

Módszerfejlesztés emlőssejt-tenyészet glükóz tartalmának Fourier-transzformációs közeli infravörös spektroszkópiai alapú meghatározására

Kozma Bence¹ – Dr. Gergely Szilveszter¹ – Párta László² – Dr. Salgó András¹

¹ *Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék*

² *Richter Gedeon Nyrt., BTCH*



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

NIR Klub

2013. Április 18.

Kutatómunkánk témája

Emlőssejt-tenyészet modellrendszer vizsgálata in-line Fourier-transzformációs közeli infravörös (FT-NIR) spektroszkópiával.

Elsődleges cél:

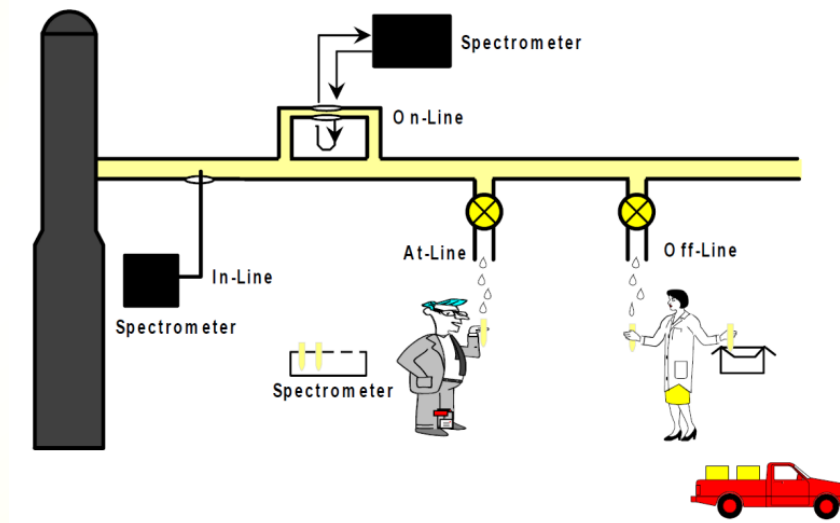
- a NIR spektrumok és a referencia adatok alapján mennyiségi kalibráció készítése az oldat glükóz tartalmára, amelyet később a reaktoros rendszerbe átültethetünk.

Egyéb vizsgálati irányok:

- a NIR alkalmazási határainak feltérképezése az emlőssejt-tenyészetekben és a kísérleti rendszerben,
- spektrális előkezelések optimálása,
- tenyészet fiziológiai paramétereinek hatása a NIR spektrumokra.

A Process Analytical Technology és az infravörös spektroszkópia

- PAT: az FDA új szemléletű gyógyszergyártás-ellenőrzési módszere. (2004)
- Az infravörös spektroszkópia ennek egyik lehetséges módja.
- Számos helyen már bizonyított a biotechnológia területén.



Mérések elrendezési lehetőségei.

Kísérleti modellrendszerünk

Ráztatott lombikban, szakaszos, rátáplálásos módon tenyésztettünk sejteket, majd glükóz hígítási sort készítettünk kívülről hozzáadott glükóz oldattal.

Ötvöztük az előnyeit az *in-vivo* (tenyésztés bioreaktorban) és *in-vitro* (sejtmentes glükóz oldat)

rendszereknek, mert:

- sejtes rendszert,
- valódi tenyésztést, ezért hasonló mátrixot,
- kisebb térfogatot, ezért alacsonyabb költségeket értünk el, de
- utólag beállítottuk a glükóz-koncentrációt.



Bemutatóra kerülő kísérletek

2012.07.25. 1. lombik		
		NOVA referencia
Mérőlombik száma	Beállított $c_{\text{glükóz}}$ [mM]	Mért $c_{\text{glükóz}}$ [mM]
1	Nincs	8,0
2	10,0	11,0
3	15,0	15,3
4	20,0	22,3
5	30,0	32,3
6	40,0	36,4
7	50,0	47,2

2012.07.26. 2. lombik			
		NOVA referencia	DIA referencia
Mérőlombik száma	Beállított $c_{\text{glükóz}}$ [mM]	Mért $c_{\text{glükóz}}$ [mM]	Mért $c_{\text{glükóz}}$ [mM]
1	Nincs	9,6	10,1
2	15,0	16,3	16,2
3	20,0	20,9	21,4
4	30,0	31,6	32,3
5	40,0	37,8	43,2
6	50,0	47,2	54,2

Két lombik eltérő mennyiségű,
de azonos minőségű táplálással.
Különböző tenyésztési idők.

Szaporítás végén glükóz-koncentráció
beállítása a táblázatok szerint.

Spektrumfelvétel és referencia mérések:

- Bruker Matrix-F fotométer,
11 988 - 4 297 cm^{-1} , azaz
834,2 - 2 327,3 nm tartományban.
- INGOLD IN271P transzflexiós,
bemerülő szonda,
2 mm-es optikai úthossz.
- NOVA StatStrip Xpress Meter és
DIA-GM8 glükóz referenciák.

