Berner Fachhochschule
Haute école spécialisée bernoise
Bern University of Applied Sciences

Optisches Monitoring der Stoffwechselaktivität für Zellkulturen,

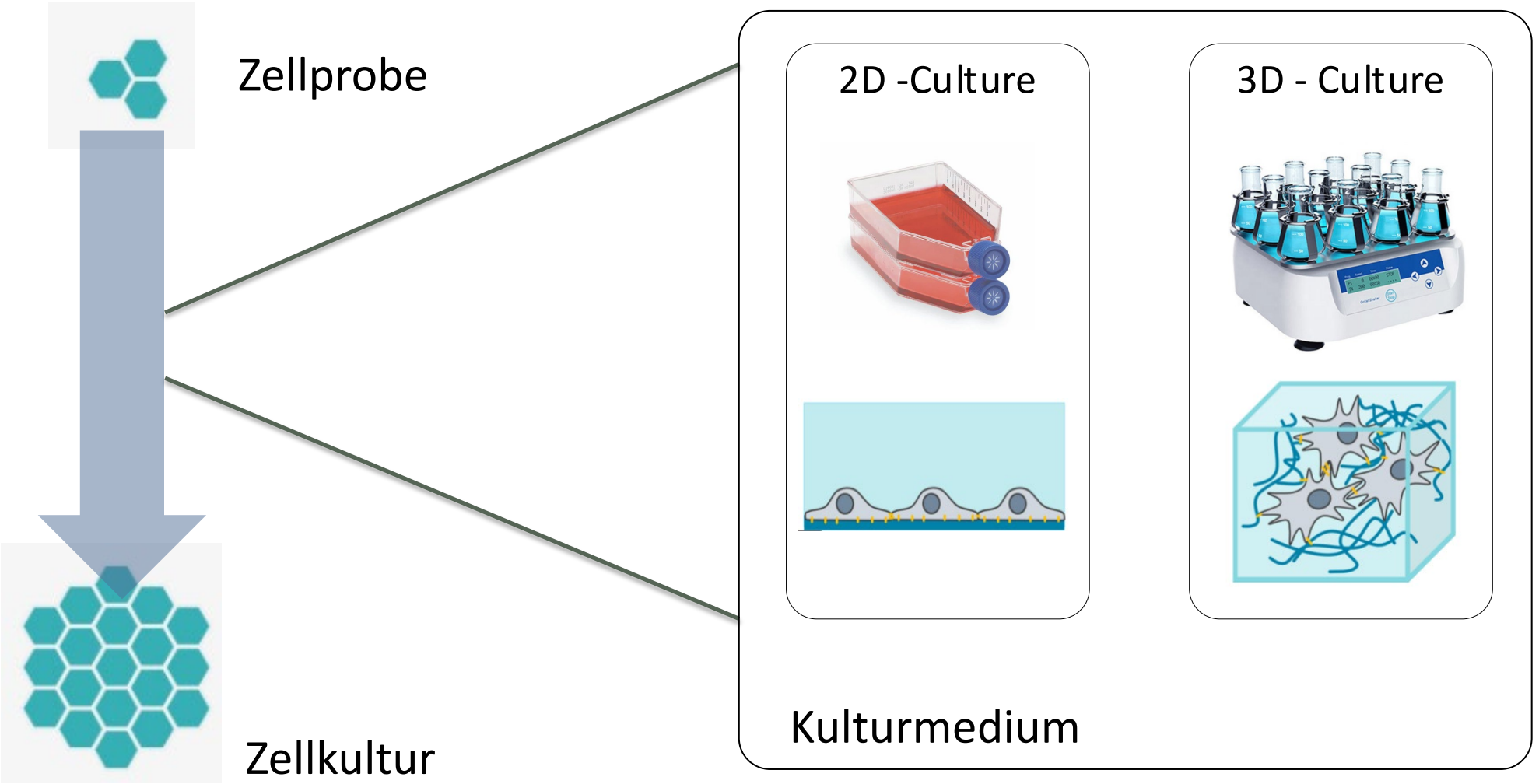
ReasearchXchange Vortrag, 17.12.2021

▸ TI – Institut für Drucktechnologie

Agenda :

- Hintergrund
  - Technologie, Zellkulturen
  - Biologie, Zellatmung
- Aufbau
  - Komponenten
  - Fehleranalyse und Charakterisierung
- Experimente
  - Arbeitsschritte
  - Resultate und Beobachtungen
- Fazit

Hintergrund: Zellkulturen



Source : Google images

Hintergrund: Zellkulturen

- Shaking Flaks Deck 250 [ml]

- Anwendung
  - Forschung
    - Physiologie und Biochemie
  - Medikamentenherstellung
    - Insulin, Penizillin
  - Chemikalien testen

Kontrollierte geregelte Umgebung

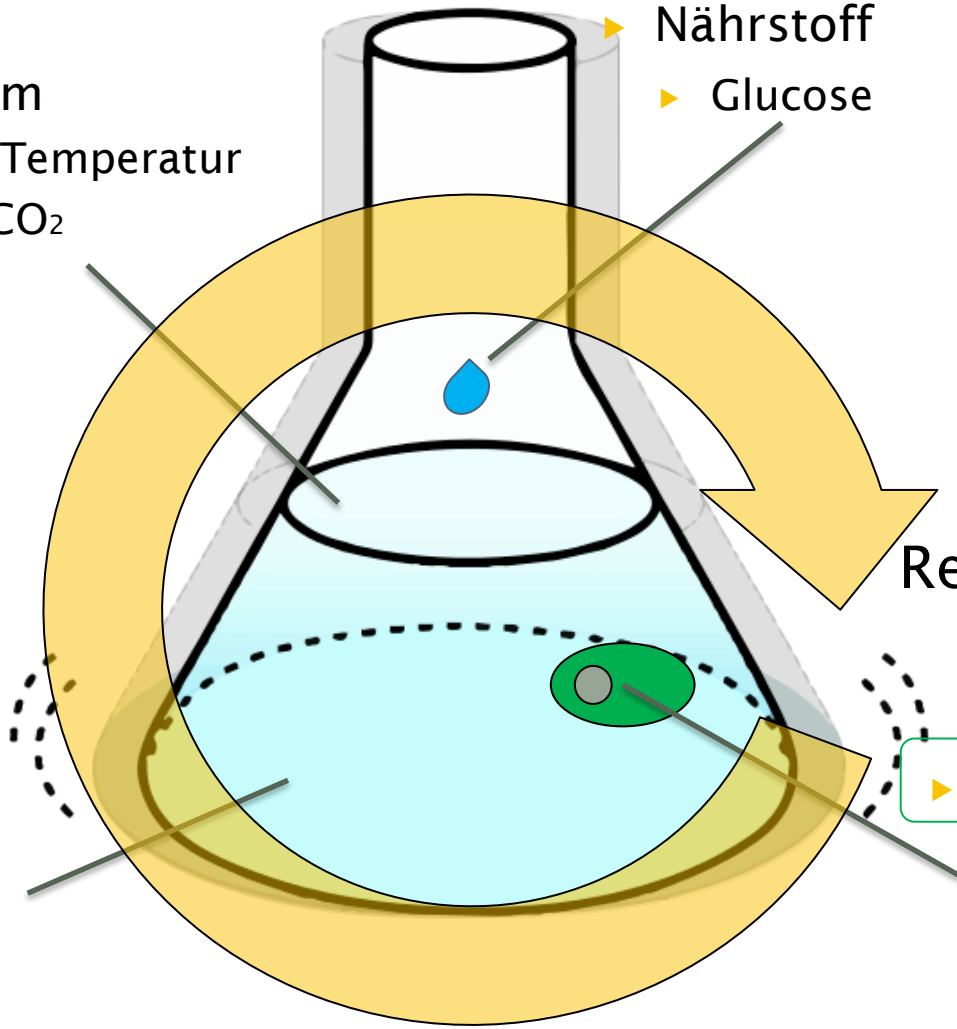
- Culture tubes 50 [ml]

- Bio Reaktors über 200 [Liter]

Source : Google images

Hintergrund: Kontrolle und Regelung

- Kontrollparameter
  - Medium
    - pH, Temperatur
    - O_2, CO_2
  - Nährstoff
    - Glucose



Regelkreis

- Kritische Punkte
  - Sensor in Kontakt mit Zellen
  - Probe entnehmen
    Risiko Kontamination
  - Bewegungen stoppen
  - Zeitliche Verzögerungen

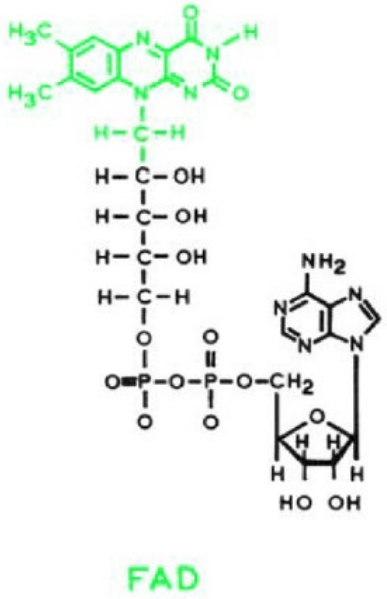
Wir sind hier

- Biomasse, Zählung
  - Viskosität
  - Optische Dichte
  - Mikroskopie
- Stoffwechsel
  - dCO_2, dO_2
  - Metaboliten

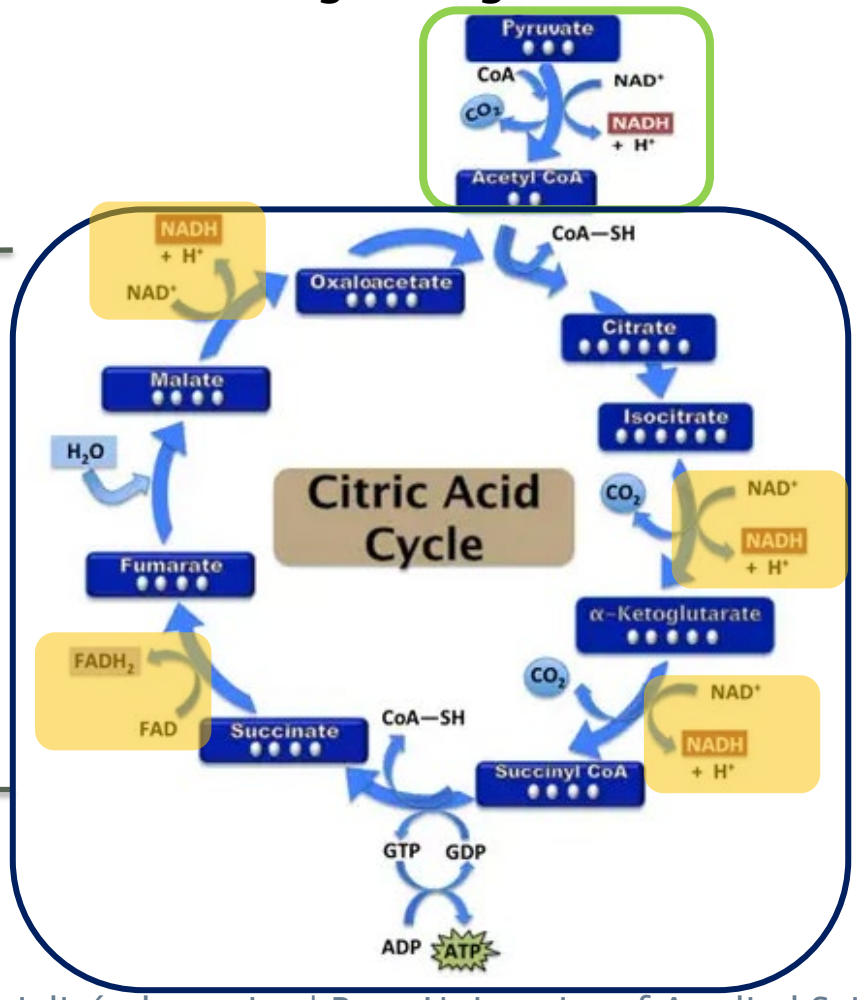
Source : Google images

Hintergrund: Biologie: Zellatmung

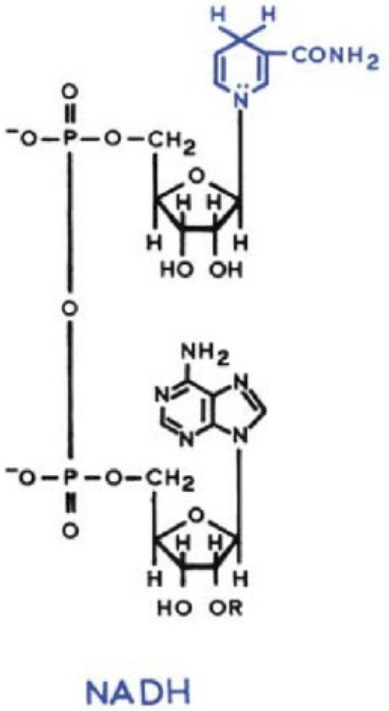
- Stoffwechsel, Zellatmung
  - Biochemische Reaktionen für die Erfüllung biologischer Funktionen. Energie zu erzeugen (ATP).



