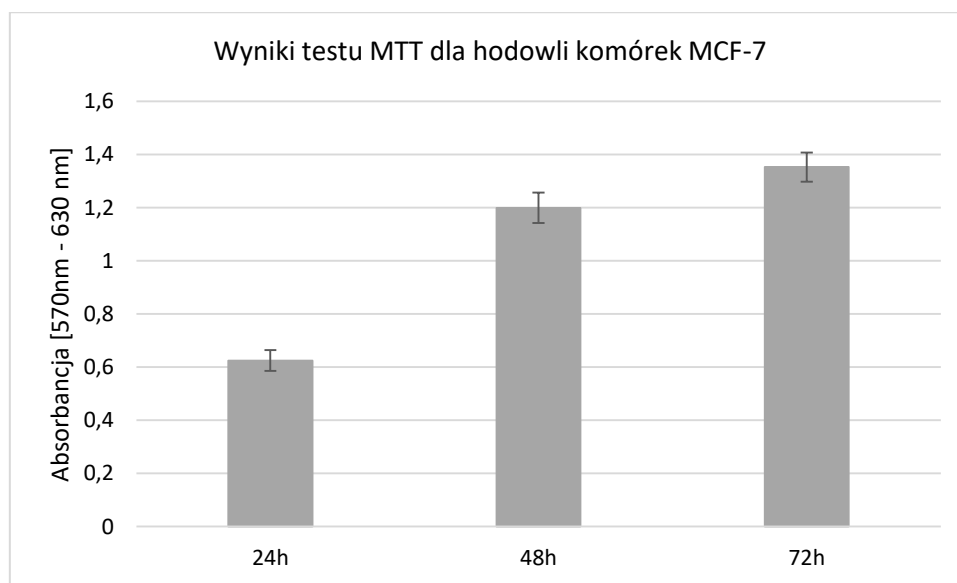
Obserwacja:

Podobnie, jak w przypadku fibroblastów L929 zaobserwowano, iż wraz z wydłużeniem czasu inkubacji nastąpił wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek znajdujących się w dołkach w obrębie 96-dolkowej płytki hodowlanej. Komórki HUVEC stanowią linie komórkową, która

nie wymaga użycia czynnika (mitogenu) indukującego proces ich proliferacji. Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji można stwierdzić, iż użyte podczas procedury komórki znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym i ich procesy metaboliczne nie były zakłócone, co w znaczący sposób wyklucza wystąpienie infekcji podczas przeprowadzania całej procedury.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) ludzkich komórek raka piersi MCF-7

Poniższy wykres przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek MCF-7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki (na Ryc. 3) przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołeków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 3 Wyniki testu MTT dla hodowli komórek MCF-7

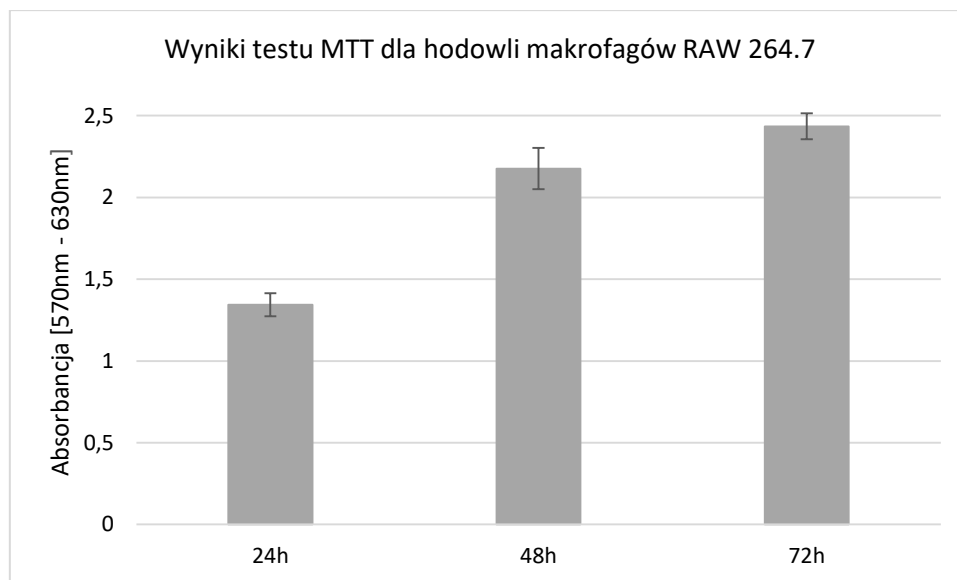
Obserwacja:

Wyniki uzyskane na podstawie testu MTT jednoznacznie wskazują, że wraz z wydłużeniem czasu hodowli, zwiększa się liczba aktywnych metabolicznie komórek MCF-7, o czym świadczą wyższe wartości pomiaru absorbancji. Komórki MCF-7 jako klasyczna linia komórek nowotworowych charakteryzuje się wysokim tempem proliferacji. Na powyższej rycinie można także zaobserwować stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji

zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w stosunku do 72-godzinnego czasu hodowli. Wynika to z faktu, iż ze względu na intensywny proces proliferacji komórek nowotworowych po upływie 48 godzin uzyskiwany jest niemal 100% stan konfluencji. Oznacza to, iż prawie cała powierzchnia dołka w obrębie 96-dołkowej płytki hodowlanej została porośnięta żywymi komórkami, a brak wolnej przestrzeni dla wzrostu komórek powoduje spowolnienie tempa ich podziałów. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko podczas prowadzenia hodowli komórkowych. Zostało ono potwierdzone organoleptycznie przy użyciu mikroskopu z odwróconą optyką i wskazuje jednoznacznie na prawidłowy stan fizjologiczny i aktywność metaboliczną hodowanych komórek.

Ocena przeżywalności (po 24 h) oraz wyznaczenie wskaźnika proliferacji (po 48 h i 72 h) mysich makrofagów RAW 264.7

Poniższy wykres (Ryc. 4) przedstawia wyniki oceny przeżywalności i stopnia proliferacji komórek RAW 264.7 (wysianych w ilości 10 tysięcy komórek/dołek). Ocenę wykonano za pomocą testu MTT (odczyt absorbancji przy długości fali 570 nm oraz długości fali referencyjnej 630 nm). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości absorbancji dla 6 dołków, uzyskane dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu \pm błąd standardowy, które charakteryzowały się wysoką powtarzalnością w obrębie każdego z trzech wykonanych powtórzeń opisywanego eksperymentu.