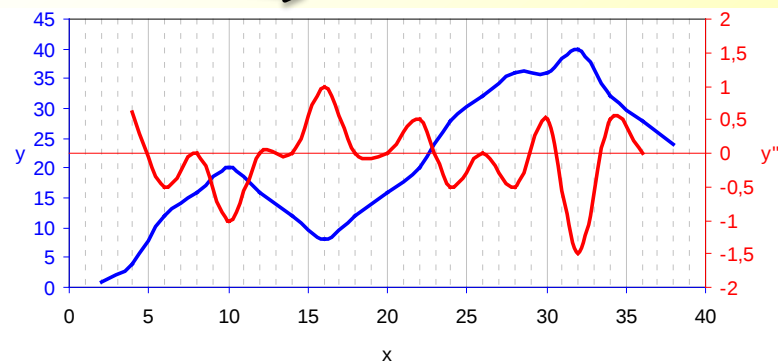
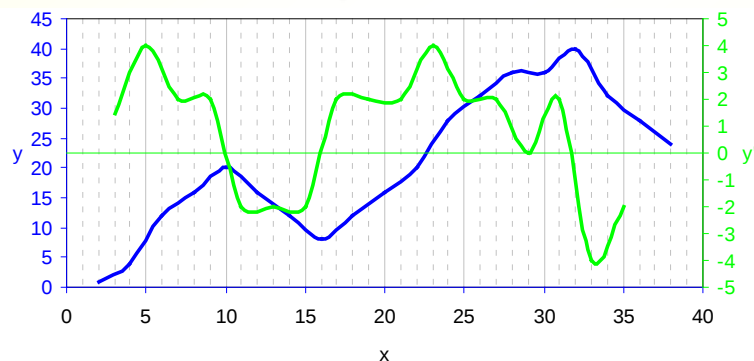
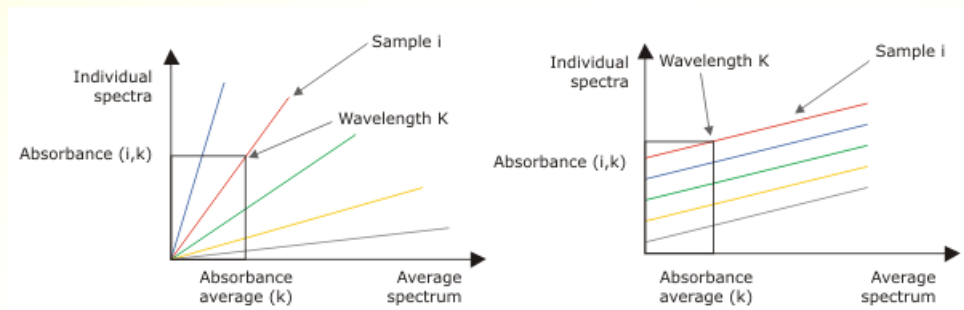
Értékeléshez használt számítógépes programok és matematikai előkezelések

Programok:

- Unscrambler X 10.2
- Microsoft Office Excel 2010

Matematika:

- Standard Normal Variate (SNV)
- Multiplicative Scatter Correction (MSC)
- Spektrumok első és második deriválása Savitzky–Golay-algoritmussal



(Az ábrák csak illusztrációk.)

Mennyiségi kalibráció készítése és értékelése

PLS algoritmus: $Y = X \cdot B + \varepsilon$

Szűkített tartomány (1530-1760 nm), kereszt-validációs értékek összevetése.

Értékelési, összevetési mutatók:

- Pearson-féle korrelációs koefficiens ill. annak négyzete (R^2),

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

- Átlagos hiba négyzetösszeg (RMSE)
- Relatív korrigált tapasztalati szórás (RPD)

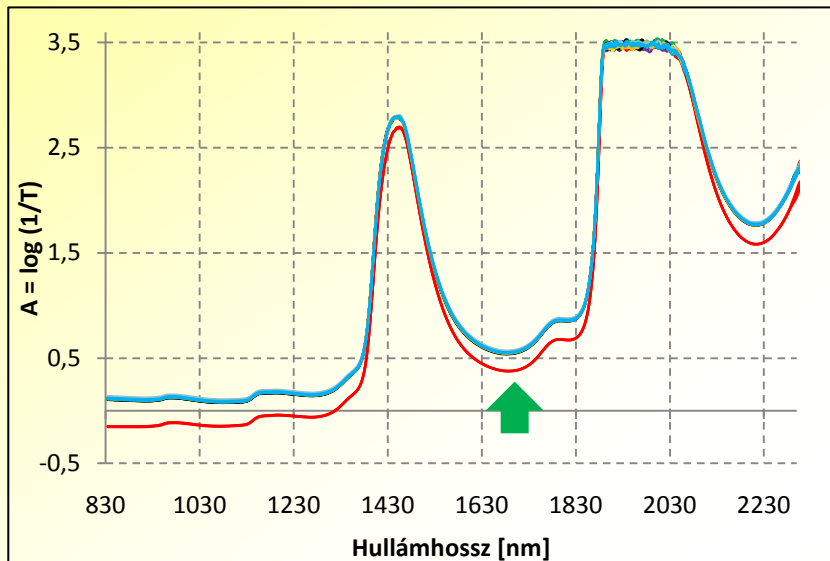
$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n}}$$