1x



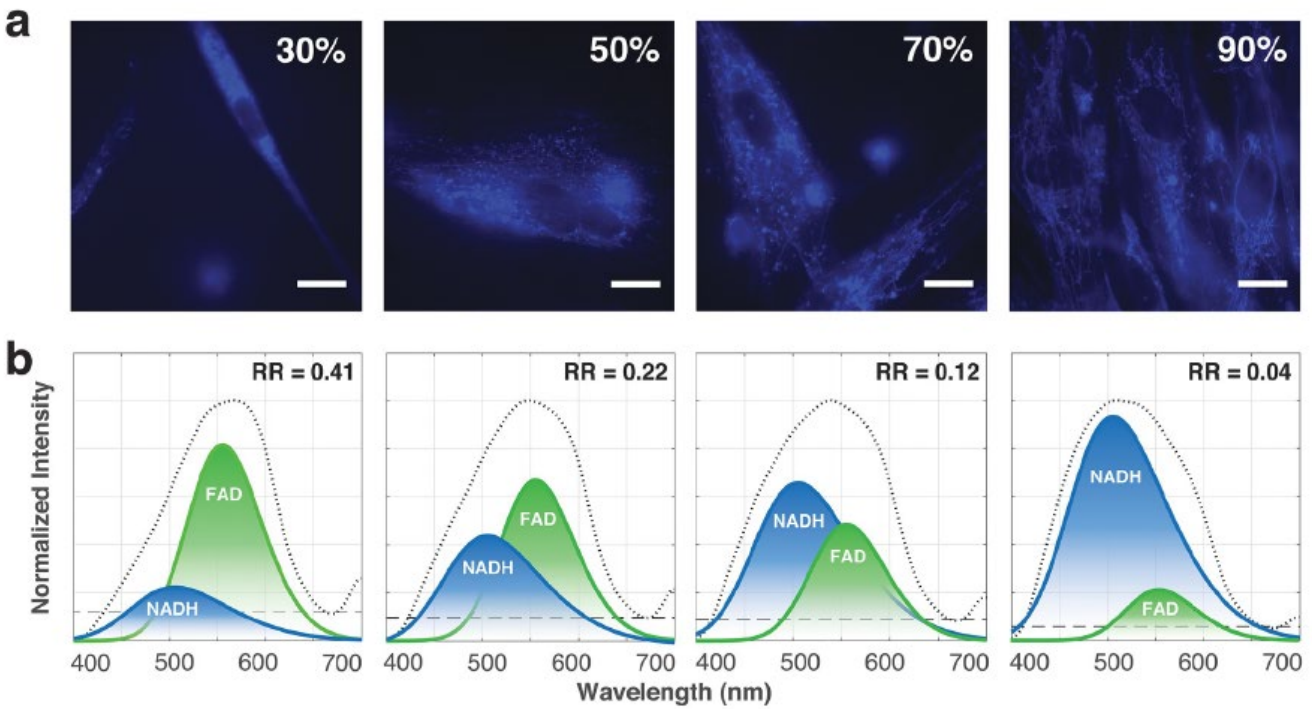
3x



Source : Essential of cell biology 2004 [2]

Hintergrund: Biologie: RR

- Redox Ratio (RR)
  - Verhältnis NADH/FAD,
  - Korreliert mit der Dichte der Biomasse (2D),
  - Stoffwechselaktivität (intern),
  - Zellzyklus abhängig.
  - …



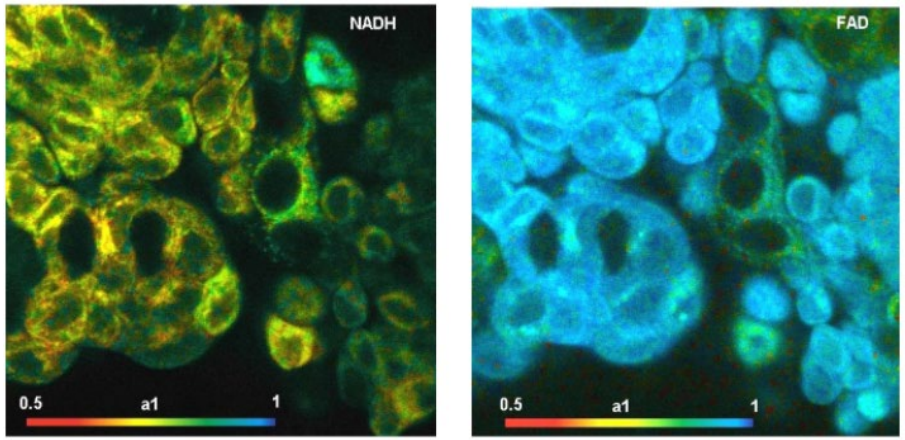
Autofluorescence spectroscopy in redox monitoring across cell confluencies [3]

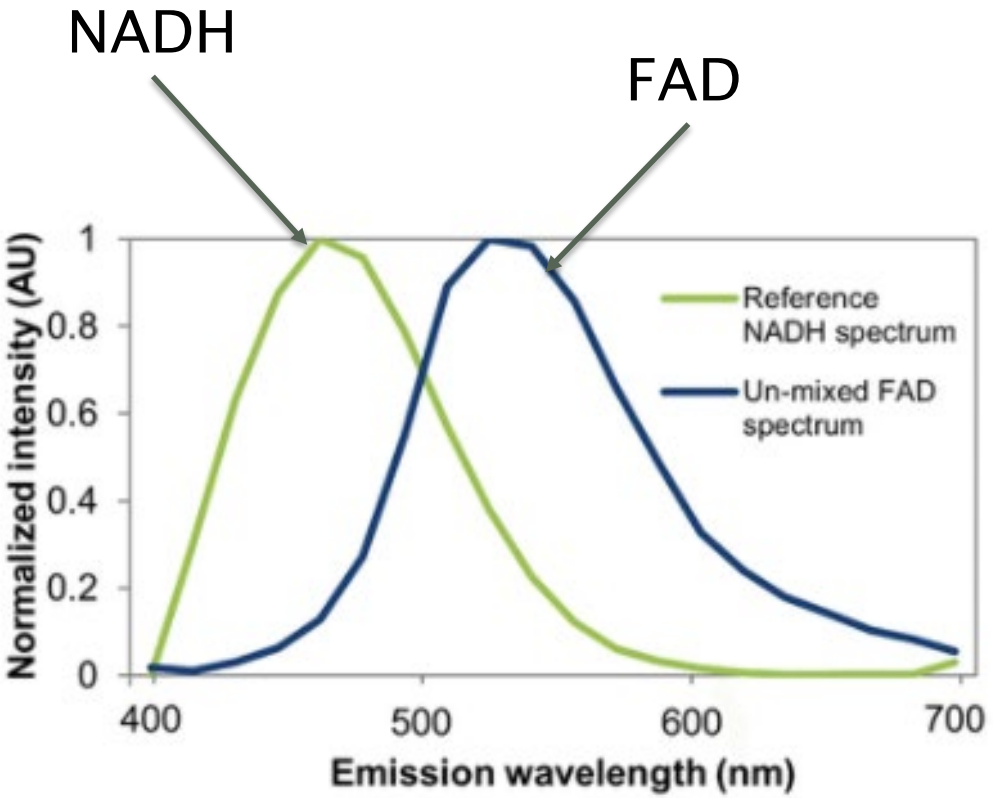
Source : Autofluorescence spectroscopy in redox monitoring across cell confluencies [3]

Hintergrund: Biologie: Fluoreszenz

- NADH : Ex 360 [nm] / Em ~460 [nm]
- FAD : Ex 450 [nm] / Em ~530 [nm]

Anwendungen als Biomarker:
Fluoreszenzmikroskopie

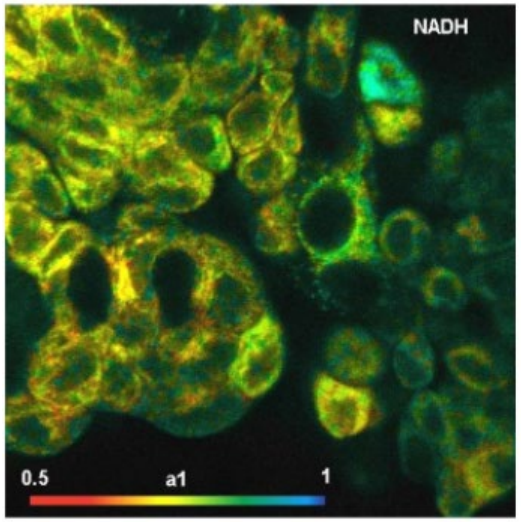


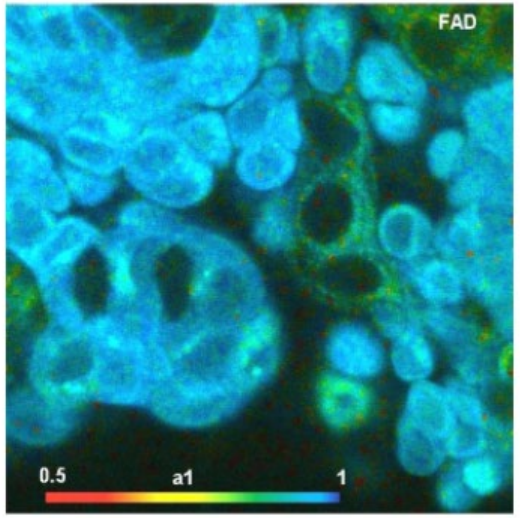


Source : Principals of fluorescence spectroscopy [1]

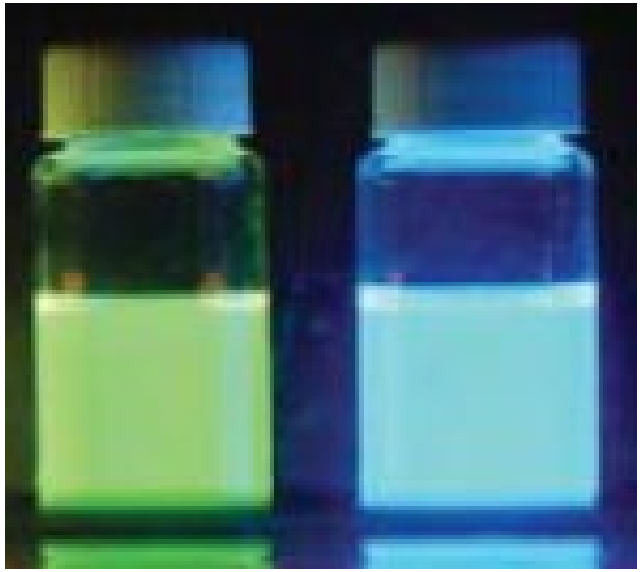
Hintergrund: Ziel der Studie

- Anwendungen
  - Fluoreszenzmikroskopie
  - Detaillierte örtliche Auflösung
  - Beobachtete Zellen $\sim 10^0 - 10^2$
  - 2D Flächen: [um2] bis [mm2]





- Neue Anwendung
  - Kultur Monitoring
  - Volumenmessung
  - Beobachtete Zellen $\sim 10^5 - 10^7$
  - 3D Volumen: [mm3] bis [cm3]