Ryc. 4 Wyniki testu MTT dla hodowli makrofagów RAW 264.7

Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru absorbancji wykonane po zakończeniu testu MTT jednoznacznie wskazują na dużą aktywność metaboliczną mysich makrofagów RAW 264.7, o czym świadczy wzrost wartości absorbancji wraz z wydłużeniem czasu hodowli makrofagów. Badana linia komórkowa charakteryzuje się bardzo dużym wskaźnikiem tempa proliferacji, co potwierdzają wysokie uzyskane wartości absorbancji rzędu 2,5 jednostki. Podobnie, jak w przypadku komórek raka piersi MCF-7, zaobserwowano stosunkowo niewielką różnicę pomiędzy wartościami absorbancji zmierzonymi dla komórek inkubowanych przez 48 godzin w stosunku do 72-godzinnego czasu hodowli. Również w tym przypadku zaobserwowano przy użyciu mikroskopu świetlnego z odwróconą optyką, iż po upływie 48 godzin hodowli niemal cała powierzchnia dołka na płytce hodowlanej była porośnięta żywymi komórkami o charakterystycznym wydłużonym kształcie. W związku z uzyskaniem przez komórki niemal 100% stanu konfluencji, została ograniczona wolna przestrzeń dla ich dalszych podziałów, co tłumaczy niewielkie różnice w wartościach absorbancji pomiędzy 48- i 72-godzinnym czasem inkubacji. Tak jak już wspomniano powyżej, jest to zjawisko korzystne w kontekście prowadzenia hodowli aktywnych metabolicznie komórek przeznaczonych do testów immunologicznych *in vitro*.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur dotyczących oznaczania przeżywalności i wskaźnika proliferacji czterech komercyjnie dostępnych linii komórkowych jednoznacznie wskazują na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w omówionych testach immunologicznych *in vitro* (teście MTT). W przypadku wszystkich badanych linii komórkowych zaobserwowano, iż wraz z wydłużeniem czasu hodowli następował wzrost liczby aktywnych metabolicznie komórek, co potwierdzały wyniki pomiarów absorbancji. Jest to jak najbardziej pożądane zjawisko, które świadczy o prawidłowym stanie fizjologicznym, jak i o dużej aktywności metabolicznej komórek.

Na podstawie przedstawionych rezultatów można również wnioskować, iż podczas prowadzenia hodowli komórkowych, jak i wykonywania testu MTT z wykorzystaniem komory nie doszło do zainfekowania badanych linii komórkowych. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłby brak wzrostu, a nawet spadek wartości zmierzonej absorbancji.

4.2. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu przez komórki należące do wybranych linii komórkowych

W ramach procedur oceniono użyteczność komory w prowadzeniu fluorymetrycznych oznaczeń poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT), które to pomiary są jednym z podstawowych wskaźników stanu fizjologicznego komórek. Badania te przeprowadzono z użyciem trzech komercyjnych linii komórkowych: ludzkich komórek raka piersi MCF-7, ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC i mysich makrofagów RAW 264.7 stymulowanych nadtlaniem wodoru w dwóch stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM. Ilość wolnych rodników w komórkach zmierzono z użyciem gotowego zestawu fluorymetrycznego firmy Sigma-Aldrich (nr katalogowy MAK143 Sigma) oraz 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (2',7'DCF-DA). W obu przypadkach intensywność fluorescencji była proporcjonalna do ilości powstających RFT.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

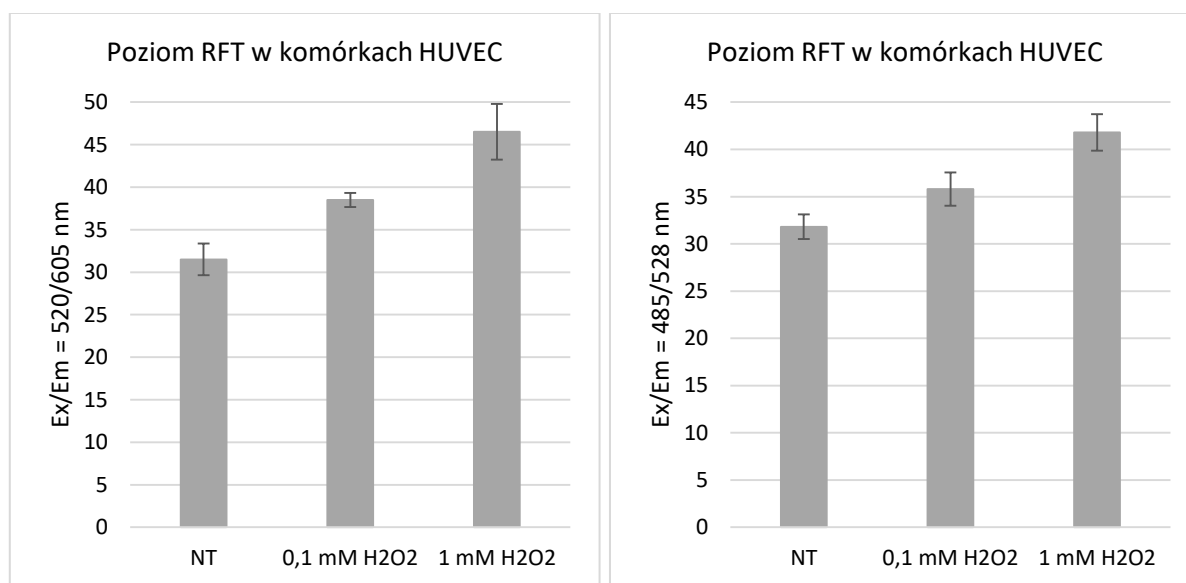
Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w ludzkich komórkach śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC

Na poniższych wykresach (Ryc. 5 i 6) przedstawiono poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HUVEC (25000 na dołek) stymulowanych dwoma stężeniami nadtlenu wodoru

(0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



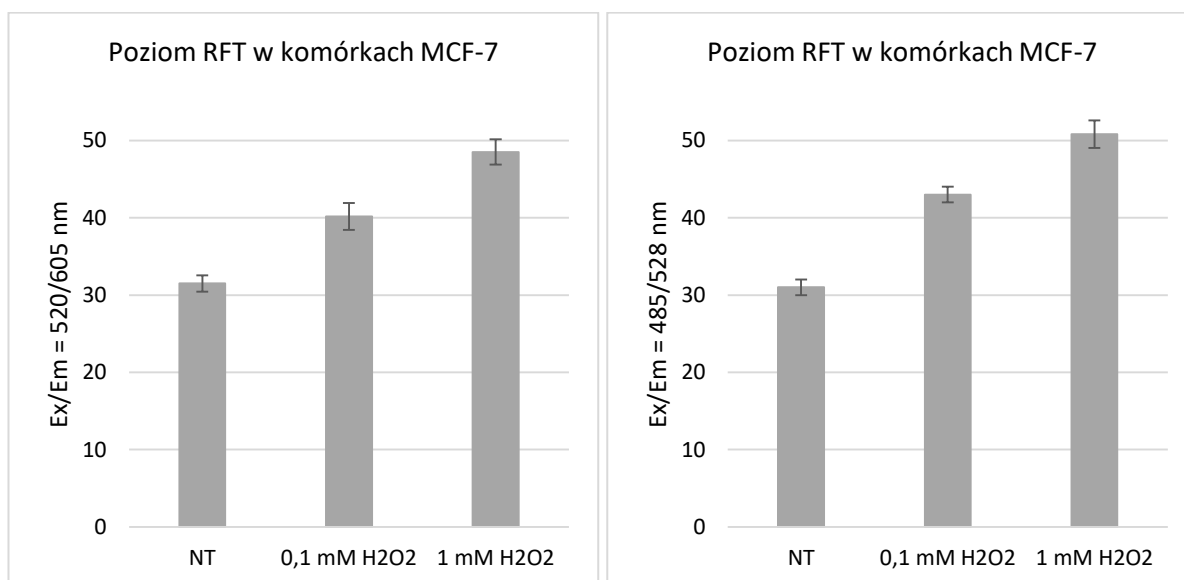
Ryc. 5 i 6 Poziom RFT w komórkach HUVEC oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

Obserwacja:

Przedstawione powyżej wyniki pomiaru fluorescencji umożliwiające ocenę poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT) jednoznacznie wskazują, iż stymulacja komórek nadtlaniem wodoru (silnym induktorem stresu oksydacyjnego) wywołuje dawko-zależny wzrost poziomu RFT w komórkach w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym niestymulowanych. Obserwowane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi, które wskazują, iż komórki aktywne metabolicznie i wykazujące prawidłowy stan fizjologiczny pod wpływem nadtlenu wodoru wydzielają duże ilości RFT, co stanowi jeden z mechanizmów reakcji immunologicznej komórek w odpowiedzi na inwazję mikroorganizmów.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RTF) w ludzkich komórkach raka piersi MCF-7

Na poniższych wykresach (Ryc. 7 i 8) przedstawiono poziom RFT w komórkach nowotworowych MCF-7 stymulowanych dwoma stężeniami nadtlenku wodoru (0,1mM i 1mM) w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 7 i 8 Poziom RFT w komórkach MCF-7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

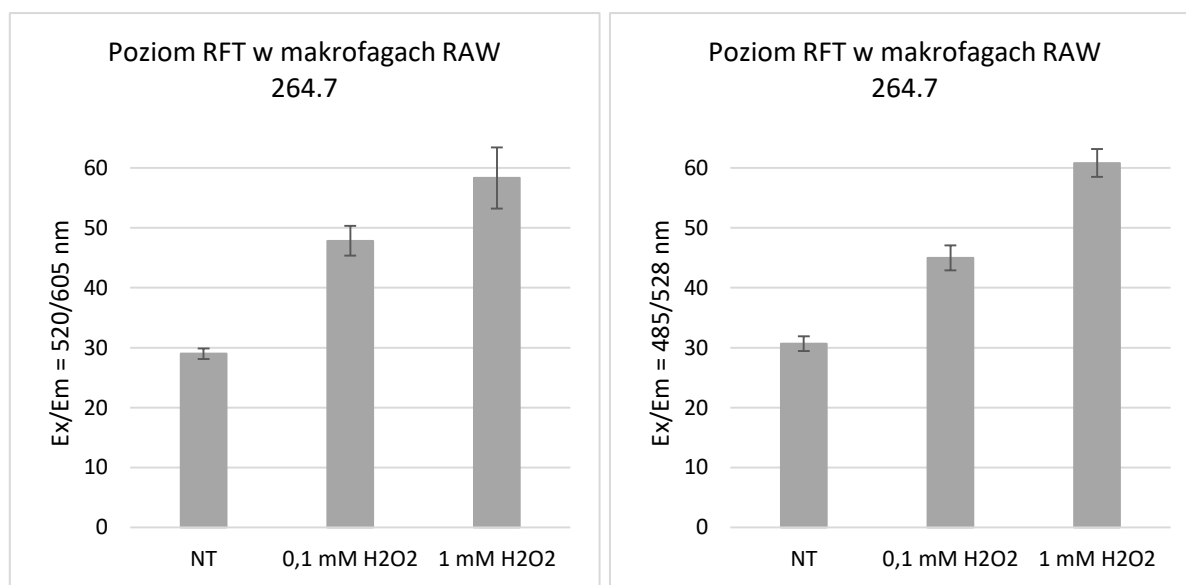
Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji przedstawiają poziom RFT oznaczony w komórkach MCF-7 stymulowanych nadtlakiem wodoru. Na wykresie można zaobserwować, iż traktowanie komórek wymienionym silnym induktorem stresu oksydacyjnego powoduje wzrost poziomu RFT w komórkach w porównaniu do prób kontrolnych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, iż cała procedura przeprowadzona pod komorą umożliwiła uzyskanie

aktywnych metabolicznie komórek nowotworowych, które wykazywały charakterystyczną dla siebie zdolność do wytwarzania RFT pod wpływem nadtlenu wodoru.

Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w mysich makrofagach RAW 264.7

Na poniższych wykresach (Ryc. 9 i 10) przedstawiono poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 stymulowanych nadtlentkiem wodoru w stężeniach 0,1mM i 1mM w porównaniu do komórek niczym nie stymulowanych (NT). Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy stosunku wartości uzyskanych dla pomiaru fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 520$ nm do fali emisji $\lambda_{em} = 605$ nm (w przypadku zestawu firmy Sigma-Aldrich) oraz długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ do fali emisji $\lambda_{em} = 528$ nm (w przypadku wykorzystania 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny), uzyskanych dla 6 dołków z komórkami dla każdego z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.



Ryc. 9 i 10 Poziom RFT w makrofagach RAW 264.7 oznaczony z wykorzystaniem zestawu firmy Sigma-Aldrich (wykres po lewej) oraz z wykorzystaniem 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA) (wykres po prawej)

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru fluorescencji jednoznacznie wskazują na wysoki poziom RFT w mysich makrofagach RAW 264.7 stymulowanych nadtlentkiem wodoru w porównaniu z komórkami kontrolnym. Uzyskane wyniki są całkowicie zgodne z oczekiwanymi. Makrofagi to podstawowe komórki wrodzonego układu odpornościowego, stanowiące pierwszą linię

obrony przed patogenami wnikającymi do organizmu, które posiadają zdolność zabijania drobnoustrojów, m.in. poprzez produkowanie dużych ilości RFT. Na tej podstawie można stwierdzić, iż cała procedura wykonana z użyciem testowanej komory umożliwiła uzyskanie sterylnej hodowli żywych makrofagów, zachowujących swoją aktywność przeciwdrobnoustrojową związaną z wytwarzaniem wolnych rodników.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z fluorymetrycznym oznaczaniem wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu jednoznacznie wykazały przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania w opisywanych testach immunologicznych w warunkach *in vitro*. W przypadku wszystkich trzech badanych linii komórkowych zaobserwowano dawko-zależny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT w komórkach stymulowanych nadtlentem wodoru w dwóch stężeniach: 1 mM oraz 0,1 mM w porównaniu do komórek niczym nietraktowanych. Nadtlenek wodoru jest powszechnie używanym w badaniach induktorem stresu oksydacyjnego, który podczas wykonywania doświadczeń wykorzystywany jest jako tzw. „kontrola pozytywna” dla uzyskiwanych wyników. Przedstawione rezultaty zostały potwierdzone dwoma rodzajami testów: komercyjnym firmy Sigma oraz wykorzystującym związek 2',7'-diocjan dichlorofluoresceiny. Zgodnie z zasadą obu wymienionych testów, tylko komórki żywe posiadają zdolność produkowania RFT pod wpływem zewnętrznego bodźca indukującego stres oksydacyjny, jakim jest bez wątpienia nadtlenek wodoru.

Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o wystąpieniu infekcji byłyby nadmierna produkcja RFT przez komórki niczym niestymulowane.

4.3. Ocena stężenia mediatorów immunologicznych wydzielanych przez komórki wybranych linii

W ramach procedury oceniono użyteczność komory pod kątem wykonywania oznaczeń techniką immunoenzymatyczną ELISA stężenia mediatorów immunologicznych: białka HMGB1, interleukiny (IL)-8 oraz czynnika martwicy nowotworów-alfa (TNF- α) w supernatantach uzyskanych po hodowli ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC, mysich makrofagów RAW 264.7 oraz ludzkich komórek raka piersi MCF-7

stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) *in vitro* w trzech stężeniach: 100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml.

Komórki hodowano w tych samych warunkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności powietrza. W celu wyeliminowania ryzyka infekcji, przed użyciem inkubator wysterylizowany został w temperaturze 186°C.

Każda z komercyjnych linii komórkowych hodowana była w odpowiedniej, zalecanej przez producenta pożywce:

- dla ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC - pożywka Medium 200 z czerwienią fenolową, zawierająca 50 razy stężony roztwór o niskiej zawartości surowicy (z ang. *Low Serum Growth Supplement*; LSGS) oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla mysich makrofagów RAW 264.7 – pożywka DMEM z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS oraz mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny),
- dla ludzkich komórek raka piersi MCF-7 – pożywka RPMI 1640 z 2mM L-glutaminą, NaHCO₃ i czerwienią fenolową, zawierająca 10% inaktywowany FBS, mieszaninę 100 razy stężonych antybiotyków (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny) oraz 1% roztwór endogennych aminokwasów (z ang. *nonessential amino acids*; NEAA).

Stymulacja ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Po osiągnięciu przez komórki 70-80 % stanu konfluencji, z butelki hodowlanej usunięto starą pożywkę, wykonano proces odrywania komórek od podłoża przy użyciu 0,025% roztwór trypsyna/EDTA, który umożliwi oderwanie komórek od powierzchni butelki (tzw. proces trypsynizacji), a następnie zliczono komórki występujące w uzyskanej zawieszynie.
2. Komórki wysiano na 24-dołkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano przez 24 godziny.
3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pohodowlane zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

Stymulacja ludzkich komórek raka piersi MCF-7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża przy użyciu 0,25% roztworu trypsyna/EDTA.
2. Po wykonaniu zliczenia komórek przy użyciu komory Bürkera, komórki wysiano na 24-dolkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowano w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
3. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
4. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
5. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pohodowlane zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

