Otkrivanje i važnost retrovirusne reverzne transkriptaze u staničnim kulturama

Kutle, Leonida

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085344

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Leonida Kutle

OTKRIVANJE I VAŽNOST RETROVIRUSNE REVERZNE TRANSKRIPTAZE U STANIČNIM KULTURAMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014

Ovaj je doktorski rad izrađen u Imunološkom zavodu d.d., pod vodstvom prof. dr. sc. Renate Mažuran, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Renati Mažuran prvenstveno na velikom strpljenju koje je imala za mene pri izradi ovog doktorskog rada, i također za sve znanstveno-istraživačke, profesionalne i ljudske poticaje koje mi je pružala. Hvala za sva usmjeravanja, za sve poduke, kritike i sve ono ostalo što je doprinijelo kvaliteti ovog rada. Prošle smo zajedno dug i ponekad vrlo grbav put do trenutka u kojem ovo pišem i jednostavno želim reći jedno veliko, toplo, iz dna srca – HVALA!

Zahvaljujem se također svima u bivšem Odsjeku za molekularnu biomedicinu koji su me prihvatili široka srca u svoje laboratorije, hvala za sve savjete i sugestije, za sve uzorke, za sve… najbolji ste kolege koje čovjek može poželjeti!

Zahvaljujem se i svima u bivšem Odsjeku za imunologiju i biokemiju s kojima sam fantastično surađivala, hvala za sve savjete i sugestije, za svu potporu, bez vas ne bih uspjela završiti ovaj rad!

Zahvaljujem se i svim kolegicama i kolegama u Imunološkom zavodu koji su mi davali uzorke i podupirali u radu, posebno dragim kolegicama s virusne kontrole koje sam najviše opsjedala!

Na kraju, zahvaljujem se cijeloj mojoj obitelji – prvenstveno mom najdražem mužu i sinu što su imali strpljenja „dok mama radi za veliku školu“ i za svu ljubav i potporu koju mi daju! Zahvaljujem se i mojim dragima mami i tati koji me vole najviše na svijetu i koji uvijek vjeruju u mene, a i koji su zbog mog naukovanja financijski najlošije prošli! Hvala!

Leonida Kutle

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

OTKRIVANJE I VAŽNOST RETROVIRUSNE REVERZNE TRANSKRIPTAZE U STANIČNIM KULTURAMA

LEONIDA KUTLE
Imunološki zavod d.d., Rockefellerova 10, Zagreb

Enzim reverzna transkriptaza (RT) sastavni je dio svih retrovirusa i mjerenjem njene aktivnosti može se dokazati prisutnost retrovirusa u biološkim materijalima. Test eng. *Product Enhanced Reverse Transcriptase* (PERT) vrlo je osjetljiv test kojim se mogu detektirati vrlo niske koncentracije RT u uzorku. Kako bi test bio regulatorno prihvatljiv, potrebno je uvesti standard kao što je RT virusa ptičje mijeloblastoze. Svi testirani uzorci porijeklom s pilećeg supstrata sadrže aktivnost RT, odnosno retrovirusne čestice. Aktivnost RT otkrivena je i u uzorcima diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura, te u mediju za rast i održavanje stanica s fetalnim goveđim serumom. Detektirana aktivnost RT ne potječe od infektivnih retrovirusnih čestica, budući da nema porasta aktivnosti RT u indikatorskim staničnim kulturama niti negativno utječe na miševe i zamorčad u testu opće neškodljivosti. Istražen je utjecaj različitih uvjeta proizvodnje cjepiva na pojavnost endogenih retrovirusa u proizvodnoj staničnoj kulturi. Kromatografijom na monolitnim nosačima moguće je koncentrirati i endogene retrovirusne čestice i molekule RT.