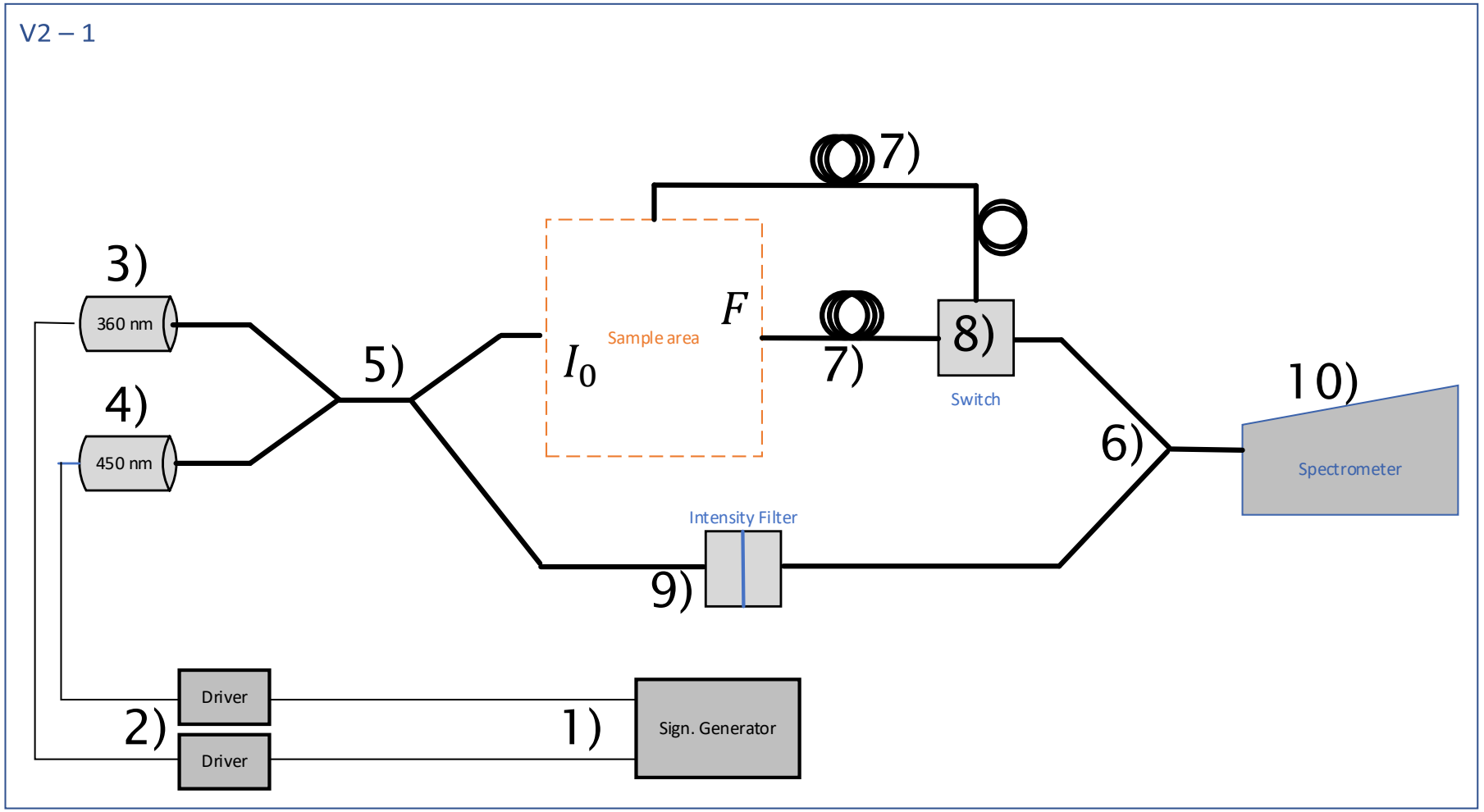
Source : google images.

Studie Aufbau

- Konzept:
  - Fluoreszenzverhalten von NADH /FAD untersuchen.
  - Aufbau charakterisieren (Fehleranalyse).
  - Molekülkonzentrationen aus 1000 [ul] Proben ermitteln.

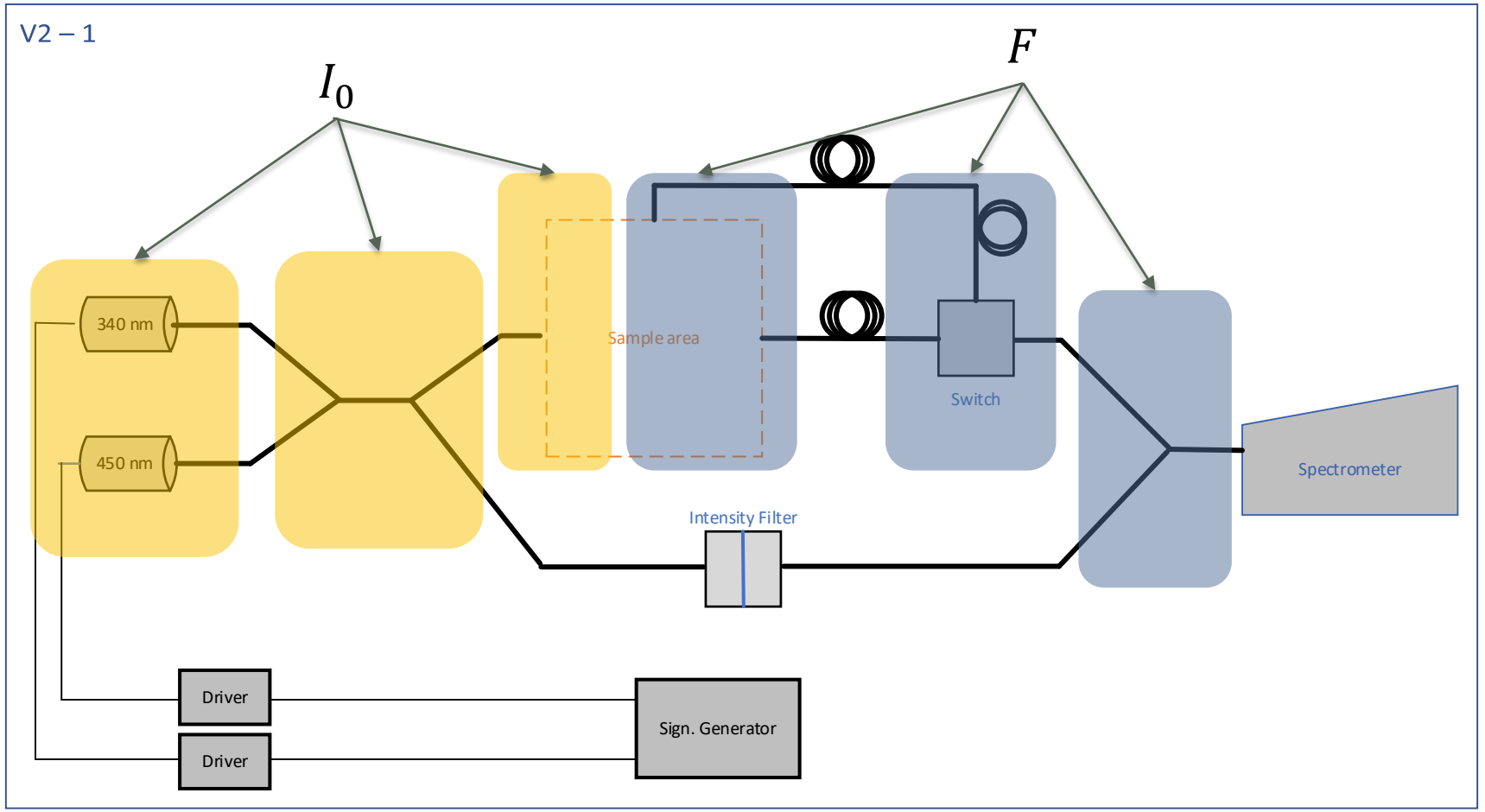
  - Reine Chemikalien verwendet.

Aufbau: Optik (Path)



1) Eingang Signal
2) LED Treiber
3) 360 [nm] LED
4) 450 [nm] LED
5) 2x2 Faserkoppler
6) 2x1 Faserkoppler
7) Glasfaser
8) Optischer Switch
9) Bypass Filter
10) Spektrometer

Aufbau: Optik Fehleranalyse

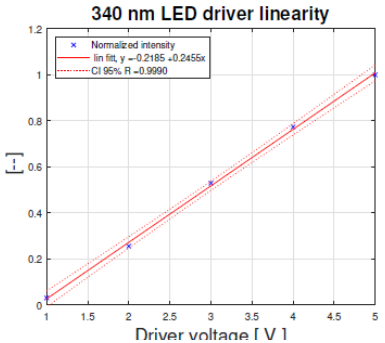


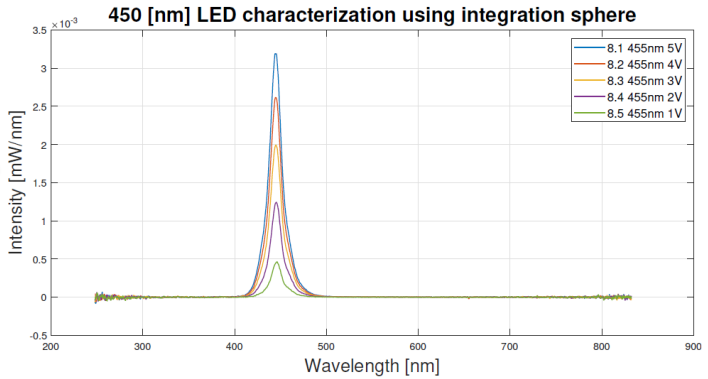
$$F = \phi \cdot I_0 \left(1 - 10^{-\epsilon l c} \right)$$

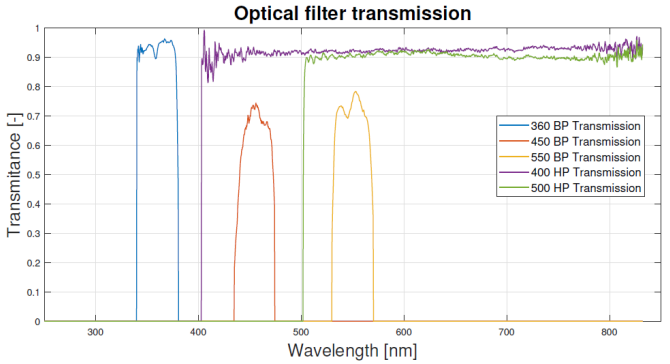
- Fehlerquellen identifizieren
  - Eingang (I_0)
  - Ausgang (F)
  - Probe
- Fehlerquellen charakterisieren

Aufbau: Charakterisierung I_0

- Linearer Arbeitsbereich LED?
  - Messung bei verschiedenen Treiber-parameter
- Verluste durch die Fasern?
  - Ulbricht-Kugel Messung
- Eigenschaften der Filter?
  - Messung der Transmission der Komponenten







- Definiert die optischen Transferfunktionen (TF) der verschiedenen Komponenten.

$$F' = \phi \cdot I'_0 \left(1 - 10^{-\epsilon l c} \right)$$

$$I'_0 = I_0 \cdot TF_1 \cdot TF_2 \cdot \ldots \cdot TF_n$$

$$F' = F \cdot TF_1^{-1} \cdot TF_2^{-1} \cdot \ldots \cdot TF_n^{-1}$$

Aufbau: Charakterisierung *Probe*

- Molekulardichte
  - Molarität

Self absorbtion

(Lambert-Beer)