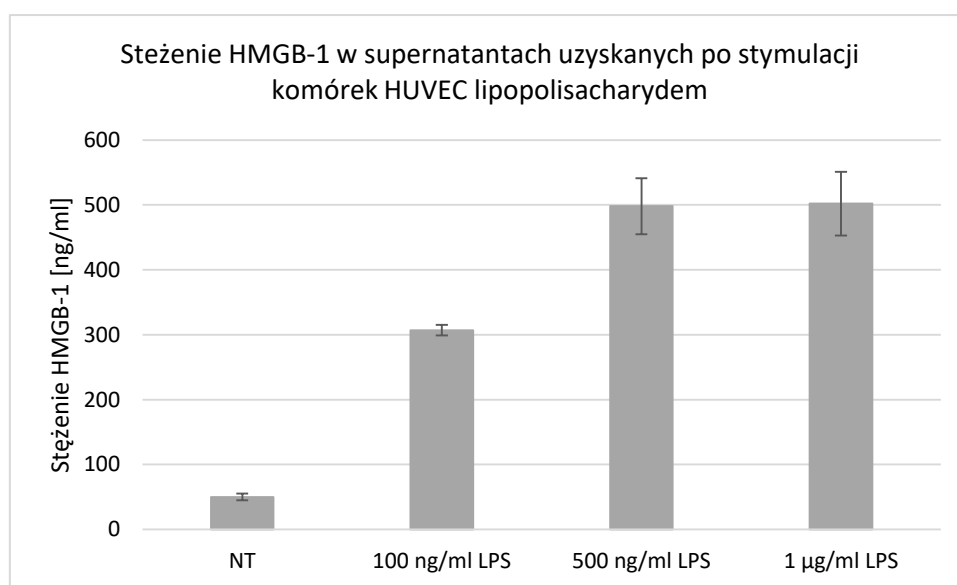
Stymulacja mysich makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem *in vitro* pod komorą obejmowała następujące etapy:

1. Usunięcie starej pożywki hodowlanej po 2-3 dniach hodowli komórek i oderwanie komórek od podłoża mechanicznie przy użyciu skrobaka.
2. Zliczenie komórek przy użyciu komory Bürkera.
3. Wysianie komórek na 24-dolkową płytkę hodowlaną i pre-inkubowanie ich w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
4. Po zakończeniu pre-inkubacji supernatant znad hodowli usunięto, do studzienek zawierających komórki dodano świeżej sterylnej pożywki hodowlanej, a następnie LPS w stężeniach końcowych: 100 ng/ml/10⁶ komórek, 500 ng/ml/10⁶ i 1 µg/ml/10⁶ komórek. Każdy wariant doświadczalny wykonano w 6 powtórzeniach.
5. Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO₂ na 24 godziny.
6. Po zakończeniu 24-godzinnej stymulacji zawartość studzienek pobrano do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Supernatanty pohodowlane zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczenia stężenia białka HMGB-1, IL-8 i TNF-α techniką ELISA.

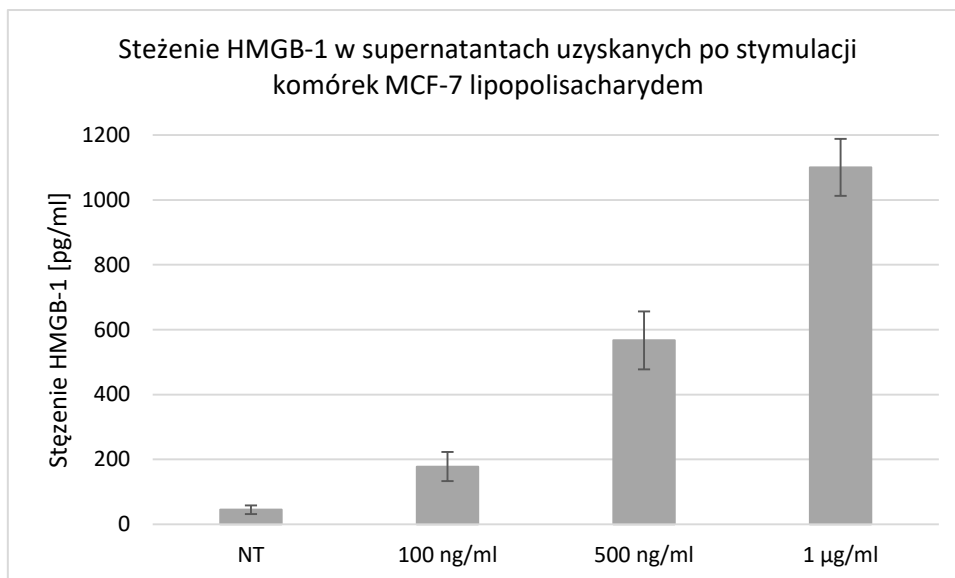
Immunoenzymatyczne oznaczanie techniką ELISA stężenia białka HMGB1

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy EIAab® (nr katalogowy E0399h) w przypadku komórek śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu EIAab® (nr katalogowy E0399m) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

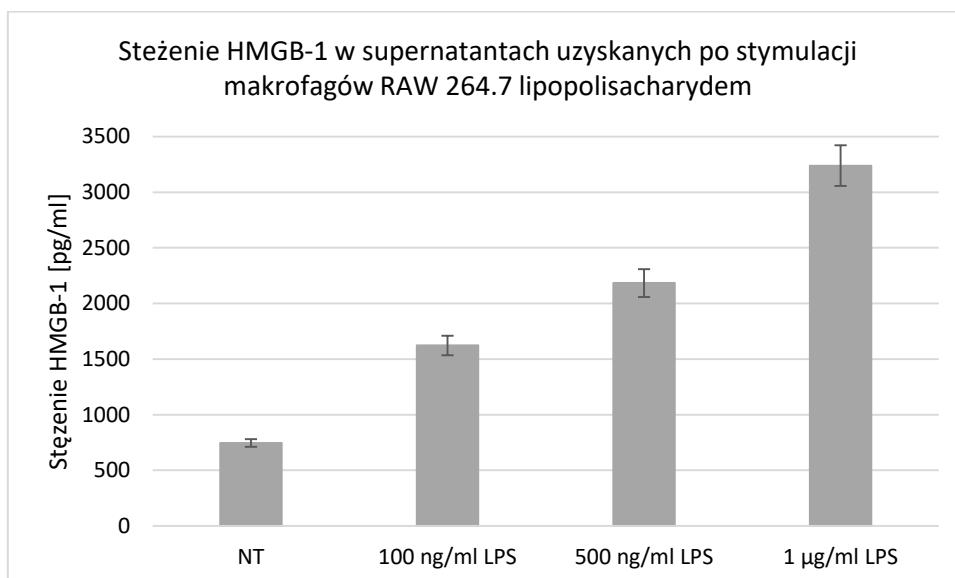
Na poniższych wykresach (Ryc 11, 12 i 13) przedstawiono wyniki analizy stężenia białka HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 oraz RAW 264.7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 11 Steżenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 12 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem



Ryc. 13 Stężenie HMGB-1 w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

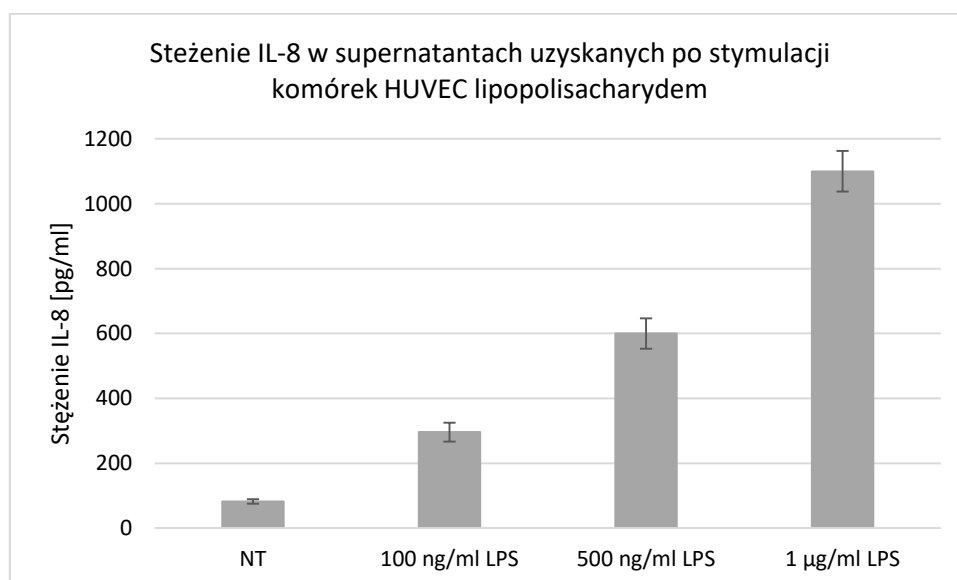
Przedstawione wyniki pomiaru stężenia HMGB-1 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC, MCF-7 i RAW 264.7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem LPS wydzielają białko HMGB-1. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki znajdują się

w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję HMGB-1 pod wpływem czynnika stymulującego.

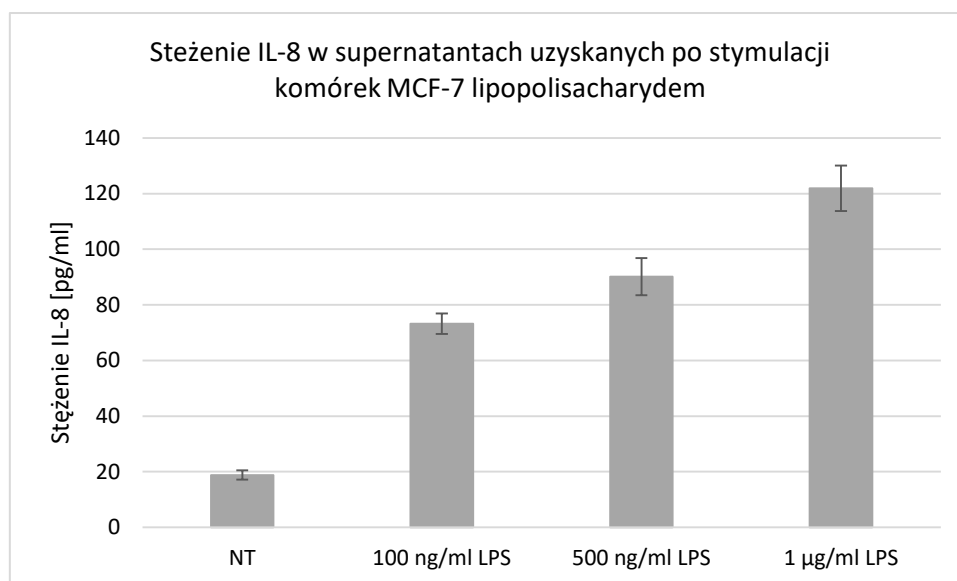
Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia IL-8

Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy D8000C). Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

Na poniższych wykresach (Ryc. 14 i 15) przedstawiono wyniki analizy IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 14 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 15 Stężenie IL-8 w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

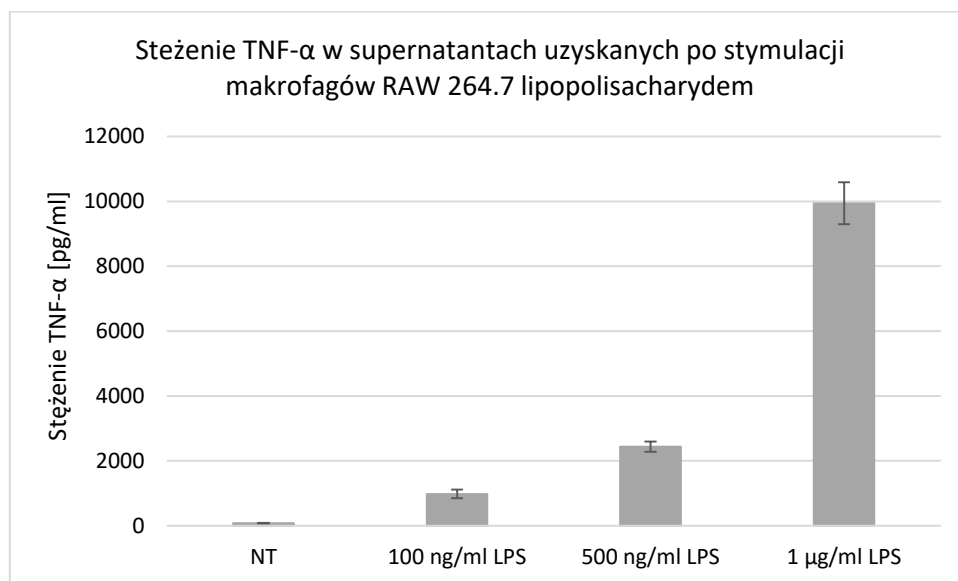
Przedstawione wyniki pomiaru stężenia IL-8 przy użyciu testu ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem jednoznacznie wskazują, iż badane komórki pod wpływem użytego stymulatora pochodzenia bakteryjnego wydzielają IL-8. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i wskazują, iż testowana komora umożliwia uzyskanie sterylnej hodowli obu linii komórkowych, a same komórki znajdują się w takim stanie fizjologicznym, który umożliwia im produkcję IL-8 pod wpływem LPS.

