



I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

Projekta progressa pārskats par periodu

01.01.2019. - 31.03.2019.

- Aktivitāte:** Darbības programmas "Izaugsme un nodarbinātība" 1.1.1. specifiskā atbalsta mērķa "Palielināt Latvijas zinātnisko institūciju pētniecisko un inovatīvo kapacitāti un spēju piesaistīt ārējo finansējumu, ieguldot cilvēkresursos un infrastruktūrā" 1.1.1.1. pasākums "Praktiskas ievirzes pētījumi".
- Projekta numurs:** 1.1.1.1/16/A/144
- Projekta nosaukums:** Magnētiskā lauka ierosinātas maisīšanas ietekme uz biotehnoloģiskajiem procesiem
- Projekta īstenošanas vieta:** Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts, Fizikālās enerģētikas institūts, Rīgas Tehniskā universitāte
- Projekta zinātniskais vadītājs:** Juris Vanags
- Sadarbības iestāde:** Centrālā finanšu un līgumu aģentūra

Projekts tiek īstenots ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda finansiālu atbalstu



Magnētiskā lauka ierosinātas maisīšanas ietekme uz biotehnoloģiskajiem procesiem

Projekta vispārīgais mērķis: izpētīt magnētiskā lauka ierosinātas maisīšanas radītā lauka ietekmi uz mikroorganismu augšanu un biosintēzi.

Projekta specifiskais mērķis: pētījumu rezultātā noteikt magnētisko piedziņu pielietojamības robežas dažādiem steriliem biotehnoloģiskajiem procesiem.

Pēc projekta īstenošanas grafika pārskata periodā tiek īstenotas sekojošas darbības:

2. Magnētiskā lauka mērogošana laboratorijas bioreaktorā un to ietekme uz baktēriju, raugu un mikroaļģu kultivāciju;
3. Nosacījumu izpēte magnētisko rotoru pielietojumiem dažādu mikroorganismu kultivācijai.

Pēc projekta īstenošanas grafika pārskata periodā tiek noslēgtas sekojošas darbības:

2. Rotoru magnētiskā lauka ietekmes izvērtējums uz baktēriju, raugu un mikroaļģu kultivācijas procesiem laboratorijas bioreaktorā.

2. darbība. Rotoru magnētiskā lauka ietekmes izvērtējums uz baktēriju, raugu un mikroaļģu kultivācijas procesiem laboratorijas bioreaktorā

Darbības mērķis: Izvērtēt rotoru magnētiskā lauka ietekmi mikroorganismu (kā baktērijas, raugi, mikroaļģes vai citu kultūru) kultivācijas procesos.

Izvirzītie uzdevumi mērķa sasniegšanai:

- Eksperimentālās iekārtas magnētiskā lauka ietekmes noteikšanai uz mikroorganismiem izstrāde.

Rezultāti:

Projekta īstenošanas laikā eksperimentālajai iekārtai tika veiktas vairākas modifikācijas, lai izveidotu iekārtu, kas objektīvi var noteikt tikai magnētiskā lauka ietekmi uz mikroorganismu ietekmi. Iegūtie dati pēc statistiskas apstrādes norāda, ka citas modifikācijas nav jāveic un izstrādāto iekārtu ir iespējams izmantot 3.darbības rezultātu sasniegšanai

3. Darbība. Magnētiskā lauka mērogošana laboratorijas bioreaktorā un to ietekme uz baktēriju, raugu un mikroaļģu kultivāciju.

Izvirzītie uzdevumi:

- Veikt izmēģinājuma eksperimentus zīdītājšūnu *CHO-S* kultivēšanas procesa pārvešanai uz 125 mL Erlenmeijera kolbām;
- Sagatavot 2 konferenču abstraktus;
- Sagatavot stenda referātu dalībai konferencē Amsterdamā;
- Izstrādāt *CHO-S* zīdītājšūnu kultivēšanas procesu ar piebarošanu atkarībā no glikozes koncentrācijas 125 ml Erlenmeijera kolbās;
- Turpināt apgūt ANSYS inženierijas programmatūras CFX un FLUENT moduli;
- Izveidot projekta partneru 15m³ reaktora modeli ar 7 turbīnu variācijām un neņūtona šķidrums vidi.
- Vizualizēt 15m³ reaktora maisīšanas procesu pie spēka momenta 800 [N.m];
- Noteikt kura no 7 sistēmām spēj attīstīt lielākus apgriezienus un plūsmas ātrumu uz reaktora sienas nepārsniedzot spēka momentu uz asi 800 [N.m];
- Noslēgt eksperimentu sēriju mikroreaktorā ar raugiem *S.cerevisiae* 0.8 T magnētiskajā laukā;
- Uzsākt eksperimentu sēriju mikroreaktorā ar baktērijām *E.coli* 0.8 T magnētiskajā laukā;
- Uzsākt zinātniskā raksta par mērogota magnētiskā lauka ietekmi uz mikroorganismu augšanu gatavošana;

- Konstruēt optimizētā magnētiskā sajūgu.