$$RPD = \frac{1}{\sqrt{(1 - R^2)}}$$

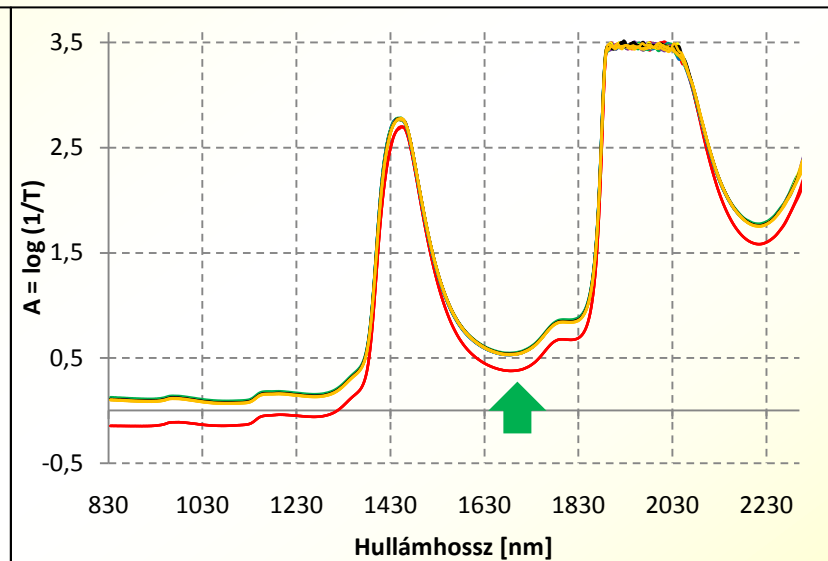
ahol

- y_i számított koncentráció aktuális értéke
- számított koncentráció átlagos értéke
- Y_i névleges koncentráció aktuális értéke
- névleges koncentráció átlagos értéke
- n mérések száma

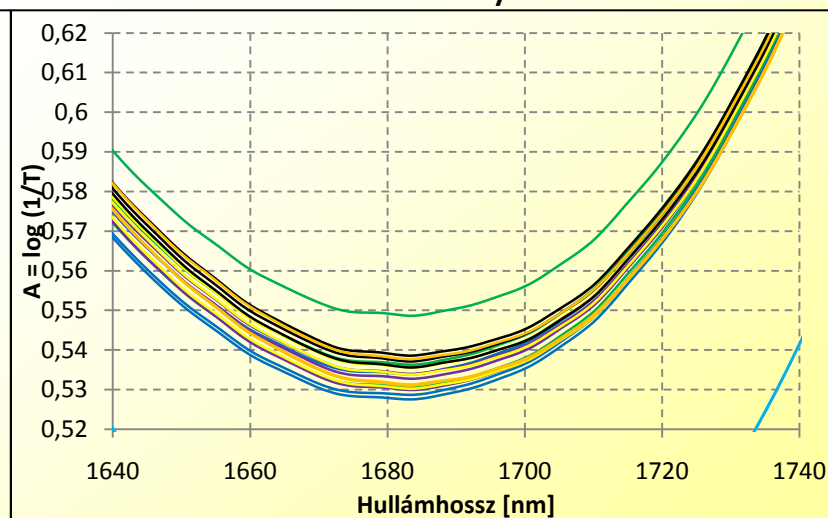
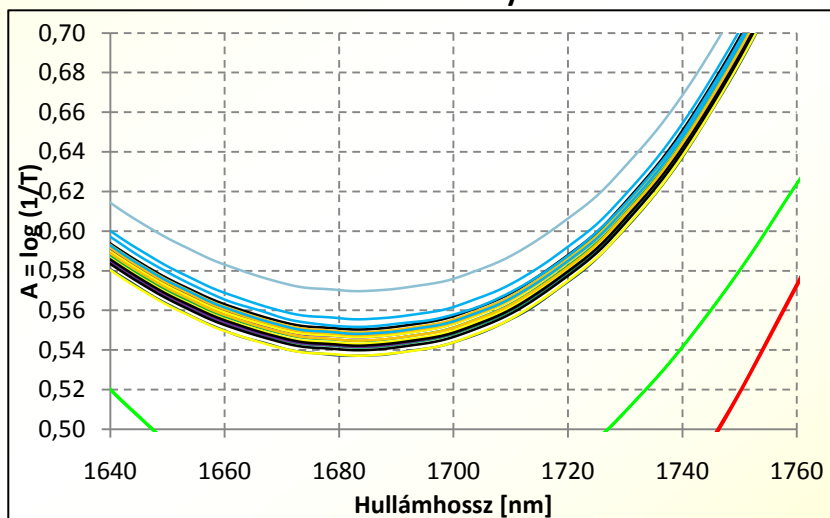
Általános értékelés, spektrumok