Immunoenzymatyczne oznaczenia techniką ELISA stężenia TNF- α

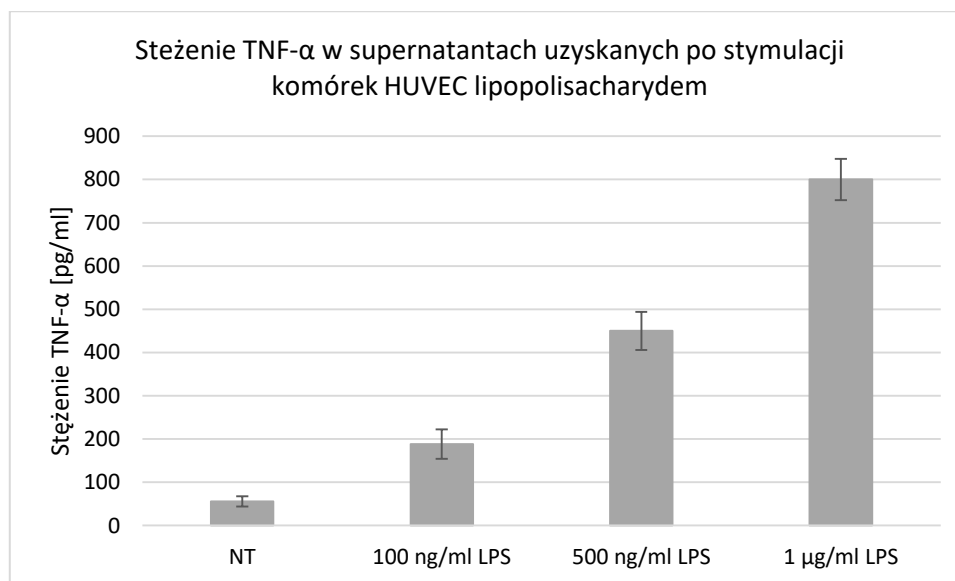
Oznaczenia wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy DTA00C) w przypadku komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC i ludzkich raka piersi MCF-7 oraz zestawu firmy R&D Systems (nr katalogowy MTA00B) w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7. Wszystkie procedury związane z oznaczeniami wykonano zgodnie z instrukcją producenta dostarczoną do gotowych zestawów.

Na poniższych wykresach (Ryc. 16, 17 i 18) przedstawiono wyniki analizy stężenia TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 lipopolisacharydem w trzech stężeniach (100 ng/ml, 500 ng/ml i 1 µg/ml) przez 24 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm błąd standardowy w porównaniu do komórek kontrolnych, niczym nietraktowanych (NT), dla oznaczenia w dwóch powtórzeniach dla

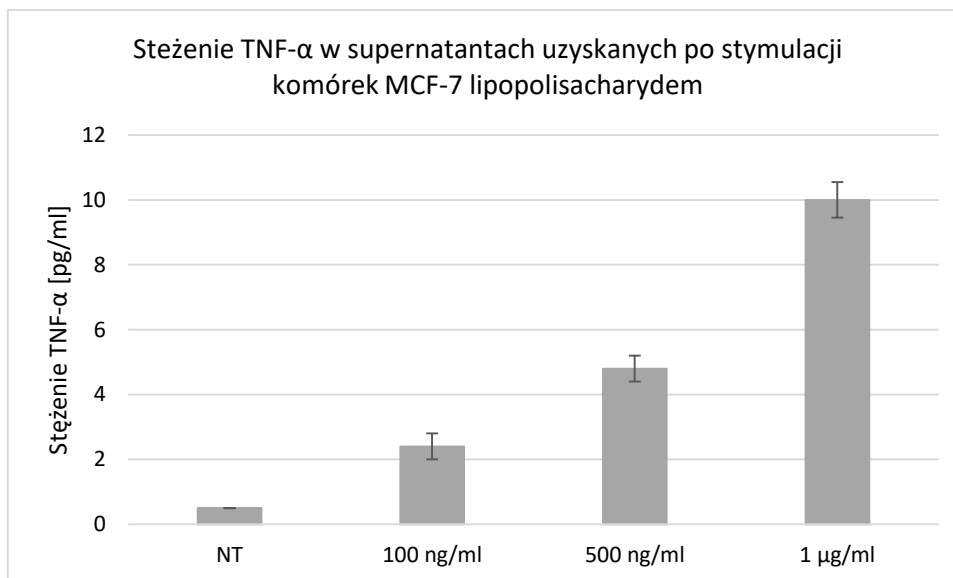
każdego z sześciu niezależnych powtórzeń danego eksperymentu (w stosunku do każdego stężenia LPS).



Ryc. 16 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji makrofagów RAW 264.7 lipopolisacharydem



Ryc. 17 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek HUVEC lipopolisacharydem



Ryc. 18 Stężenie TNF- α w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek MCF-7 lipopolisacharydem

Obserwacja:

Przedstawione wyniki pomiaru poziomu TNF- α metodą ELISA w supernatantach uzyskanych po stymulacji komórek RAW 264.7, HUVEC i MCF-7 jednoznacznie wskazują, iż wraz ze wzrostem użytego do stymulacji stężenia LPS, komórki produkują większe ilości badanej cytokiny. Na wykresach można również zaobserwować, iż poziom TNF- α uwolnionego do medium hodowlanego przez komórki nowotworowe MCF-7 jest znacznie niższy w porównaniu do komórek śródbłonna naczyń HUVEC i RAW 264.7. Uzyskane wyniki są całkowicie zgodne z danymi literaturowymi, które potwierdzają dawko-zależną produkcję TNF- α przez te badane linie komórkowe stymulowane LPS. Na tej podstawie można stwierdzić, iż komórki hodowane i stymulowane pod badaną komorą znajdowały się w prawidłowym stanie fizjologicznym, a same hodowle komórkowe nie były zainfekowane.