Rezultāti:

Pārnesot *CHO-S* zīdītājšūnu kultivēšanas procesu uz 125 mL Erlenmeijera kolbām ar darba tilpumu 40 mL, tika mainīta šūnu monitoringa metodika. Atšķirībā no kultivēšanas procesa Petri traukos, šeit paraugu ņemšana tika veikta tieši no kolbas, nevis resuspendējot centrifugēšanas mēģenēs. Secināts, ka ievērojami palielinātais suspensijas darba tilpums ir piemērots kultivēšanas procesa monitoringam ar iepriekš izmantoto tripāna zilā iekrāsošanas metodi bez centrifugēšanas un resuspendēšanas, jo šajā gadījumā netiek būtiski ietekmēts suspensijas tilpums (parauga daudzums 10 μ L vienā reizē) un datiem ir laba atkārtojāmība. Izmēģinājuma eksperimentos noskaidrota aptuvenā *CHO-S* zīdītājšūnu proliferācijas dinamika 125 mL Erlenmeijera kolbās, kas no 0,2 milj. dzīvotspējīgo šūnu uz mL 0. dienā sasniedz vidēji 4,3 milj. šūnu/mL 4. kultivēšanas dienā. Tāpat noskaidrots, ka glikozes līmenis samazinās par vairāk kā 45% pēc 4 kultivēšanas dienām.

Izveidots plāns zīdītājšūnu *CHO-S* partijas tipa kultivēšanas procesam ar piebarošanu 125 ml Erlenmeijera kolbās pie darba tilpuma 40 ml. Glikoze kā piebarošanas procesa pētāmais parametrs izvēlēta tādēļ, ka tā ir primārais enerģijas un oglekļa avots šūnu kultūrās. Atbilstoši pieejamajiem resursiem un iekārtām izstrādāts piebarošanas devas sastāvs un aptuvenais grafiks, ko izmantot turpmākajos eksperimentos. Saskaņā ar izmēģinājuma eksperimentu datiem par glikozes patēriņu, lai atjaunotu glikozes līmeni sākotnējā apjomā, barotnei katru dienu jāpievieno vidēji 0,65 grami glikozes. Ar pašreizējo kultivēšanas tehnoloģiju tikai 2,9 % nepieciešamās papildus glikozes būtu iespējams nodrošināt ar bāzes barotni. Pirmkārt, jo *Freestyle™ CHO-S* (Thermo Fisher) šūnu līnijai speciāli pielāgotajā, ķīmiski predefinētajā barotnē pēc protokola iespējams variēt tikai ar L-glutamīna koncentrāciju. Otrkārt, jo barotnes tilpums kultivēšanas procesā ar piebarošanu nedrīkst pārsniegt vairāk kā 40-50 % no sākotnējā tilpuma. Šajā gadījumā tas ir 16 ml, tāpēc piebarošanas deva prognozēta 4 ml dienā. Nolemts, ka turpmākajos eksperimentos papildus nepieciešamā glikozes deva, kas tiks aprēķināta balstoties uz konkrētās dienas mērījumiem, tiks pievienota nelielam tilpumam kultivēšanas barotnes sausā pulvera veidā. Pirms pievienošanas šūnu kultūrai katra piebarošanas deva tiks sterilizēta caur filtru sterilos apstākļos.

Izstrādāti septiņi 15m³ reaktora sistēmu modeļi ar Ne-ņūtona šķidrums vidi un analizēts plūsmas ātrums pa izvēlētajām trajektorijām. Modelētas griezes momenta līknes atkarībā no apgriezīnu skaita un iegūti apgriezīnu skaiti pie spēka momentiem 200 [N·m] un 800 [N·m]. Izstrādāta reaktora sistēmu izvēles stratēģija balstoties uz ierobežojošo kritēriju rangu tabulu.

Sagatavots abstrakts konferencei “Biotechnology and Bioengineering” (4.-5.03.2019., Amsterdamā, Nīderlande): A.Rekena, D.Livkisa, D.Loca. Evaluation of Magnetic Field Influence on Chinese Hamster Ovary Cells. Proceedings of International Conference on Biotechnology, Biomarkers & Systems Biology, *Biochem Mol Biol J*, **2019**, 5, 50. DOI: 10.21767/2471-8084-C1-024.