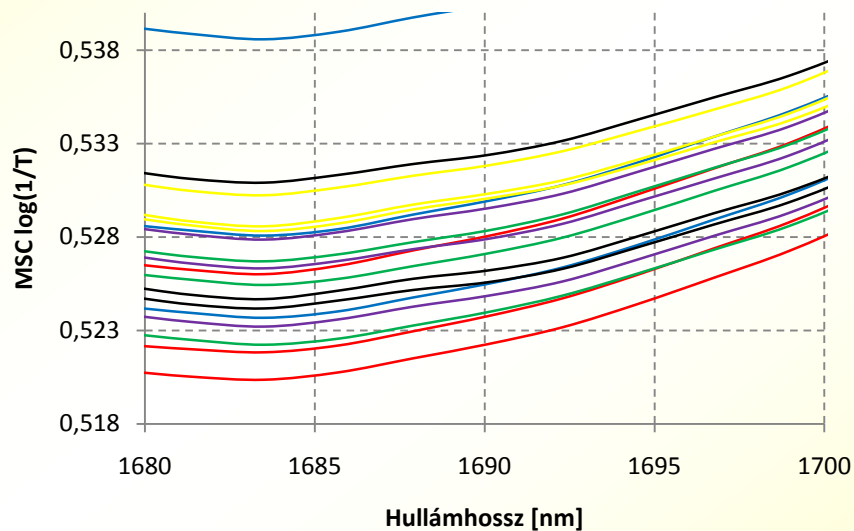
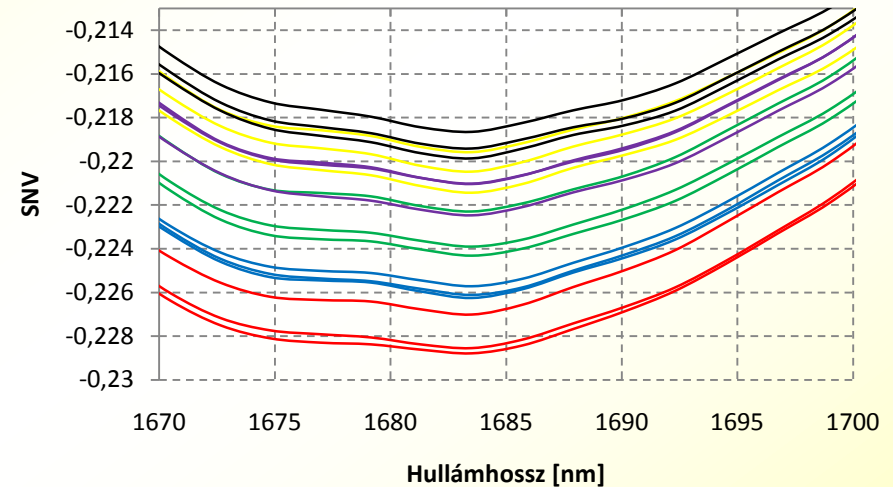
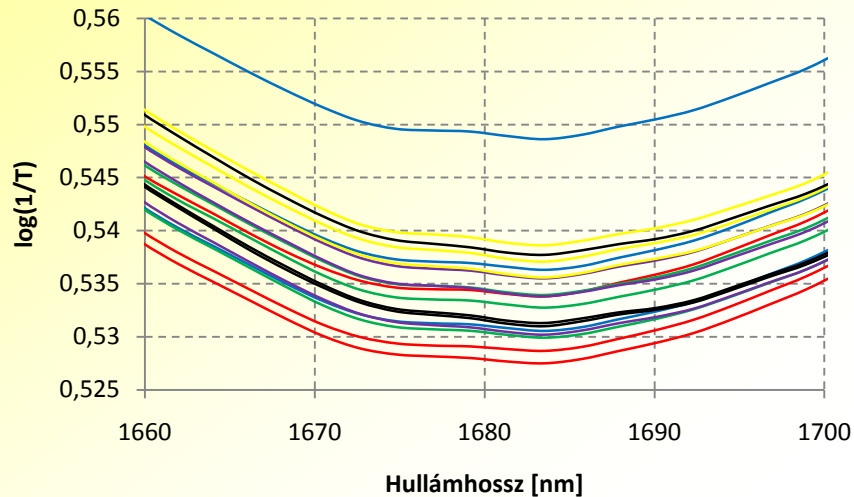
120725. tenyészet



120726. tenyészet



Szóráskorrekciókkal kapott legjobb eredményeket adó spektrumok kinagyítva



A spektrumban található két törés jelzi a glükóz jelenlétét.