- Quanteneffizienz
  - Temperatur
  - pH, Umgebung

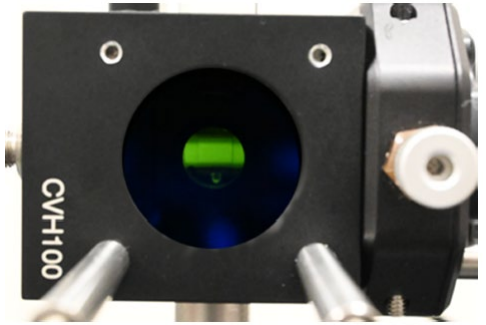
Quenching

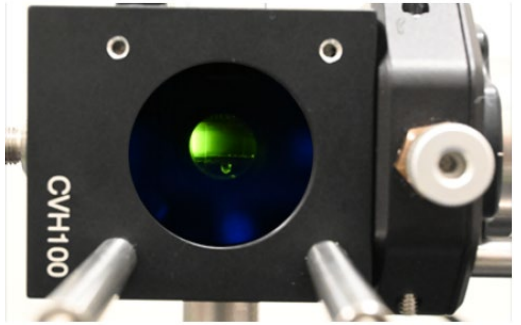
Statisch

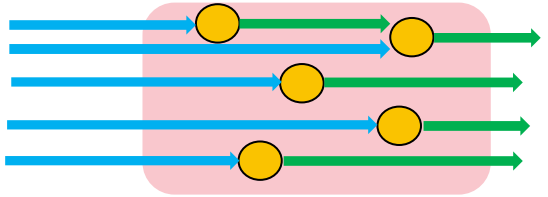
Dynamisch

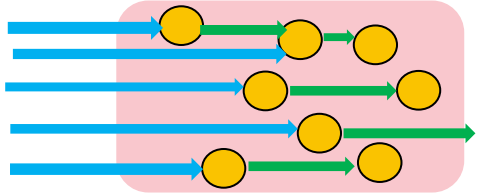
$$\phi(\lambda) = \frac{k_f}{k_f + \sum k_{nf} + k_q[Q]}$$

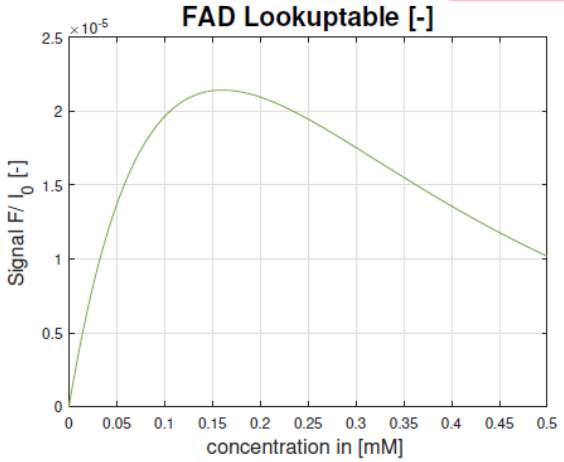
- $S_{FAD} = 0.02\ [mM]$
- $S_{FAD} = 0.5\ [mM]$











Source : S. E. Braslavsky. Glossary of Terms Used in Photochemistry [7].

Aufbau: Charakterisierung

- Eingang: Einflüsse auf I_0
- Ausgang: Einflüsse auf F
- Probe: Einflüsse

charakterisiert

$$F' = \phi \cdot I'_0 \left(1 - 10^{-\epsilon l c} \right)$$

Quanteneffizienz

Extinktionsfaktor

Länge

Konzentration

Experiment !

Experimente

- Pure FAD
  - Max $0.1\ [mM]$
  - Verdünnung 1 -100x

- Pure NADH
  - Max $0.2\ [mM]$
  - Verdünnung 1 -100x

- Mix NADH/FAD
  - 10 Proben bei
    10 verschiedenen RR

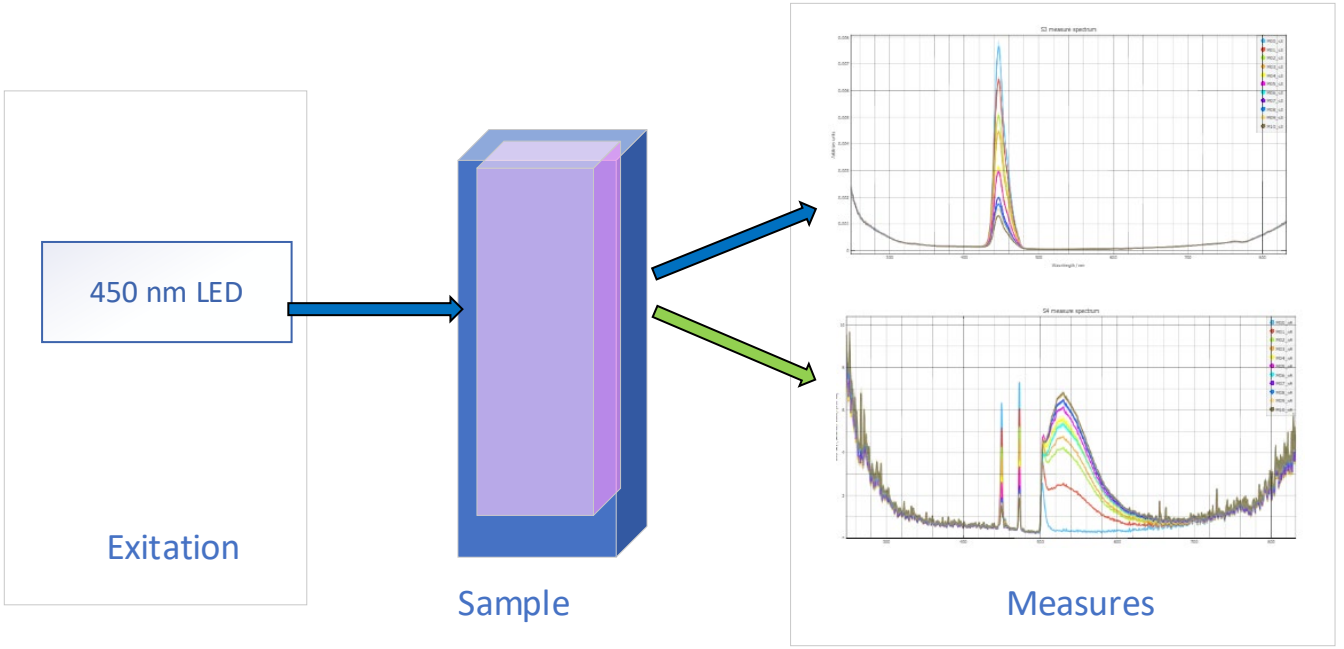
- Ziel:
  - Messverhalten des Aufbau
  - Emissions-/Absorptionsspektrum untersuchen
  - Mathematische Modelle testen:

$$C = f(I_0, F, [TF_1, TF_2, \dots, TF_n])$$

- Ziel:
  - RR trend.
  - Prädiktives Model:
    - FAD
    - NADH

Experimente : FAD

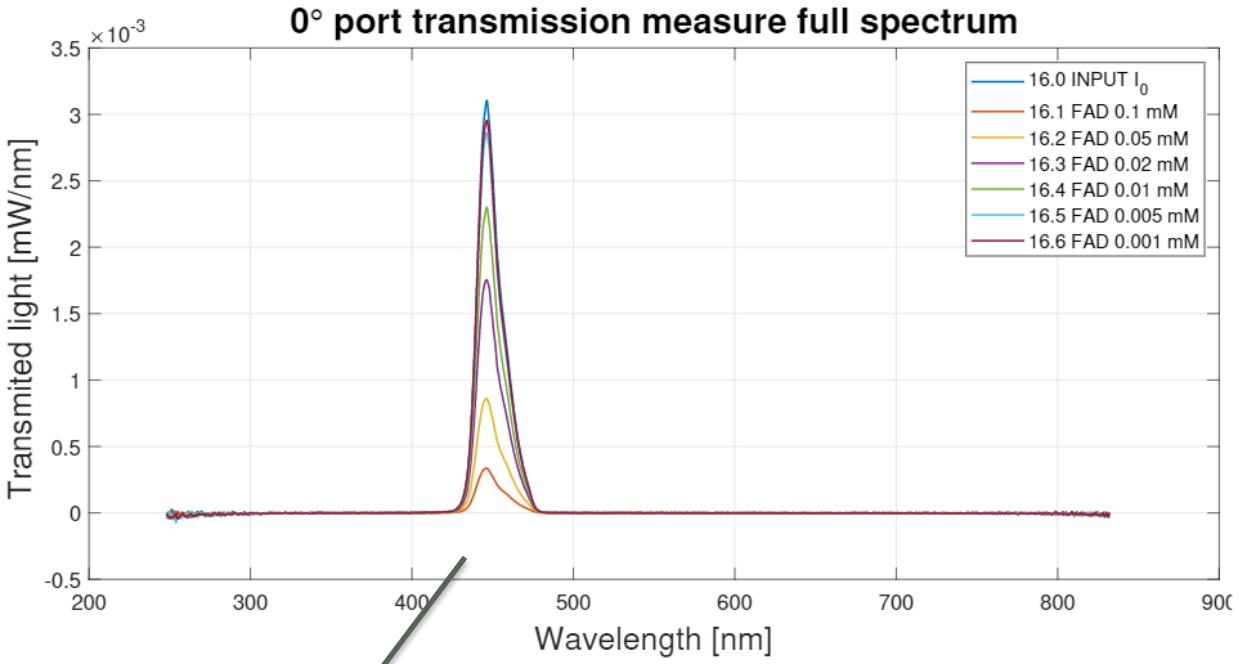
- Pure FAD
  - $0.1\ [mM]$
  - $0.05\ [mM]$
  - $0.02\ [mM]$
  - $0.01\ [mM]$
  - $0.002\ [mM]$
  - $0.001\ [mM]$
- Input Licht 450 [nm]

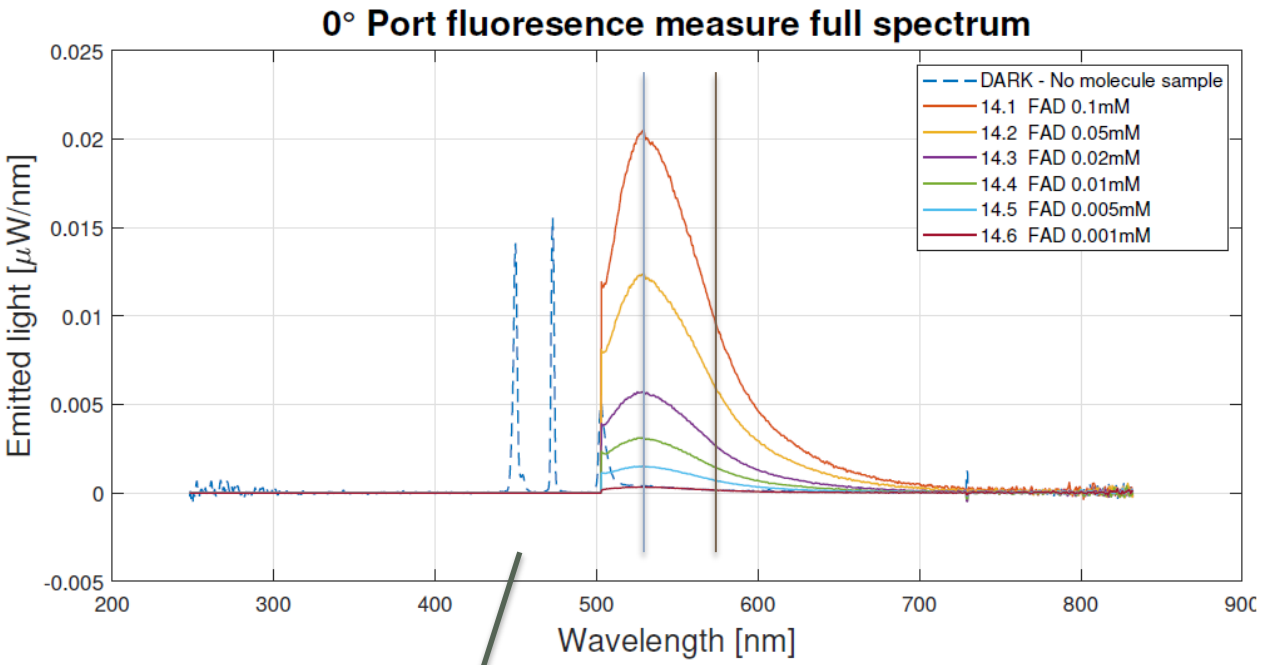


- Transmission
  - Anteil der Eingangs Intensität die nicht durch die Probe kommt.
- Emission
  - Anteil der Eingangs Intensität die in Fluoreszenz umgewandelt wird.