Sagatavots stenda referāts “Evaluation of Magnetic Field Influence on Chinese Hamster Ovary Cells” (A.Rekena, D.Livkisa, D.Loca) un ņemta dalība starptautiskajā konferencē “International Conference on Biotechnology, Biomarkers & Systems Biology” (4-5.03.2019., Amsterdamā, Nīderlande)

Sagatavots abstrakts konferencei “Environment. Technology. Resources.” (20.-22.06.2019., Rēzekne, Latvija): “Factors Affecting Chinese Hamster Ovary Cell Proliferation and Viability” (A.Rekena, D.Livkisa, D.Loca).

Sagatavota 1 publikācija 12. Starptautiskajai zinātniski pētnieciskajai konferencei “Vide. Tehnoloģija. Resursi”, kas norisināsies 2019. gada 20-22. jūnijā Rēzeknē, Latvijā: A.Rekena, D.Livkisa, D.Loca. Factors Affecting Chinese Hamster Ovary Cell Proliferation and Viability. Publikācija iesniegta “Proceedings of International Scientific and Practical Conference «Environment. Technology. Resources **2019**»”.

Noslēgta eksperimentu sērija mikroreaktorā ar raugu kultūru *S.cerevisiae* 0.8 T magnētiskajā laukā. Uzkrātie eksperimentālie dati apstrādāti ar dažādām statistikas metodēm, lai novērtētu dažādus parametrus, piemēram, datu piederību normālajam sadalījumam u.c., kas nepieciešams datu salīdzinājumu starp kontroles un pakļautajām grupām.

Uzsākta eksperimentu sērija mikroreaktorā ar baktērijām *E.coli* 0.8 T magnētiskajā laukā. Tiek uzkrāti eksperimentālie dati par magnētiskā lauka ietekmi uz baktēriju kultūru.

Uzsākta zinātniskā raksta par mērogota magnētiskā lauka ietekmi uz mikroorganismu augšanu gatavošana. Tiek atlasīta zinātniskā literatūra par citiem pētījumiem ar līdzīgiem parametriem, kādi tiek pielietoti īstenotajos eksperimentos projekta mērķu sasniegšanai.

Tika saņemtas iepriekš optimizētā un konstruētā magnētiskā sajūga (biorektoram 1 m³, caurules diametrs 60 mm) izgatavotās detaļas un veikta to salikšana, magnētu nostiprināšana gan uz iekšējā, gan ārējā rotora ar augsti noturīgu līmi. Uz doto brīdi tiek veikta palīgelementu izgatavošana un magnētiskā sajūga komponēšu salāgošana. Tiek izstrādāts jauns ārējā rotora atbalsta gultnis un savienojums ar testēšanas stendu, maksimālā momenta un rotācijas ātruma noteikšanai.

4. Darbība. Nosacījumu izpēte magnētisko rotoru pielietojumiem dažādu mikroorganismu kultivācijai

Izvirzītie uzdevumi:

- Pētīt magnētiskā lauka ietekmi uz *CHO-S* šūnu kodolu stabilitāti.
- Apgūt ANSYS inženierijas un simulāciju izstrādes programmatūras CFX moduli, kas paredzēts hidromehānikas un fluīdu analīzei.
- Izveidot ERAF partneru Koksnes Ķīmijas institūta laboratorijas reaktora digitālo interpretāciju (3D modeli).
- Vizualizēt laboratorijas reaktora maisīšanas procesu pie dažādiem rotora apgriezieniem.
- Sagatavot abstraktu un publikāciju konferencē "12th International Scientific and Practical Conference, June 20-22, 2019, Rezekne, Academy of Technologies, Rezekne, Latvia".

Rezultāti:

In vitro pētīta magnētiskā lauka ietekme uz zīdītājšūnu *CHO-S* kodolu stabilitāti. Izmantots genotoksicitātes tests mikrokodolu noteikšanai starpāžu šūnu citoplazmā. Izstrādāts zīdītājšūnām *CHO-S* piemērots *Cytokinesis-block micronucleus cytom* (saīsināti, *CBMN cyt*) testa protokols ar citokinēzes bloķēšanu. Testa uzdevums ir noteikt, cik daudz ir šūnu, kas satur mikrokodolus, kodolu tiltiņus un kodolu pumpurus. Uzskaitē ir jāveic tad, kad šūnās ir noslēgusies dalīšanās (mitoze). Tāpēc izdarīta citokinēzes bloķēšana, lai būtu iespējams identificēt šūnas ar diviem vai vairākiem kodoliem, t.i. šūnas, kuras pēc apstrādes ir dalījušās.