(133 stranice, 53 slike, 37 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: endogeni retrovirusi, PERT-test, SPF-jaja, živa virusna cjepiva, kromatografija, monolitni nosači, CIM-diskovi
Mentorica: prof. dr. sc. Renata Mažuran
Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Dijana Škorić
dr. sc. Snježana Židovec Lepej
dr. sc. Dubravko Forčić

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

DETECTION AND SIGNIFICANCE OF RETROVIRAL REVERSE TRANSCRIPTASE PRESENT IN CELL CULTURES

LEONIDA KUTLE

Imunološki zavod d.d., Rockefellerova 10, Zagreb

The enzyme reverse transcriptase (RT) is a part of all retroviruses, and the presence of retroviruses in biological samples can be detected by measuring RT's activity. Product Enhanced Reverse Transcriptase (PERT) test is a very sensitive assay for detection of low concentrations of RT in a sample. To make the assay regulatory acceptable, a standard like avian myeloblastosis virus RT should be included. All of the samples originated from chicken substrate show RT activity. RT activity is detected also in samples from diploid and continuous cell cultures, and in the cell culture media with foetal bovine serum. Detected activity originates from non-infectious retroviral particles, as no rise of the RT activity in indicator cell cultures is detected, nor it negatively affects mice and guinea-pigs in abnormal toxicity test. The effect of various operating conditions during the production of viral vaccines on RT activity was tested. Chromatography on monolithic columns enables concentration of endogenous retroviruses as well as RT molecules.

(133 pages, 53 figures, 37 tables, 85 references, original in: croatian)

Keywords: endogenous retroviruses, PERT assay, SPF eggs, live viral vaccines, chromatography, monolithic column, CIM-disks

Supervisor: prof. dr. sc. Renata Mažuran

Reviwers: prof. dr. sc. Dijana Škorić
Snježana Židovec Lepej, PhD
Dubravko Forčić, PhD

Sadržaj

Popis kratica IX
1. UVOD 1
1.1. Definicija problema 1
1.1.1. Uspostava odgovarajuće metode za detekciju retrovirusa 1
1.1.2. Priprema uzoraka za PERT-test 2
1.1.3. Prisutnost retrovirusa u različitim biološkim materijalima 2
1.2. Cilj rada 3
1.3. Radne hipoteze 3
1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja 3
2. LITERATURNI PREGLED 5
2.1. Retrovirusi 5
2.1.1. Klasifikacija retrovirusa 5
2.1.2. Građa retrovirusne čestice 6
2.1.3. Retrovirusni genom 7
2.1.3.1. Nekodirajuća regija 7
2.1.3.2. Kodirajuća regija 8
2.1.4. Životni ciklus retrovirusa 8
2.1.5. Reverzna transkripcija 9
2.1.6. Endogeni retrovirusi 10
2.1.6.1. Definicija i opće značajke endogenih retrovirusa 10
2.1.6.2. Negativne značajke endogenih retrovirusa 13
2.1.6.3. Pozitivne značajke endogenih retrovirusa 14
2.1.6.4. Ptičji endogeni retrovirusi 15
2.1.6.4.1. Ptičji endogeni retrovirusi u cjepivima 15
2.1.6.4.2. Infektivnost ptičjih endogenih retrovirusa 17
2.2. PERT-test 17
2.2.1. Lažno pozitivni rezultati PERT-testa 18
2.2.2. PERT-test u stvarnom vremenu 19
2.2.3. PERT-test i regulativa 20
2.3. Validacija testa 21
2.4. Dizajn eksperimenata 21
2.5. Tekućinska kromatografija 23
2.5.1. Molekulsko prosijavanje, hidrodinamička i *slalom*-kromatografija 23