Referenzwerte, vorbereitet mit Microwaage (*Mettler Toledo XP26*)
Volumetrisch verdünnt pipettiert (*Hirschmann pipettor*)

Experiment: FAD





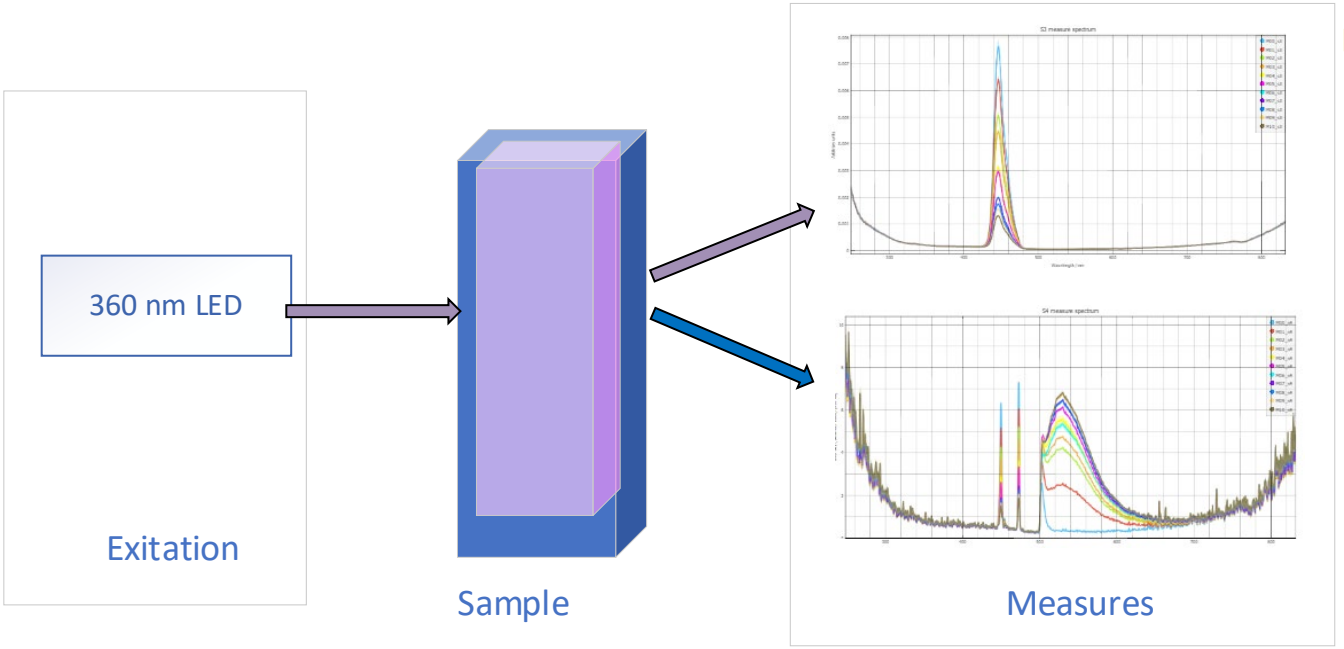
S	β_s
$S_{4.1}$	0.892
$S_{4.2}$	0.723
$S_{4.3}$	0.435
$S_{4.4}$	0.259
$S_{4.5}$	0.0786
$S_{4.6}$	0.0485

Measure	Peak λ [nm]	Intensity [mW]	Half intensity λ	Ratio $\frac{I}{I_0}$
14.1	529	$4.3 \cdot 10^{-3}$	571	0.022
14.2	529	$2.7 \cdot 10^{-3}$	572	0.0137
14.3	529	$1.2 \cdot 10^{-3}$	571	0.0063
14.4	529	$0.66 \cdot 10^{-3}$	571	0.0034
14.5	529	$0.324 \cdot 10^{-3}$	571	0.0017
14.6	525	$0.0719 \cdot 10^{-3}$	570	0.00037

S	Predicted C	Error %
$S_{4.1}$	0.0982	-1.83
$S_{4.2}$	0.0473	-5.35
$S_{4.3}$	0.0187	-6.72
$S_{4.4}$	0.00962	-3.85
$S_{4.5}$	0.000459	-8.1
$S_{4.6}$	0.00996	-0.345

Experiment: NADH

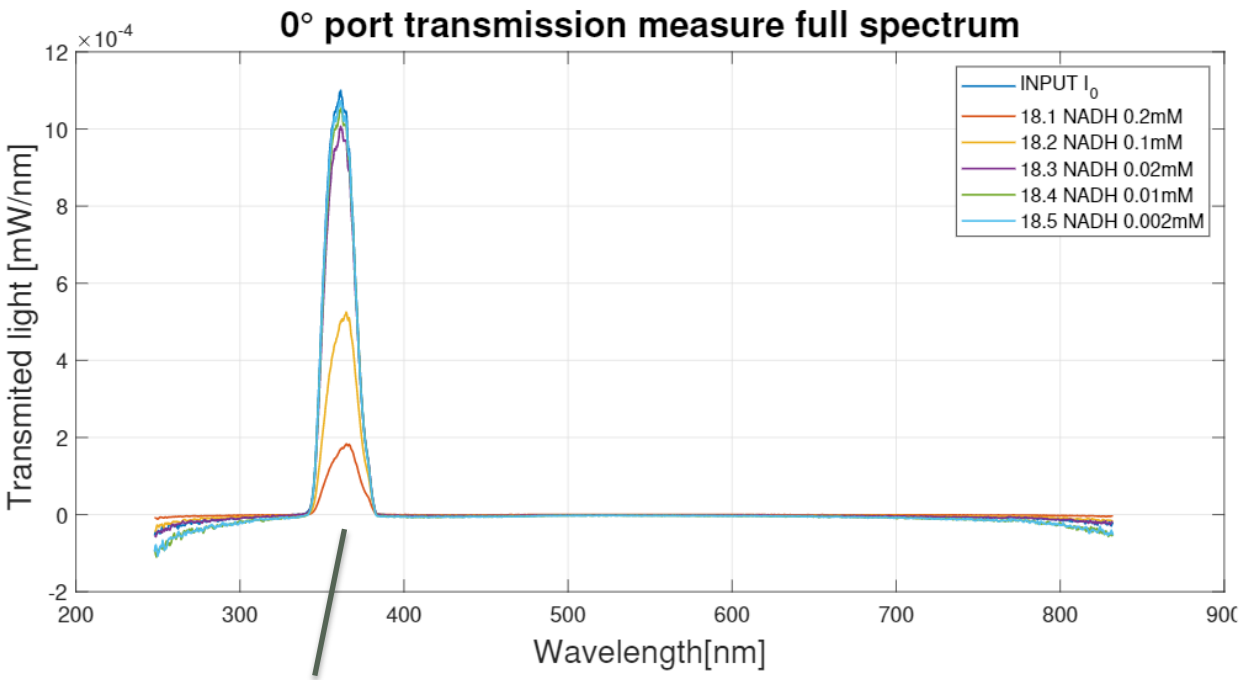
- Pure NADH
  - $0.2\ [mM]$
  - $0.1[mM]$
  - $0.02\ [mM]$
  - $0.01\ [mM]$
  - $0.002\ [mM]$
- Input Licht 360 [nm]

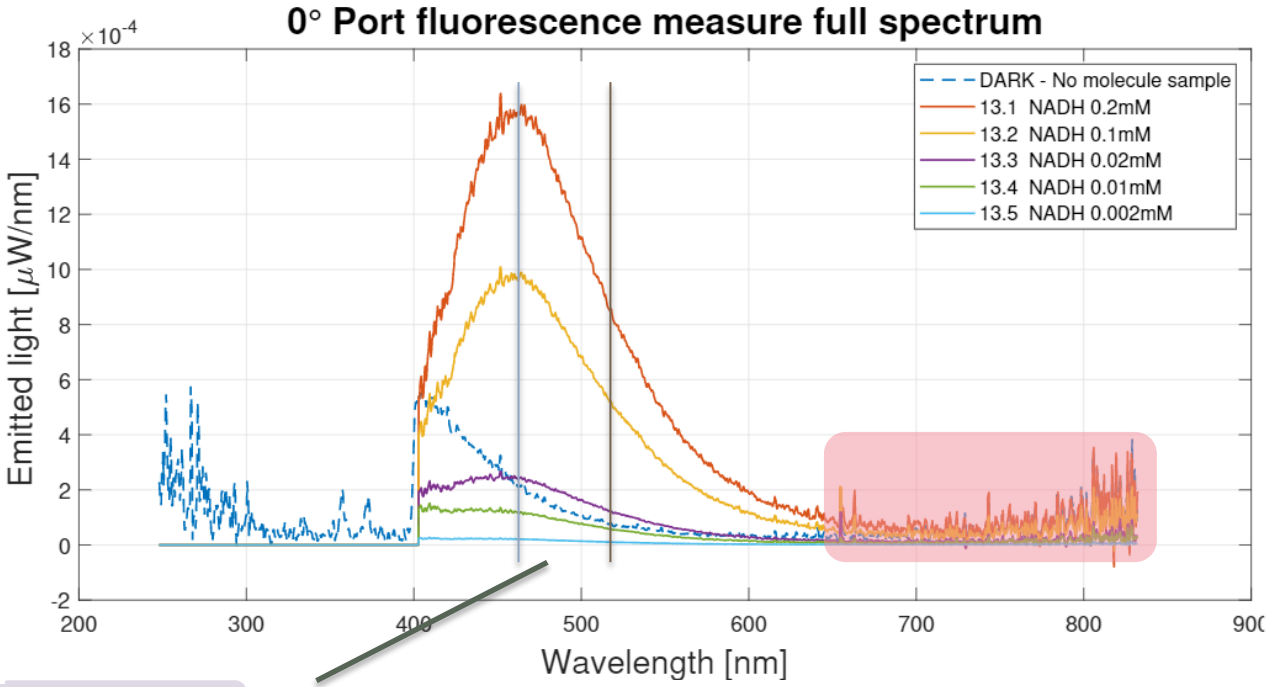


- Transmission
  - Anteil der Eingangs Intensität die nicht durch die Probe kommt.
- Emission
  - Anteil der Eingangs Intensität die in Fluoreszenz umgewandelt wird.

Referenzwerte, vorbereitet mit Microwaage (*Mettler Toledo XP26*)
Volumetrisch verdünnt pipettiert (*Hirschmann pipettor*)