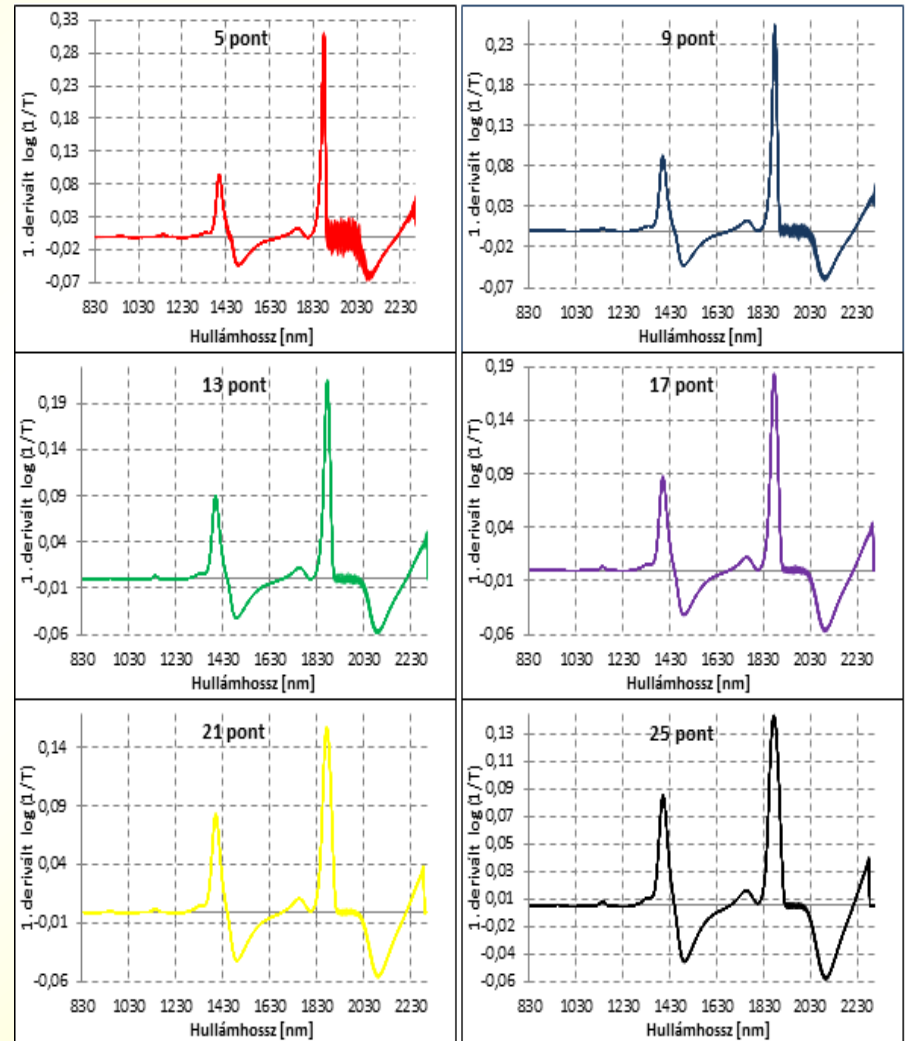
Ezekre alacsony hibával, jó illeszkedéssel készült kalibráció.