2.5.2. Adsorpcijske kromatografske metode 24
2.5.2.1. Nosači u adsorpcijskoj kromatografiji 24
2.5.2.1.1. Metakrilatni monolitni diskovi CIM 26
3. MATERIJALI I METODE 28
3.1. Reagencije i otopine 28
3.1.1. Reagencije i otopine za PERT-test 28
3.1.2. Reagencije i otopine za održavanje staničnih kultura i infekciju stanica virusom 29
3.1.3. Reagencije i otopine za kromatografiju na kolonama CIM 29
3.2. Oprema, računalni programi i potrošni materijal 30
3.3. Biološki materijal 31
3.3.1. Embrionirana jaja i primarna kultura pilećih fibroblasta 31
3.3.2. Diploidne stanične kulture 31
3.3.3. Kontinuirane stanične kulture 32
3.3.4. Virus mumpsa 32
3.4. Metode 32
3.4.1. PERT-test 32
3.4.1.1. Aktivnost reverzne transkriptaze porijeklom iz različitih retrovirusa 32
3.4.1.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka supernatanata 34
3.4.1.3. Uzorkovanje i priprema ostalih uzoraka 35
3.4.1.4. Izvođenje PERT-testa 35
3.4.1.5. Normalizacija rezultata PERT-testa 38
3.4.2. Infekcija primarne kulture pilećih fibroblasta RNA virusom 38
3.4.2.1. Operativni faktori 38
3.4.2.1.1. Faktor X1 – metoda pripreme stanične kulture 38
3.4.2.1.2. Faktor X2 – metoda infekcije 39
3.4.2.1.3. Faktor X3 – vrijeme skupljanja žetve 39
3.4.2.2. Istraživanje utjecaja stabilizatora na PERT-test 40
3.4.2.3. Izračun broja endogenih retrovirusnih čestica 40
3.4.2.4. Izračun prinosa endogenih retrovirusnih čestica po stanici 41
3.4.2.5. Izračun utjecaja operativnih faktora na prinos endogenih retrovirusnih čestica po stanici 42
3.4.2.5.1. Prinos u Ž0 42
3.4.2.5.2. Prinos u Ž1 do Ž5 43
3.4.2.6. Određivanje titra virusa mumpsa 43

3.4.3. Infektivnost retrovirusnih čestica porijeklom iz staničnih kultura 44
3.4.3.1. Priprema indikatorskih staničnih kultura.....44
3.4.3.2. Testiranje u indikatorskim staničnim kulturama.....45
3.4.3.3. Istraživanje u životinjama.....48
3.4.4. Kromatografija na monolitnim nosačima.....48
3.4.4.1. Priprema uzoraka za PERT-test na monolitnim nosačima 48
3.4.4.2. Membranska ultrafiltracija kromatografskih uzoraka 50
3.4.4.3. Testiranje uzoraka iz kromatografije u PERT-testu.....51
3.4.4.4. Usporedba uspješnosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica.....52
4. REZULTATI.....54
4.1. Aktivnost reverzne transkriptaze porijeklom iz različitih retrovirusa 54
4.1.1. Standardizacija PERT-testa 54
4.1.1.1. Aktivnost AMV-RT 54
4.1.1.2. Aktivnost HIV-RT 56
4.1.1.3. Aktivnost MLV-RT.....58
4.1.1.4. Usporedba aktivnosti RT porijeklom iz različitih retrovirusa 60
4.1.2. Granica detekcije PERT-testa.....61
4.1.3. Otpornost PERT-testa 61
4.1.4. Izdržljivost.....62
4.1.5. Odabir standarda za testiranje biološkog materijala 63
4.2. Aktivnost reverzne transkriptaze u staničnim kulturama i embrioniranim jajima 63
4.2.1. Aktivnost reverzne transkriptaze u matriksu 64
4.2.2. Stabilnost uzoraka za PERT-test.....65
4.2.3. Aktivnost reverzne transkriptaze u neinficiranim staničnim kulturama i embrioniranim jajima.....67
4.2.3.1. Primarne stanične kulture 67
4.2.3.2. Embrionirana jaja 70
4.2.3.3. Diploidne i kontinuirane stanične kulture.....70
4.2.4. Aktivnost reverzne transkriptaze u inficiranim staničnim kulturama.....71
4.2.4.1. Utjecaj stabilizatora u uzorku na PERT-test.....71
4.2.4.2. Aktivnost RT u inficiranim staničnim kulturama – Ct vrijednosti.....72
4.2.4.3. Aktivnost RT u inficiranim staničnim kulturama – broj virusnih čestica 78
4.2.4.4. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa.....86
4.3. Infektivnost retrovirusnih čestica porijeklom iz staničnih kultura 90