Experiment: NADH





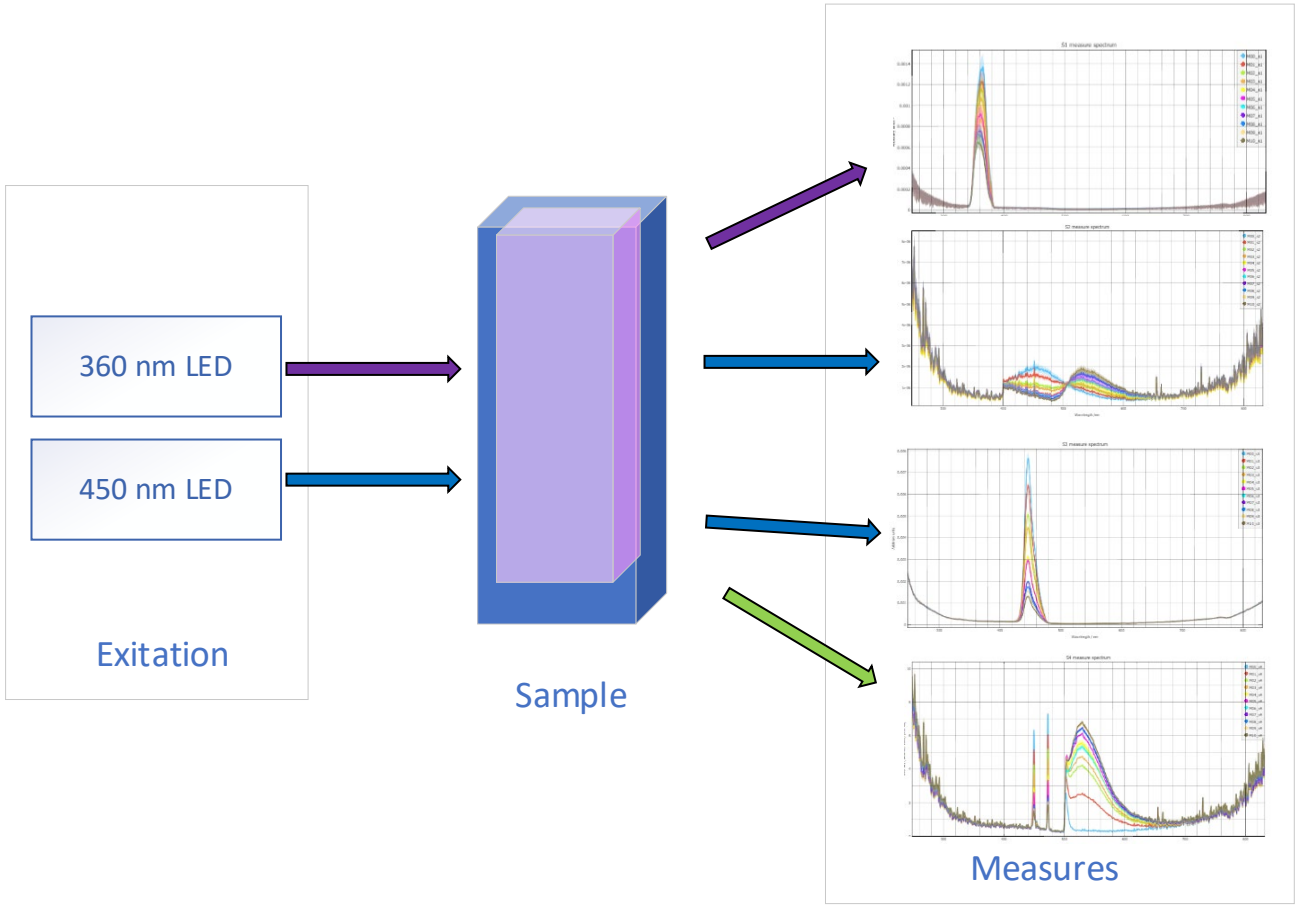
S	β_s
$S_{3.1}$	0.834
$S_{3.2}$	0.528
$S_{3.3}$	0.0847
$S_{3.4}$	0.0429
$S_{3.5}$	0.0245

Measure	Peak λ [nm]	Intensity [mW]	Half Width λ	Ratio $\frac{I}{I_0}$
13.1	452	$0.497 \cdot 10^{-3}$	516	0.014
13.2	452	$0.31 \cdot 10^{-3}$	518	0.0087
13.3	451	$0.08199 \cdot 10^{-3}$	512	0.0023
13.4	450	$0.0421 \cdot 10^{-3}$	509	0.0012
13.5	409	$0.0075 \cdot 10^{-3}$	500	0.000211

S	Predicted C	Error %
$S_{3.1}$	0.1927	–3.633
$S_{3.2}$	0.0920	-7.916
$S_{3.3}$	0.01969	-1.5688
$S_{3.4}$	0.00981	-1.88
$S_{3.5}$	0.00171	-14.53

Experiment: Mix

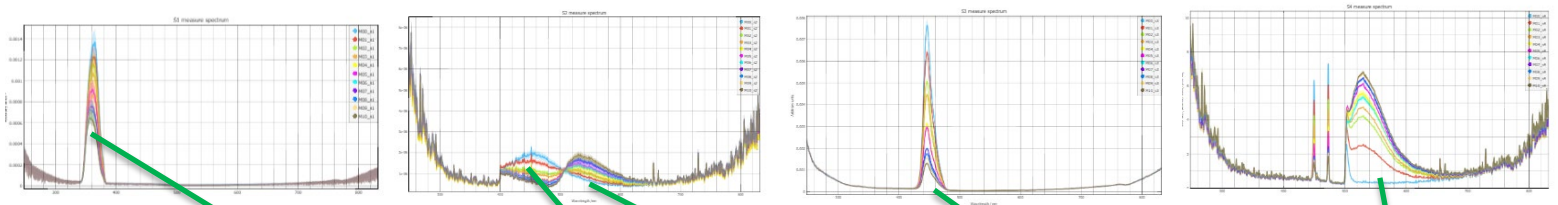
- Mix NADH/FAD
  - $0.1/0.0[mM]$
  - $0.09/0.01[mM]$
  - $0.08/0.02[mM]$
  - $0.07/0.03[mM]$
  - $0.06/0.04[mM]$
  - $0.05/0.05[mM]$
  - $0.04/0.06[mM]$
  - $0.03/0.07[mM]$
  - $0.02/0.08[mM]$
  - $0.01/0.09[mM]$
  - $0.0/0.1[mM]$
- Input Licht
  - 450 [nm]
  - 360 [nm]



Referenzwerte, vorbereitet mit Microwaage (*Mettler Toledo XP26*)
Volumetrisch verdünnt pipettiert (*Hirschmann Pipettor*)

Experiment Mix Data Vorbereitung

- Mix NADH/FAD
  - $0.1/0.0[mM]$
  - $0.09/0.01[mM]$
  - $0.08/0.02[mM]$
  - $0.07/0.03[mM]$
  - $0.06/0.04[mM]$
  - $0.05/0.05[mM]$
  - $0.04/0.06[mM]$
  - $0.03/0.07[mM]$
  - $0.02/0.08[mM]$
  - $0.01/0.09[mM]$
  - $0.0/0.1[mM]$
- Input Licht
  - 450[nm]
  - 360 [nm]



	A	B	D	E	F	G	H	I
1	NAME	NADH [mM]	FAD [mM]	V1 330. - 389.	V2 399.94 - 501.32	V3 502.82 - 627.94	V4 425.25 - 485.54	V5 501.0 - 624.27
2				V1	V2	V3	V4	V5
3	M00	0.1	0	0.001116337	0.000137697	6.34572E-05	0.155309692	5.03993E-05
8	M01	0.09	0.01	0.001044492	0.000127185	7.60301E-05	0.127774184	0.000198704
15	M02	0.08	0.02	0.001210352	0.000117333	0.000105137	0.099055031	0.00031989
16	M02	0.08	0.02	0.001216615	0.000116026	0.000104643	0.099077086	0.000318094
20	M03	0.07	0.03	0.001135371	0.000107706	0.000110235	0.088512182	0.000355147
25	M04	0.06	0.04	0.000979397	8.99564E-05	0.000124938	0.065343646	0.000412874
30	M05	0.05	0.05	0.000951166	9.14646E-05	0.000137201	0.060328619	0.00044043
35	M06	0.04	0.06	0.000741648	8.55604E-05	0.00012993	0.042659523	0.000395381
40	M07	0.03	0.07	0.000782258	7.85293E-05	0.000151419	0.043111278	0.000462169
45	M08	0.02	0.08	0.000734064	7.51357E-05	0.000155334	0.038022655	0.000470294
46	M08	0.02	0.08	0.000734919	7.45168E-05	0.000154749	0.037969474	0.000466825

Y = Proben Infos

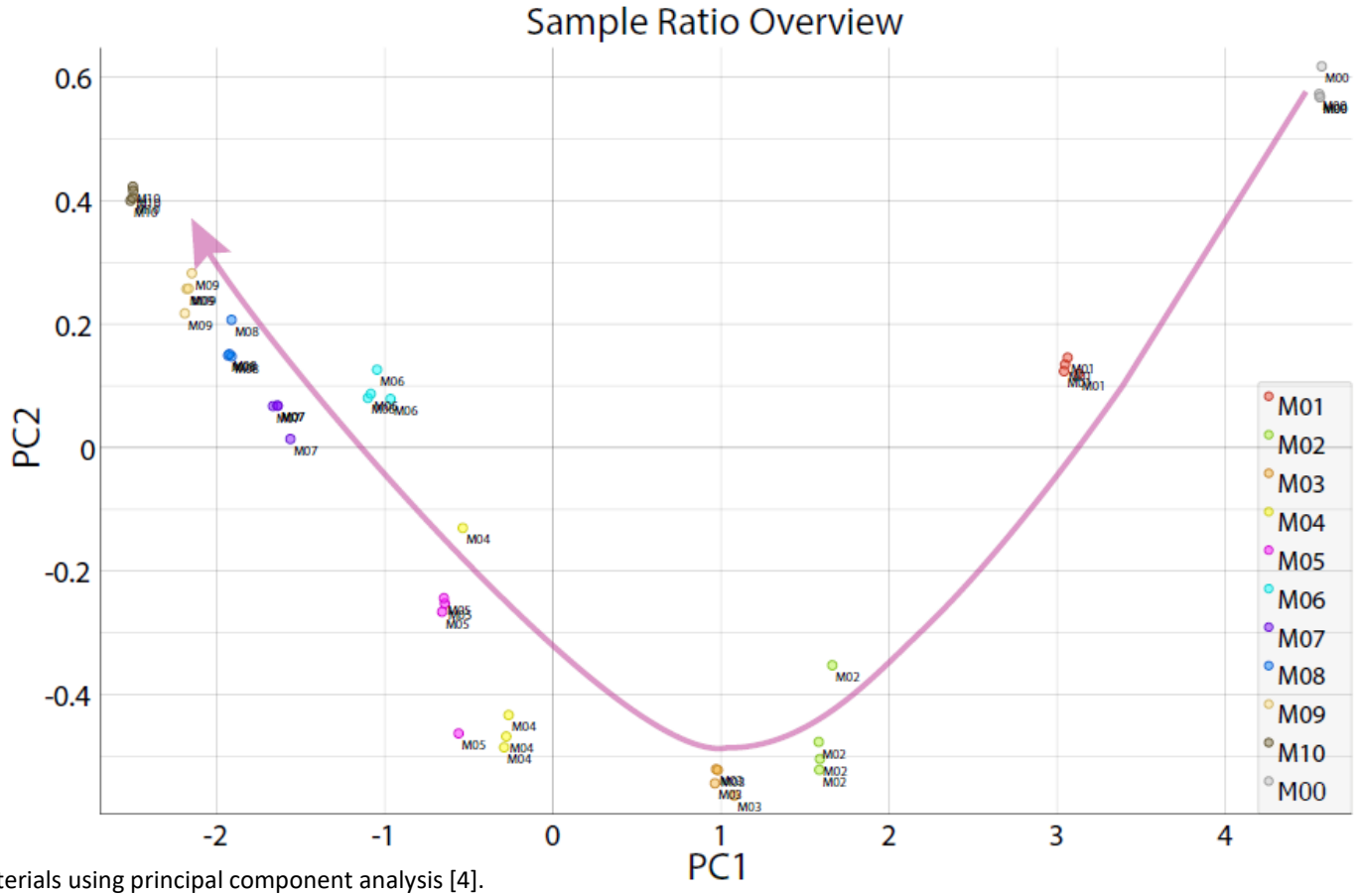
X = Spektral Infos

Endprodukt : 110 x 8 Matrize

Experiment Mix PCA (Principal Component Analyses)

- Mix NADH/FAD
  - M00 = $0.1/0.0[mM]$
  - M01 =$0.09/0.01[mM]$
  - M02 =$0.08/0.02[mM]$
  - M03 = $0.07/0.03[mM]$
  - M04 = $0.06/0.04[mM]$
  - M05 = $0.05/0.05[mM]$
  - M06 = $0.04/0.06[mM]$
  - M07 =$0.03/0.07[mM]$
  - M08 =$0.02/0.08[mM]$
  - M09 = $0.01/0.09[mM]$
  - M10 = $0.0/0.1[mM]$
- Input Licht
  - 450[nm]
  - 360 [nm]

- PCA :
  - Verhaltensmuster in Daten identifizieren:
  - Projektion von multidimensionalen Daten auf kleinere Dimensionen (PC1 /PC2)