Wniosek:

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych procedur związanych z oznaczaniem poziomu mediatorów immunologicznych (białka HMGB-1, IL-8 i TNF- α) wydzielanych przez trzy badane linie komórkowe (ludzkie komórki śródbłonna HUVEC, mysie makrofagi RAW 264.7 i ludzkie komórki raka piersi MCF-7) stymulowane lipopolisacharydem bakteryjnym jednoznacznie wykazały na przydatność testowanej komory pod kątem jej wykorzystania do tego rodzaju testów immunologicznych. Wszystkie uzyskane wyniki badań są zgodne z danymi

literaturowymi, które wskazują, iż komórki układu odpornościowego (HUVEC i RAW 264.7), jak i nowotworowe (MCF-7) pod wpływem czynnika pirogenego (LPS) są zdolne do produkcji mediatorów immunologicznych zaangażowanych w procesy zapalne (IL-8, HMGB-1, TNF- α), nekrozę tkanek (HMGB-1) czy angiogenezę (IL-8).

Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, iż praca z użyciem testowanej komory umożliwiła hodowlę badanych linii komórkowych w warunkach sterylnych, z zachowaniem ich pełnej aktywności metabolicznej i fizjologicznej. Potencjalnym sygnałem świadczącym o zaburzeniach w funkcjonowaniu komórek, byłby utrata przez nie zdolności do wydzielania mediatorów immunologicznych pod wpływem LPS. Nadmierna produkcja badanych cytokin przez komórki kontrolne, niczym niestymulowane (NT) świadczyłaby z kolei o wystąpieniu infekcji w prowadzonych hodowlach komórkowych.

Podsumowanie:

- **Konstrukcja komory jest prawidłowa, umożliwia wygodną pracę dwóm eksperymentatorom jednocześnie.**
 - **Materiały, z których wykonano komorę są wysokiej jakości i nie sprawiają problemów podczas przeprowadzania dekontaminacji.**
 - **Testowana komora wyposażona została w system filtrów, które skutecznie zatrzymują drobnoustroje krążące w powietrzu.**
 - **Stwierdzono problem z skutecznością przeciwdrobnoustrojowego działania lampy UV.**
 - **Komora właściwie zabezpieczała odczynniki i badany materiał podczas zakładania i prowadzenia hodowli ludzkich i zwierzęcych linii komórkowych.**
 - **Przeprowadzone badania wykazały przydatność komory do prowadzenia testów immunologicznych *in vitro*.**
-
- **Sugerowane jest wykonanie uszczelki w szybach bocznych komory z innego materiału, bardziej odpornego na dekontaminację.**
 - **Sugerowane jest wyposażenie komory w dłuższą lampę UV adekwatną do szerokości blatu roboczego, aby zapewnić odpowiednie naświetlenie jego całej powierzchni.**
 - **Sugerowane jest wykonanie obudowy chroniącej filtr sufitowy z materiału umożliwiającego dezynfekcję.**
 - **Sugerowane jest umieszczenie otworów w elementach blatu roboczego ułatwiających jego montaż i demontaż.**
 - **Sugerowane jest wprowadzenie niewielkich poprawek w panelu dotykowym sterującym pracą komory tak, aby ułatwić jego obsługę osobom o grubszych palcach.**

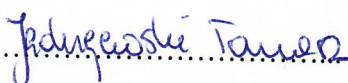
Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 120 cm
w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.

Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

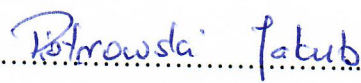
Zespół realizujący badania:



dr hab. Sylwia Wrotek



dr Tomasz Jędrzejewski



dr Jakub Piotrowski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Immunologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 25 20, 56 611 49 48, fax 56 611 25 19
(1677)



prof. dr hab. Wiesław Kozak

Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 180 cm w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.

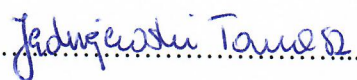
Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

Zespół realizujący badania:



dr hab. Sylwia Wrotek

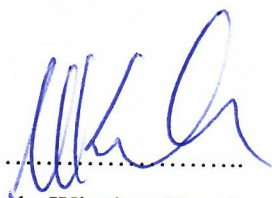


dr Tomasz Jędrzejewski



dr Jakub Piotrowski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Immunologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 25 20, 56 611 49 48, fax 56 611 25 19
(1677)



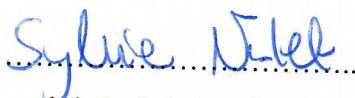
prof. dr hab. Wiesław Kozak

Raport zbiorczy z testowania komory laminarnej o szerokości 150 cm
w ramach realizacji zamówienia publicznego: „Przeprowadzenie prac badawczych i rozwojowych w celu wytworzenia innowacyjnej komory do badań mikrobiologicznych w ramach działania 1.1. Projekty B+R przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego” na zasadach zawartych w umowie z Narodowym Centrum Badań i Rozwoju z dnia 19 kwietnia 2016 roku zgodnie z zapisami Umowy zawartej w dniu 13.11.2017 w Toruniu, pomiędzy ALCHEM GRUPA Sp. z o. o. reprezentowaną przez Prezesa Zarządu Pana Bogusława Hajdasza a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu reprezentowanym przez Rektora Pana prof. dr hab. Andrzeja Tretyna.


Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Pod kierownictwem prof. dr hab. Wiesława Kozaka.

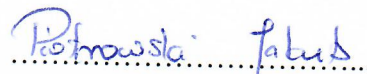
Zespół realizujący badania:



dr hab. Sylwia Wrotek



dr Tomasz Jędrzejewski



dr Jakub Piotrowski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Immunologii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 25 20, 56 611 49 48, fax 56 611 25 19
(1677)



prof. dr hab. Wiesław Kozak