4.3.1. Testiranje na indikatorskim staničnim kulturama 90
4.3.2. Istraživanje na životinjama 94
4.4. Priprema uzoraka za PERT-test na monolitnim nosačima 94
4.4.1. Rezultati kromatografije 94
4.4.2. Usporedba učinkovitosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica 98
5. DISKUSIJA 101
6. ZAKLJUČCI 112
7. CITIRANA LITERATURA 113
ŽIVOTOPIS X

Popis kratica

RT – reverzna transkriptaza

PCR – eng. ***p**olymerase **c**hain **r**eaction*

PERT-test – eng. ***p**roduct **e**nhanced **r**everse **t**ranscriptase* test

AMV-RT – reverzna transkriptaza virusa ptičje mijeloblastoze

HIV-RT – reverzna transkriptaza virusa ljudske imunodeficijencije

MLV-RT - reverzna transkriptaza virusa mišje leukemije

ALV – virus ptičje leukoze

Ct – eng. ***t**hreshold **c**ycle*

ERV – endogeni retrovirusi

HERV – ljudski endogeni retrovirusi

LTR – eng. ***l**ong **t**erminal **r**epeats*

PF – pileći fibroblasti

MEM-H(N) – eng. ***m**inimum **e**ssential **m**edium with **H**anks' salts; **n**eomycin sulphate*

DMEM – eng. ***D**ulbecco's **m**odified **E**agle **m**edium*

FBS – eng. ***f**oetal **b**ovine **s**erum*

HPLC – eng. ***h**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography*

CIM – eng. ***C**onvective **I**nteraction **M**edia*

QA – kvarterni amin, naziv za aktivnu skupinu CIM-QA-diska

SO_3 – sulfonil, naziv za aktivnu skupinu CIM-SO_3-diska

TEM – transmisijski elektronski mikroskop

CPE – citopatski efekt

1. UVOD

Retrovirusi su RNA virusi koji tijekom replikacije kopiraju svoj RNA-genom u DNA i pritom koriste enzim reverznu transkriptazu (RT). Inficiraju sve razrede kralješnjaka, uključujući ribe, vodozemce, ptice i sisavce (Carter i Saunders, 2007). U domaćinu se mogu naći kao integralni dio staničnog genoma (endogeni retrovirusi) ili kao neovisne čestice koje inficiraju stanice domaćina tijekom akutne ili kronične infekcije (egzogeni virusi). Infekcija retrovirusima veže se uz imunodeficijencije, maligne i neurološke bolesti (Fields i sur., 2001). Mjerenjem aktivnosti reverzne transkriptaze (RT), kao sastavnog dijela retrovirusa, može se dokazati prisutnost retrovirusa u biološkim materijalima. Reverzna transkriptaza prepisuje poznati RNA kalup u molekule cDNA koje se zatim umnažaju lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) kako bi se mogle detektirati. Kvantitativna metoda kojom se umnažanjem produkata reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (eng. *real-time*) otkriva aktivnost RT u biološkim materijalima naziva se eng. ***P**roduct **E**nhanced **R**everse **T**ranscriptase* test, odnosno PERT-test. Detekcija umnožene DNA u PERT-testu vrši se preko fluorescentno obilježene probe, a redni broj ciklusa PCR-a u kojem fluorescentni signal (odnosno količina umnožene DNA) prvi puta postane izraženiji od pozadinskih signala naziva se početnim (eng. *threshold cycle*, Ct).

U proizvodnji i kontroli kvalitete bioloških proizvoda iznimno je važno osigurati odsutnost bilo kakvog stranog agensa koji bi bio unesen u proizvod bilo preko ulaznih materijala (sirovine, stanice i sl.), bilo preko operatera ili iz proizvodnog prostora. Iz tog razloga važeća europska farmakopeja (Ph. Eur. 01/2011:50203) propisuje testiranje matičnih banki diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura koje se koriste za proizvodnju cjepiva za ljudsku upotrebu na prisutnost, među ostalim, retrovirusa koristeći upravo PERT-test.