Noteikta sekojoša *CBMN cyt* testa norises kārtība: 1) šūnas kultivē magnētiskā lauka ietekmē pietiekami ilgu laiku; 2) šūnu kultūrām pievieno citokinēzes bloķētāju citohalasīnu-B uz 30 h; 3) fiksē šūnas ar 4 % formaldehīda šķīdumu 25 min; 4) ja izmanto priekšmetstikliņu, nožāvē šūnas gaisa plūsmā; 5) krāso ar 5-10% redzamās gaismas krāsu (piemēram, *Giemsa*, eozīns, hematoksilīns) 2-7 min vai ar fluorescentajām krāsām 15 min; 6) noskalo krāsu ar destilētu ūdeni (redzamās gaismas krāsu gadījumā) vai fosfāta buferšķīdumu (tipiski fluorescentajām krāsām); 7) ja izmanto hidrofobu uznešanas vidi, nožāvē skalošanas reaģentu gaisa plūsmā; 8) pārklāj ar priekšmetstikliņu, izmantojot hidrofobu uznešanas vidi (*mounting medium*) vai atstāj destilētu ūdeni; 9) kvantitatīvi izsaka magnētiskā lauka ietekmi uz genotoksicitāti pēc divkodolu šūnu ar mikrokodolu, kodoltiltiņu, kodolu pumpuru pazīmēm relatīvā biežuma paraugā.

Pārbaudot dažādu krāsu ietekmi uz paraugu kvalitāti, secināts, ka redzamās gaismas krāsa *Giemsa* intensīvi iekrāso šūnu kodolus un padara grūti izšķiramas šūnu robežas. Pie mazākas koncentrācijas krāsojumu nevar redzēt, bet pie rekomendētās koncentrācijas tas ir pārāk intensīvs. Mēģinot ar krāsas skalošanu panākt kodolu un citoplazmas iekrāsošanu dažādās intensitātēs, vēlamais rezultāts nav panākts. Turpretī fluorescentās krāsas paredzētas specifisku struktūru iezīmēšanai, jo tās "spīd" tikai tad, ja pievienojušās attiecīgajai molekulai šūnā. Savienojot fotoattēlus no dažādiem fluorescences kanāliem, iegūtas kopējas bildes.

Novērtējot vairāk nekā 100 binukleāras šūnas katrā paraugā, secināts, ka pēc 22 dienu kultivēšanas magnētiskā laukā *CHO-S* šūnu kodolu anormāliju īpatsvars magnētiskā lauka ietekmētās šūnās ir 14,49%, kontroles parauga šūnās 13,26 %. Savukārt, pēc 42 dienu kultivēšanas magnētiskā laukā anormāliju īpatsvars ietekmētās šūnās sasniedz 20,95 %, bet kontroles šūnās 13,39 %. Secināts, ka kodolu nestabilitāte novērojama gan magnētiskā lauka ietekmētās, gan kontroles šūnās. Pēc ilgāka perioda magnētiskā lauka ietekmes (t.i. 42 dienām) ir palielināts aberāciju īpatsvars eksperimentālajās šūnās, bet palicis nemainīgs kontroles paraugā.

Apgūti ANSYS CFX darbības principi no ģeometrijas izveides līdz simulācijas rezultātu apskatei. Izveidots laboratorijas reaktora ar dubulto Ruštona turbīnu modelis (ģeometrija, galīgo tilpumu režģis un robežnosacījumi). Simulēts laboratorijas reaktora maisīšanas process un iegūti simulācijas pēcapstrādes attēli.

Sagatavots abstrakts "12th International Scientific and Practical Conference, June 20-22, 2019, Rezekne, Academy of Technologies, Rezekne, Latvia" konferencei "Visualization Approaches for Stirred Tank Bioreactors", autori: Armands Bušs, Normunds Jekabsons, Dagnija Loča, Juris Vanags.

Sagatavota 1 publikācija 12. Starptautiskajai zinātniski pētnieciskajai konferencei "Vide. Tehnoloģija. Resursi", kas norisināsies 2019. gada 20-22. jūnijā Rēzeknē, Latvijā: A.Bušs, N.Jekabsons, A.Suleiko, D.Loca, J.Vanags. Visualization Approaches for Stirred Tank Bioreactors. Publikācija iesniegta "Proceedings of International Scientific and Practical Conference «Environment. Technology. Resources 2019»".

Sapulces par projekta darba uzdevumiem un progresu

Projekta progresa uzraudzībai un informācijas apmaiņai starp visiem projekta partneriem, pārskata periodā tika noturētas divas sapulces, kurās piedalījās pārstāvji no katra sadarbības partnera. Sapulces tika noturētas sekojošos datumos:

- 2019.gada 28.janvārī;
- 2019.gada 14.martā.

Pārskats sagatavots un ievietots mājas lapā 2019.gada 29.martā.