Első deriváltak és azok szóráskorrekciókkal kombináltjai

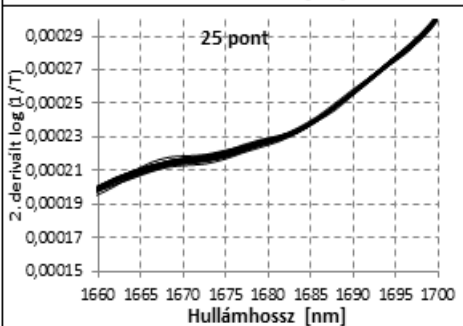
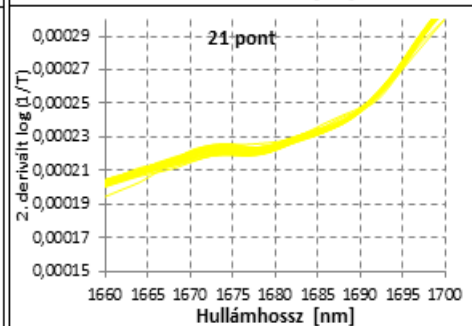
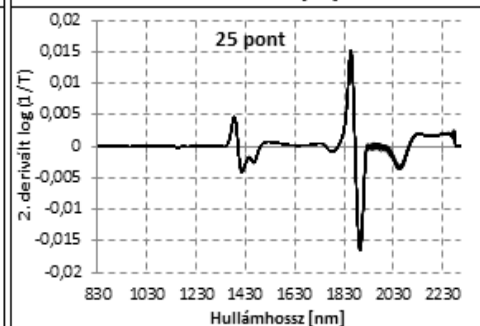
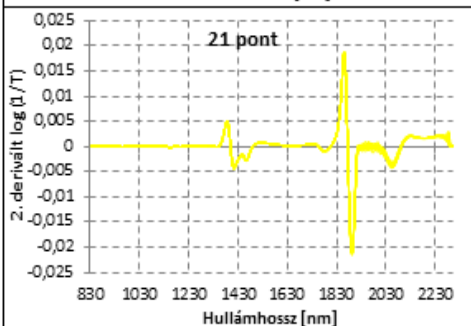
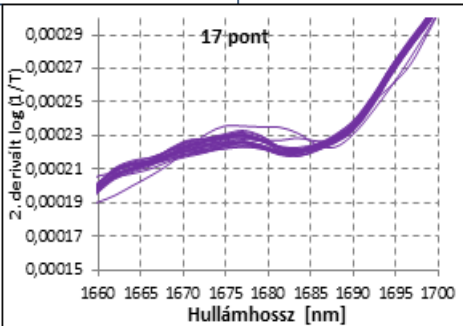
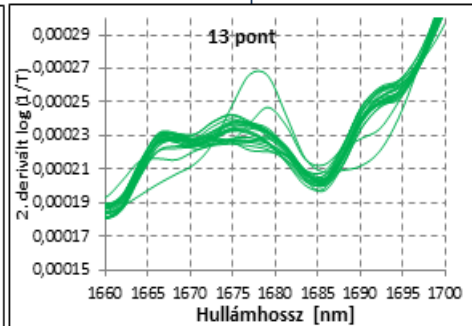
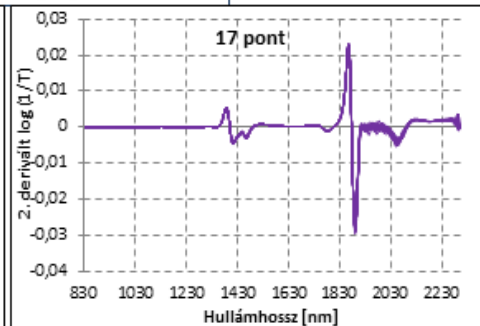
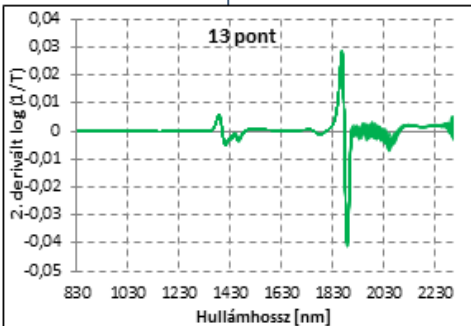
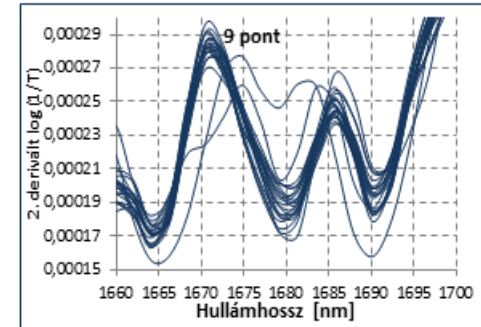
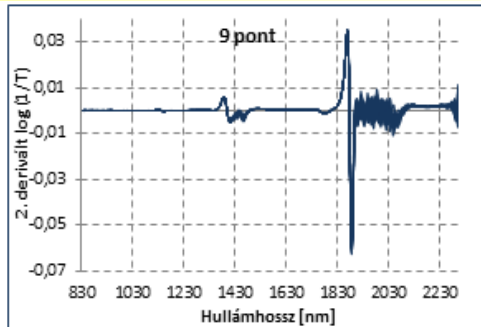
A legjobb kalibrációs eredményeket szolgáltatták.