1.1. Definicija problema

1.1.1. Uspostava odgovarajuće metode za detekciju retrovirusa

Detekcija retrovirusa važna je stavka pri testiranju bioloških proizvoda namijenjenih za ljudsku upotrebu (Ph. Eur. 01/2011:50203). Uobičajene metode za otkrivanje nepoznatih retrovirusa u uzorku su transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) (de Wit i sur., 2000) ili testiranje infektivnosti na staničnim kulturama. TEM je slabo dostupna, skupa i dugotrajna metoda slabe osjetljivosti, a testiranje infektivnosti na staničnim kulturama ne omogućava detekciju svih retrovirusa jer se neki retrovirusi ne mogu razmnožavati *in vitro* u staničnim kulturama ili nisu citopatogeni. Iz tih razloga nužno je razviti metodu koja otkriva prisutnost

retrovirusa po drugom načelu, na način da mjeri aktivnost reverzne transkriptaze (RT) kao sastavnog dijela svih retrovirusa.

1.1.2. Priprema uzoraka za PERT-test

Priprema uzoraka za PERT-test zahtijeva korak u kojem se retrovirusne čestice iz uzorka koncentriraju. Uobičajeno se retrovirusne čestice koncentriraju ultracentrifugiranjem uzorka (Böni et.al., 1996), nakon čega se odstranjuje supernatant, a na talog se dodaje pufer za lizu kako bi se RT oslobodila iz virusnih čestica. Prilikom odstranjivanja supernatanta ne može se u potpunosti kontrolirati zaostali minimalni volumen supernatanta, što onemogućuje preciznu kvantifikaciju retrovirusnih čestica u uzorku (mogućnost razrjeđivanja taloga). Također, zaostali volumen supernatanta, u kojem se nalaze različite biološke molekule, može eventualno imati nepovoljan (inhibitorni) utjecaj na PERT-test. Ultracentrifugiranjem se koncentriraju samo virusne čestice, no nije moguće koncentrirati sami enzim RT.

Monolitni kromatografski nosači (diskovi) napravljeni su od jednog dijela materijala porozne strukture. Njihove najvažnije karakteristike su olakšano vezanje makromolekula na aktivna mjesta zbog dominantno konvektivnog toka mobilne faze kroz protočne pore nosača i mogućnost vrlo brzih separacija pri niskom tlaku (Tennikova i Švec, 2003). Convective Interaction Media® (CIM) diskovi napravljeni su od organskog materijala metakrilata (Strancar i sur., 2002). Nisu poznate osobitosti CIM-diskova pri izolaciji retrovirusnih čestica i enzima RT. Kako bi se istražilo mogu li se kromatografijom koncentrirati retrovirusne čestice i sami enzim RT iz uzorka, čime bi se standardizirao postupak pripreme uzorka za PERT-test, potrebno je uzorke pripremiti kromatografijom na CIM-diskovima.

1.1.3. Prisutnost retrovirusa u različitim biološkim materijalima

Za neke stanične kulture koje se koriste u proizvodnji cjepiva za ljudsku upotrebu, kao što je primarna kultura pilećih fibroblasta (PF), nije potrebno u sklopu kontrole kvalitete provoditi testiranje na prisutnost retrovirusa (Ph. Eur. 01/2011:50203), premda je poznato da PF sadrže endogene retrovirusne čestice te da supernatant kulture PF daje pozitivan rezultat u PERT-testu, kao i cjepiva proizvedena na tom staničnom supstratu (Böni i sur., 1996; Robertson i sur., 1997; Andre i sur., 2000). Pretpostavljam kako je navedeno testiranje izostavljeno zbog toga što pojavnost endogenih retrovirusnih čestica u kulturi PF nije još dovoljno istražena i nije moguće postaviti granicu dozvoljene aktivnosti reverzne transkriptaze. Kako bi se istražila pojavnost endogenih retrovirusnih čestica u PF, potrebno je istražiti ovisi li njihovo lučenje o načinu proizvodnje i infekcije proizvodnog staničnog supstrata. Potrebno je također

istražiti jesu li izlučene endogene retrovirusne čestice infektivne. Navedeno se može istražiti testom infektivnosti u indikatorskim staničnim kulturama *in vitro*, te testiranjem infektivnosti *in vivo* u životinjama.