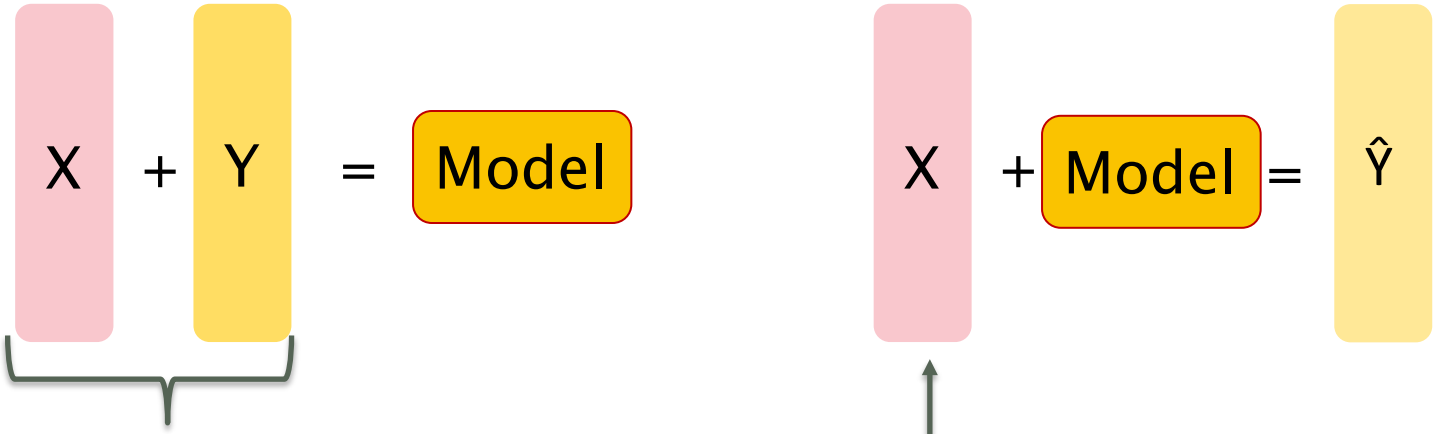


Source : Prediction of emission spectra of fluorescence materials using principal component analysis [4].

Experimente Mix PLSR (Partial Least Square Regression)

- Mix NADH/FAD
  - Datenset aus verschiedenen Mischungsverhältnissen
  - $M00 = [V_1, V_2, \dots, V_5]$
  - $M01$
  - $M02$
  - $M03$
  - $\dots$
  - Mnn
  - $Y \quad = \quad X$

- PLS :
  - Auf PCA basierte Regressionsmethode



Training Set (Random)

Aus ≥ 5 verschiedenen Konzentrationen

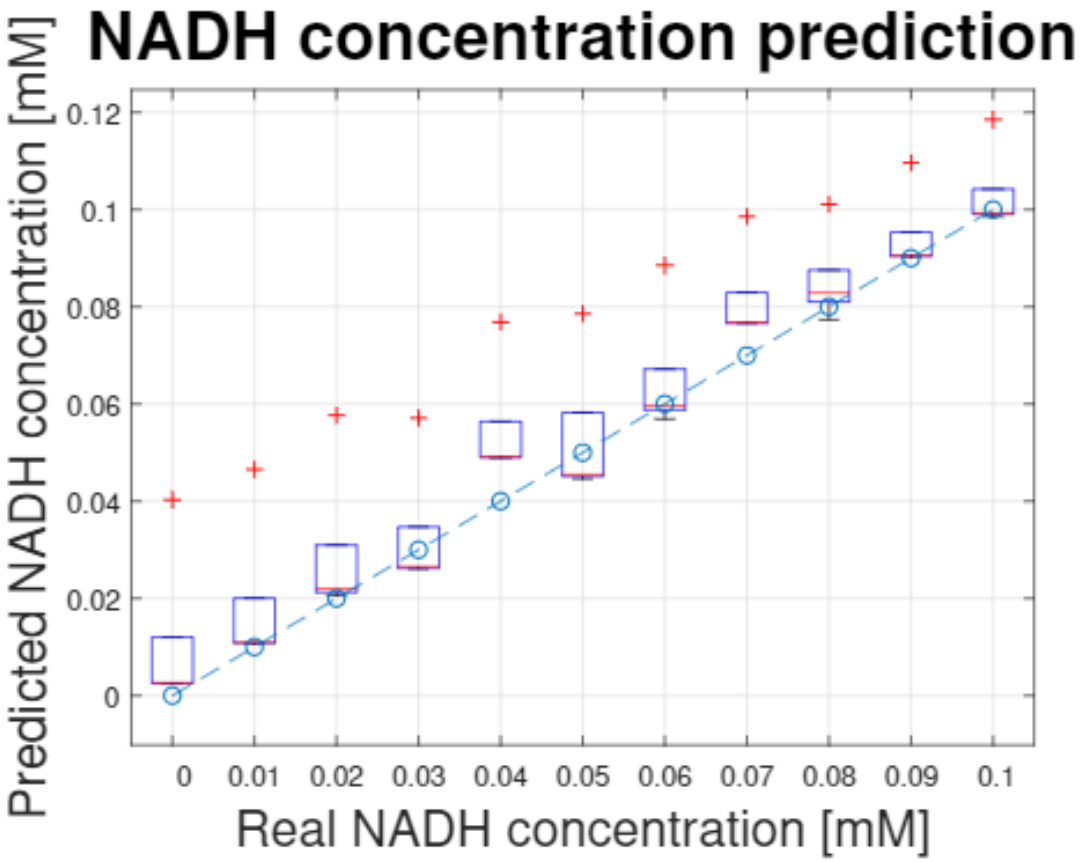
Validation Set (Random)

Aus ≥ 10 verschiedenen Konzentration

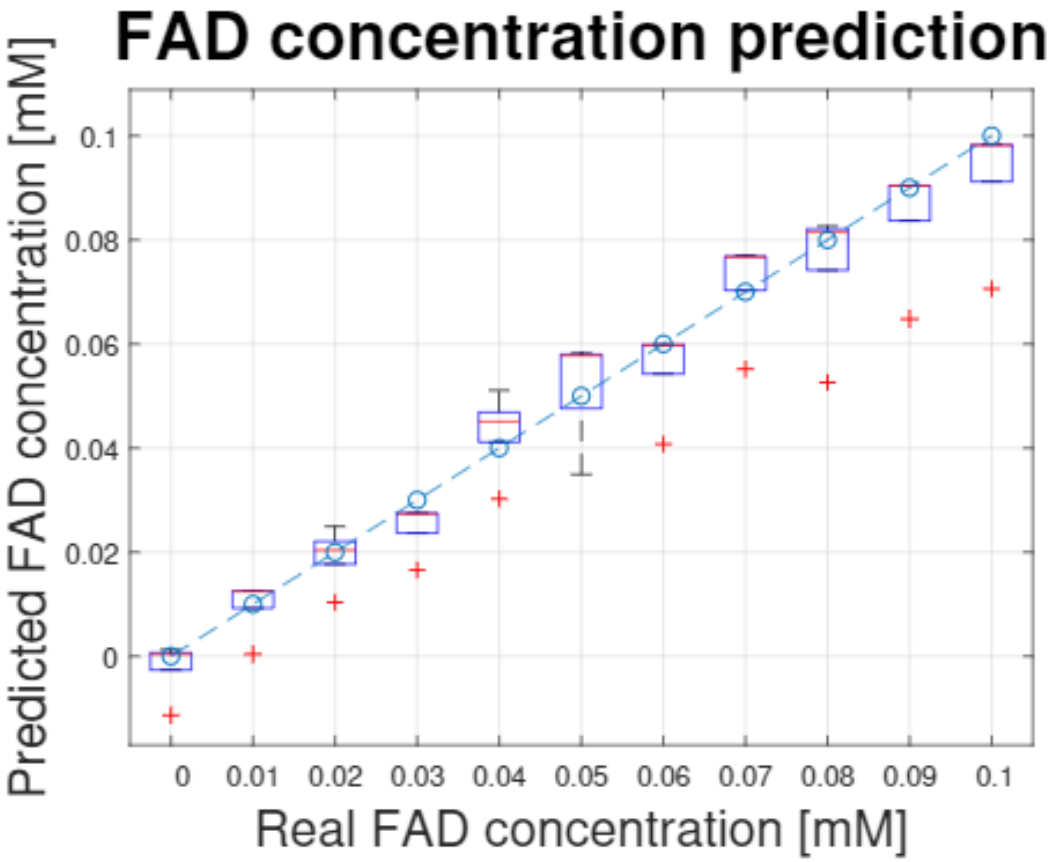
Source : Orange: Data mining toolbox in python. Journal of Machine Learning Research [5].
Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. Journal of Sensors and Sensor Systems [6].

Experiment Mix PLSR (Partial Least Square Regression)

Model 1 : NADH



Model 2 : FAD



Source : Orange: Data mining toolbox in python. Journal of Machine Learning Research[5].

Fazit

- Output:
  - Optischer Messstand für NADH / FAD Fluoreszenz.
  - Charakterisierung des Aufbaus (Messung der Komponenten).
  - Untersuchung der Emission von NADH und FADH.
  - Tendenzen von verschieden RR Proben untersucht.
  - Herstellung von prädiktiven Modellen für NADH und FAD.

Voilà

Questions

Source : google images

Sources

[1]: J. R. Lakowicz and B. R. Masters. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, volume 13. SPIE-Intl Soc Optical Eng, 2008.

[2]: B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. D. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. essentials of cell biology. Garland Publishing, 2004.

[3]: D. Yong, A. A. A. Rahim, C. S. Thwin, S. Chen, W. Zhai, and M. W. Naing. Autofluorescence spectroscopy in redox monitoring across cell confluencies. PLOS ONE, 14(12):e0226757, dec 2019.

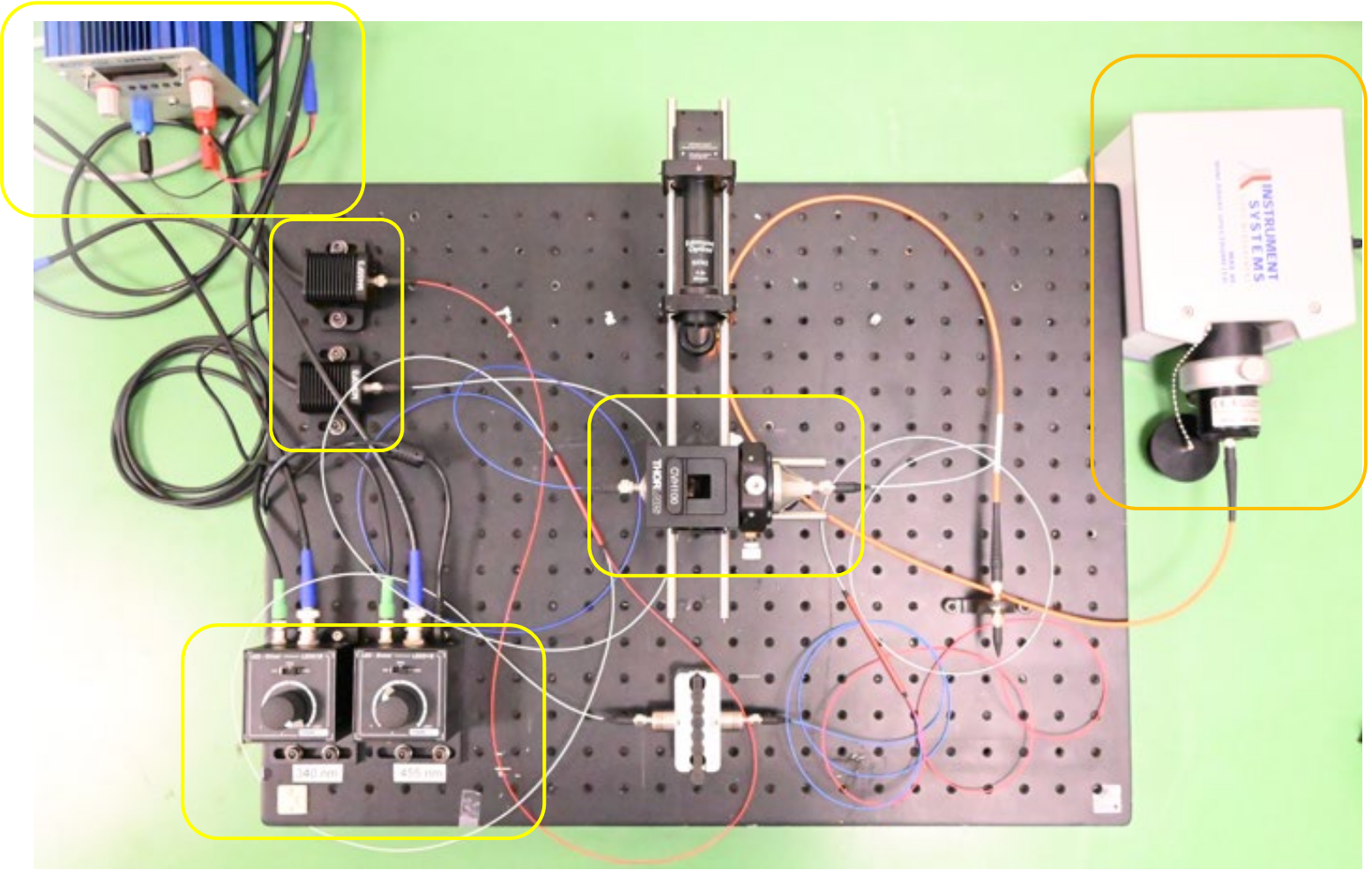
[4]: A. Shams-Nateri and N. Piri. Prediction of emission spectra of fluorescence materials using principal component analysis. Color Research & Application, 41(1):16–21, apr 2015.