Legpontosabb illeszkedés: $R^2 = 0,998$

Legkisebb hiba: $RMSE = 1,3 \text{ mM}$



Második deriváltak és azok szóráskorrekciókkal kombináltjai

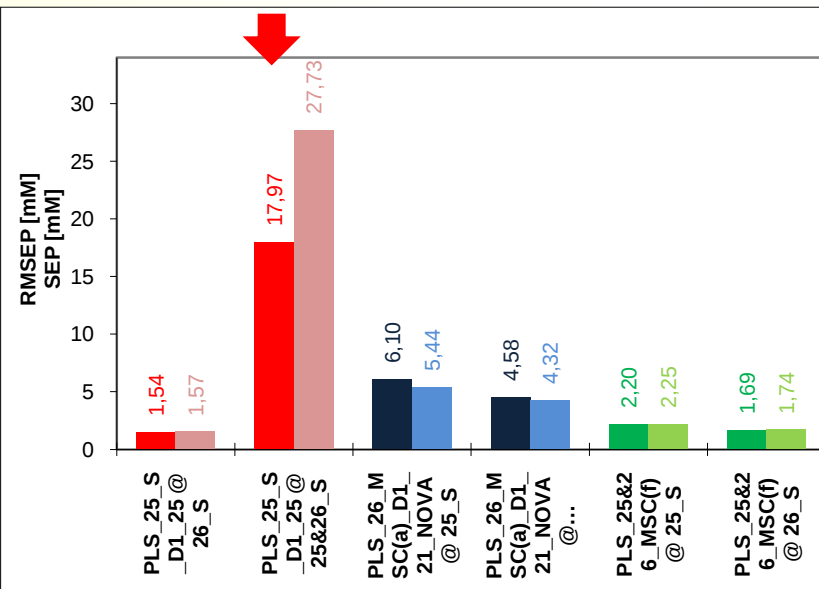
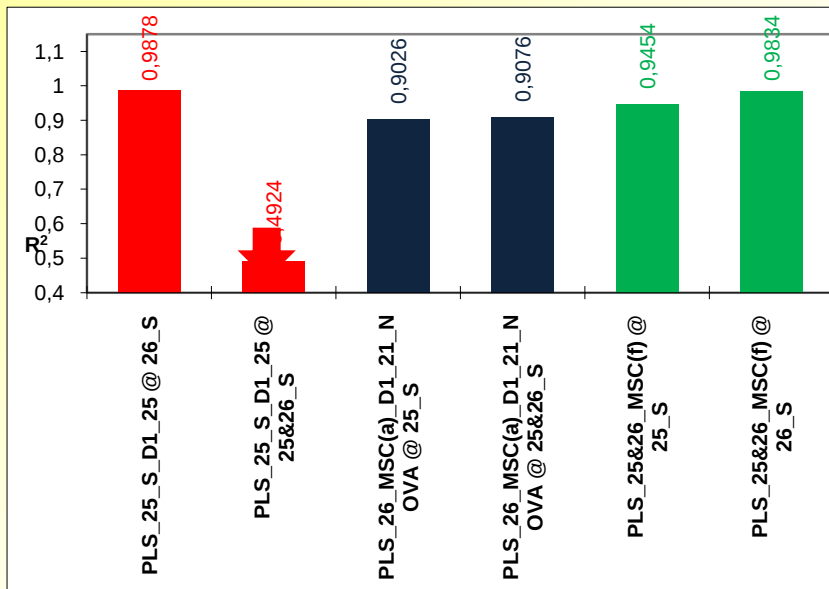


Erős simító hatás figyelhető meg, de gyengébb kalibrációt eredményezett, mint az első deriváltak.

Egyesített spektrumok

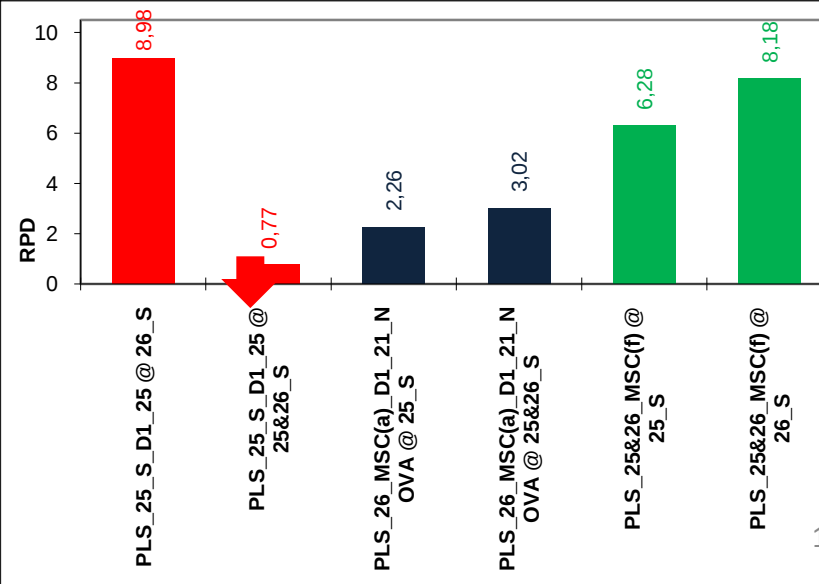
- A tenyészetek spektrumainak összevonása, majd újabb kalibrációk készítése.
- A legjobban a szóráskorrekciókkal kezelt spektrumok teljesítettek.
- De így is elmaradtak a tenyészetenként külön-külön készített kalibrációktól.
- $R^2 = 0,993$; $RMSE = 2,4$ mM