Poznato je da još neke kontinuirane stanične kulture, uz primarnu kulturu PF, u PERT-testu daju pozitivan rezultat na prisutnost RT. Potrebno je također istražiti dostupne diploidne i kontinuirane stanične kulture na prisutnost retrovirusa.

1.2. Cilj rada

Ovim istraživanjem želim (1) doprinijeti znanju o osobitostima PERT-testa za otkrivanje aktivnosti reverzne transkriptaze i posredno retrovirusa u biološkim uzorcima. Cilj je nadalje (2) poboljšati osjetljivost testa primjenom kromatografije na kratkim monolitnim nosačima pri pripremi uzoraka i istražiti omogućuju li navedeni nosači izolaciju i retrovirusnih čestica i enzima reverzne transkriptaze. Također želim (3) istražiti različite biološke materijale kako bih u njima utvrdila razinu aktivnosti RT. Ukoliko se potvrdi aktivnost RT u biološkom materijalu cilj je (4) utvrditi potječe li aktivnost od infektivnih retrovirusnih čestica te postoji li rizik od prijenosa aktivnosti RT *in vivo* i *in vitro*.

1.3. Radne hipoteze

1. PERT-test je dovoljno osjetljiv da može otkriti prisutnost reverzne transkriptaze (RT) prisutne u uzorku u vrlo maloj koncentraciji i dovoljno je osjetljiv da može detektirati prisutnost RT porijeklom iz različitih vrsta.
2. Retrovirusne čestice prisutne u biološkom materijalu i njihova RT mogu se vezati i eluirati s CIM-diska korištenjem sustava za tekućinsku kromatografiju visokog učinka (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC).
3. Neki biološki materijali daju pozitivan rezultat PERT-testa, odnosno sadrže retrovirusne čestice iz kojih se oslobađa RT.
4. Retrovirusne čestice prisutne u PERT-test pozitivnom biološkom materijalu nisu infektivne *in vivo* ni *in vitro*.

1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja

1. Uspostava PERT-testa

- testirati reverzne transkriptaze (RT) porijeklom iz različitih retrovirusa:
    - RT virusa ljudske imunodeficijencije (HIV-RT);
    - RT virusa ptičje mijeloblastoze (AMV-RT);

- RT virusa mišje leukemije (MLV-RT)

- odrediti osjetljivost, granice detekcije, otpornost (eng. *robusntess*) i izdržljivost (eng. *ruggedness*) PERT-testa
- odabrati standardnu RT za testiranje biološkog materijala

2. Testiranje biološkog materijala PERT-testom

- testiranje supernatanta primarnih, diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura
- testiranje biološkog materijala dobivenog tijekom proizvodnje virusnih cjepiva pod različitim uvjetima pripreme i infekcije proizvodnih staničnih supstrata

3. Obrada biološkog materijala

- priprema biološkog materijala ultracentrifugiranjem – istražiti učinkovitost koncentriranja retrovirusnih čestica mjerenjem aktivnosti RT u talogu i u supernatantu
- kromatografija na dva različita kratka monolitna nosača (jaki kationski izmjenjivač i jaki anionski izmjenjivač) – istražiti mogu li se koncentrirati retrovirusne čestice i enzim RT oslobođen iz retrovirusnih čestica