[5]: J. Demšar, T. Curk, A. Erjavec, Crt Gorup, T. Hocevar, M. Milutinovic, M. Možina, M. Polajnar, M. Toplak, A. Staric, M. Štajdohar, L. Umek, L. žagar, J. žbontar, M. žitnik, and B. Zupan. Orange: Data mining toolbox in python. Journal of Machine Learning Research, 14:2349–2353, 2013

[6]: J. C. König, T. Steinwedel, D. Solle, P. Lindner, I. de Vries, T. Hentrop, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper, and S. Beutel. Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. Journal of Sensors and Sensor Systems, 7(2):461–467, aug 2018.

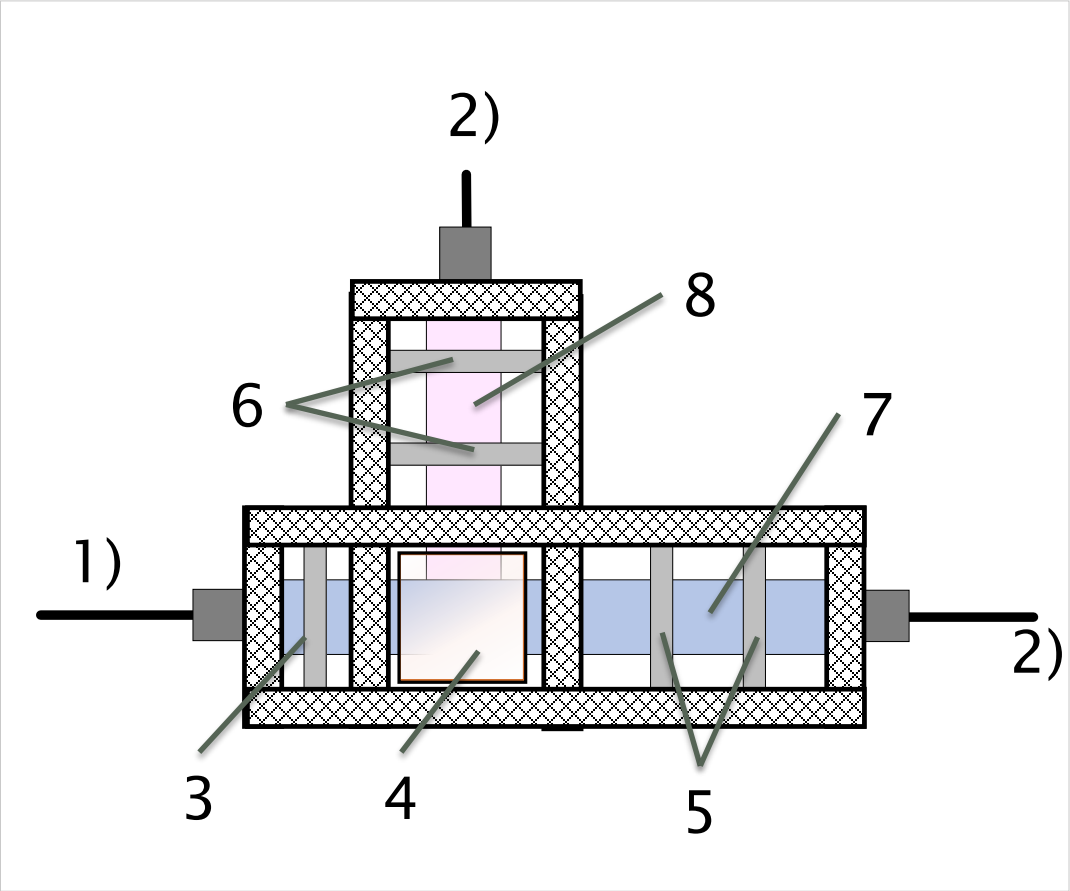
[7]: S. E. Braslavsky. Glossary of Terms Used in Photochemistry, 3rd Edition, pages 406– 407. De Gruyter, mar 2016

Setup und Aufbau : Charakterisierung



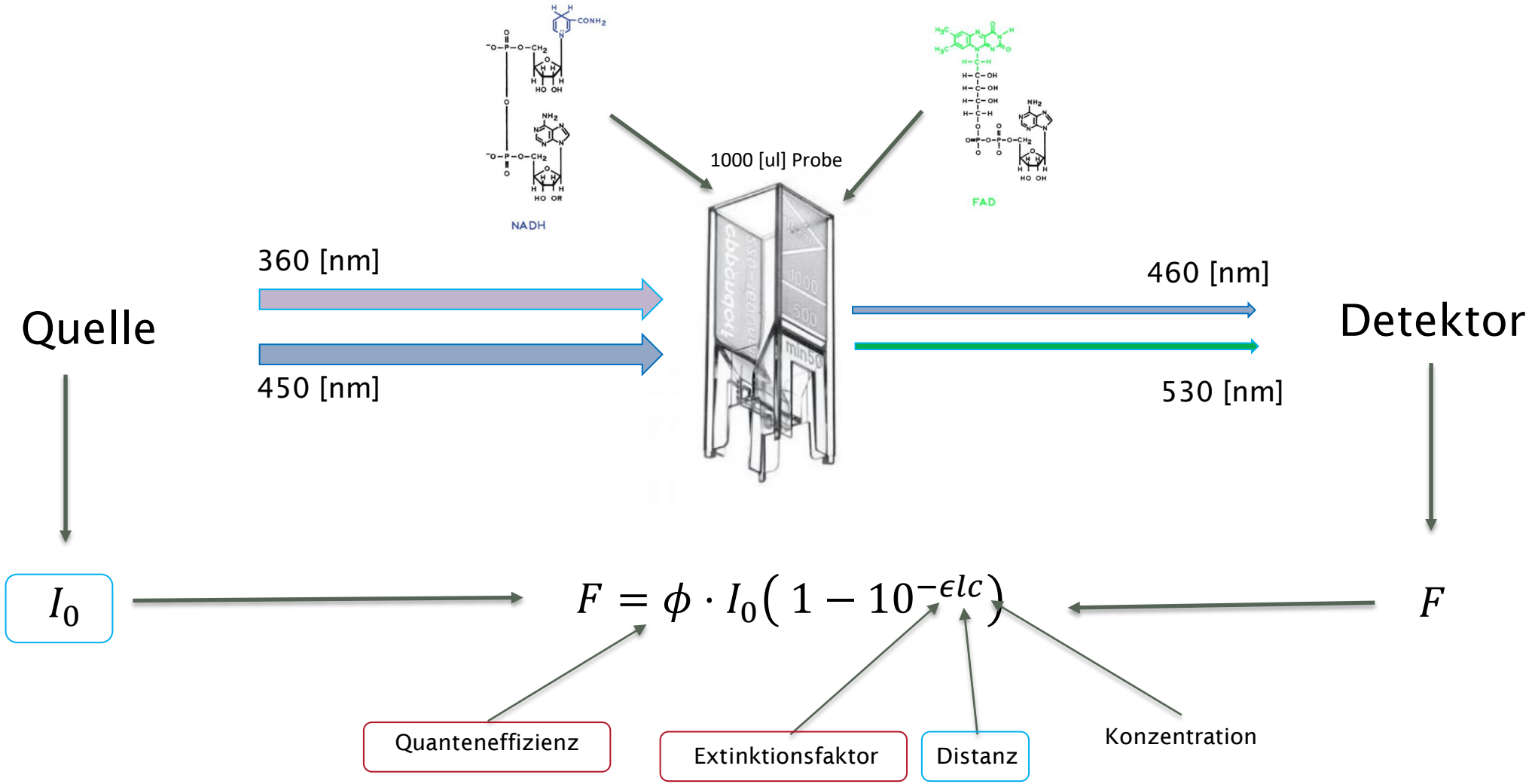
- Charakterisiertes Input Licht Verhalten (I_0)
- Optische Komponenten sind gemessen (TF)
- Mechanisch untersucht (Misalignment)
- Output Signal charakterisiert (F)
- Sample Dichte (min/max)
- …

Setup und Aufbau : Optik (Probe)



1) Input Linse
2) Output Linsen
3) Input Filter
4) Probe Küvette
5) Output Filter 1& 2
6) Output Filter 3 & 4
7) 0° Lichtstrahl
8) 90° Lichtstrahl

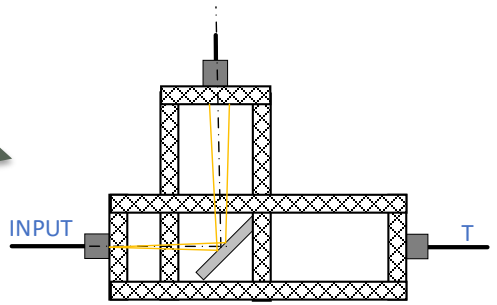
Setup und Aufbau : Grobkonzept

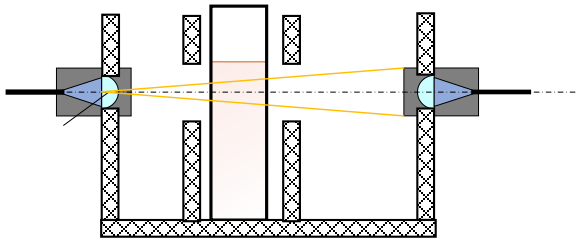


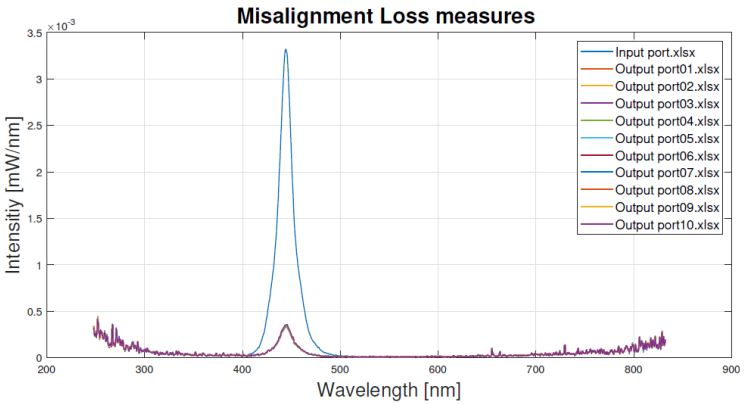
Source : Principals of fluorescence spectroscopy [1].

Setup und Aufbau : Charakterisierung F

- Mechanische Verluste (90° -0°)
  - Ausrichtungsfehler
  - Wiederholbarkeit (statistisch)
- Linsen
  - Fokusverschiebung, Position.
- Küvette
  - Oberflächenreflexion.
- Sensoreffizienz
  - Spektrometeroptik







$$F' = \phi \cdot I'_0 \left(1 - 10^{-\epsilon l c} \right)$$

$$F' = F \cdot TF_1 \cdot TF_2 \cdot \ldots \cdot TF_n$$