Független kereszt validálás

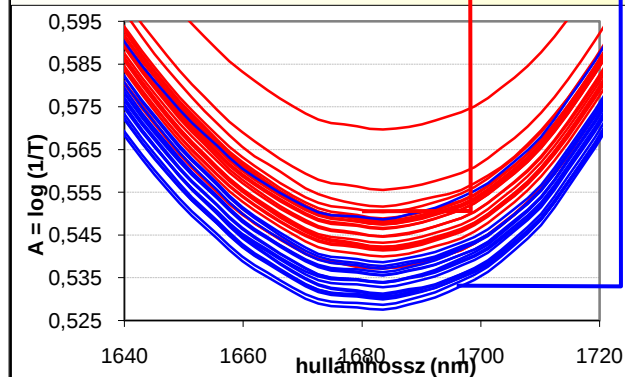
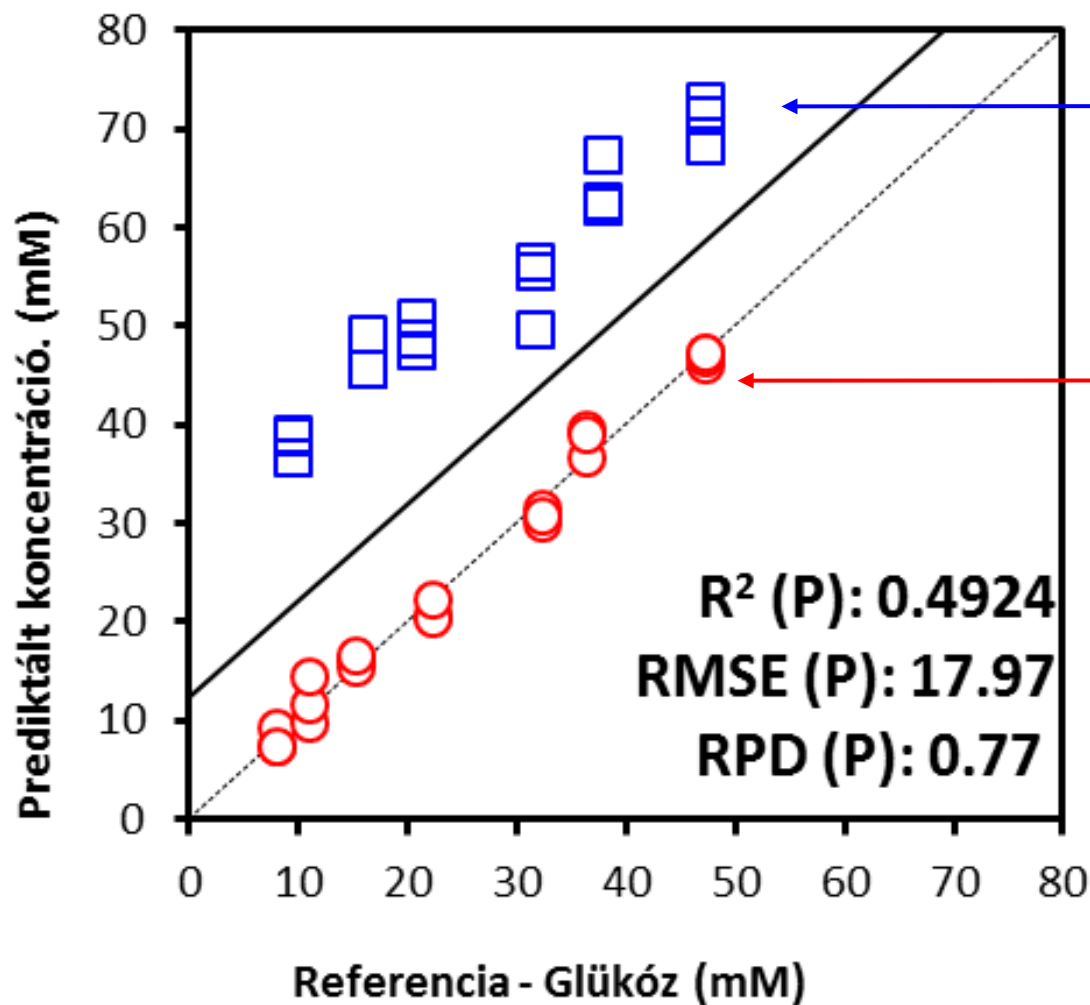


A külön-külön készített kalibrációkból a legjobbkat kiválasztva készítettem a független validálásokat.

Egy gyengébb predikció van, több ok miatt.



Eltérő predikációs képesség



Összefoglalás, kitekintés

- Az FT-NIR alkalmas emlőssejt-tenyészetek glükóztartalmának vizsgálatára.
- A kísérleti rendszer további vizsgálati, kutatási munkát igényel a folyamatszabályozásba való átültetés előtt.
- Lehetőség van más anyagok (pl. egyéb kulcs metabolitok) vizsgálatára hasonló kísérleti rendszerben.

Köszönöm a megtisztelő figyelmüket!