4. Detekcija prijenosa retrovirusnih čestica

- istražiti *in vitro* infektivnost supernatanta stanične kulture koja daje jaki pozitivan signal u PERT-testu infekcijom indikatorskih staničnih kultura – prati se razina aktivnosti RT tijekom i na kraju perioda inkubacije (14 dana), indikatorske stanične kulture se mikroskopski pregledaju na prisutnost citopatskog efekta (CPE) te se testira prisutnost hemaglutinirajućih agensa
- istražiti *in vivo* infektivnost supernatanta stanične kulture koja daje jaki pozitivan signal u PERT-testu infekcijom miševa i zamorčadi te praćenjem njihove težine i općeg zdravstvenog stanja kroz sedam dana.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Retrovirusi

Retrovirusi su RNA virusi koji tijekom replikacije kopiraju svoj RNA-genom u DNA. Do otkrića retrovirusa smatralo se kako informacije u genetskom materijalu uvijek idu isključivo od DNA prema RNA te je otkriće virusa koji prepisuju genetski materijal u drugom smjeru bilo revolucionarno. Upravo su zbog te značajke retrovirusi dobili ime, prema latinskoj riječi retro, što znači natrag (Carter i Saunders, 2007). Nakon ulaska retrovirusa u stanicu domaćina, genomska RNA prepisuje se u DNA mehanizmom koji se naziva reverzna transkripcija. Reverzna transkripcija odvija se pomoću RNA-ovisne DNA-polimeraze koja se naziva reverzna transkriptaza (RT) i sastavni je dio retrovirusa. Novonastala molekula DNA nasumično se ugrađuje u genom domaćina (DNA-provirus) nakon čega služi kao kalup za sintezu virusnih proteina i virusne genomske RNA. Ovaj jedinstveni način replikacije razlikuje ih od svih ostalih porodica virusa, te omogućuje vrlo raznolike biološke karakteristike kao što su:

- postojanje velikog broja virusnih sojeva koji imaju različite životne cikluse i patogene učinke;
- mogućnost mijenjanja strukture i funkcije genomskih sekvenci domaćina (npr. insercijska aktivacija onkogena) što je uvelike doprinijelo istraživanju i razumijevanju karcinogeneze i kontrole staničnog rasta;
- mogućnost ugrađivanja u genom spolnih stanica i prenošenje s generacije na generaciju – retrovirusi mogu biti dobri markeri evolucije;
- mogućnost brze promjene genoma mutacijama ili rekombinacijom što osigurava brzu prilagodbu na promjene uvjeta okoliša i
- mogućnost korištenja retrovirusa kao vektora za ubacivanje stranih gena u stanice (Fields i sur., 2001).

2.1.1. Klasifikacija retrovirusa

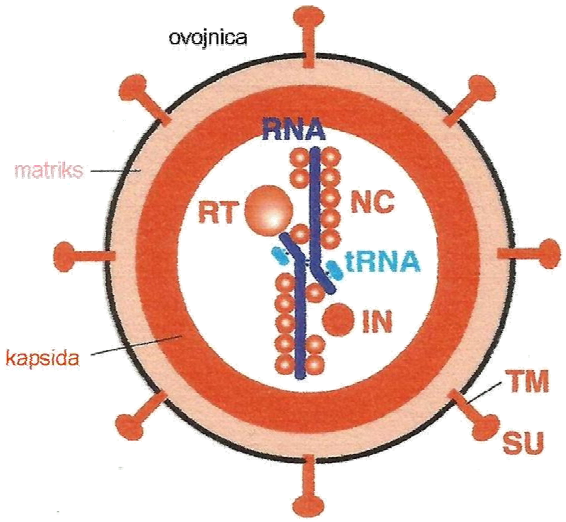
Retrovirusi pripradaju porodici *Retroviridae*, koja sadrži dvije potporodice, *Orthoretrovirinae* i *Spumaretrovirinae* (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2012). Potporodica *Orthoretrovirinae* sadrži šest rodova retrovirusa – *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* i *Lentivirus*, dok potporodica *Spumaretrovirinae* sadrži samo jedan rod, *Spumavirus*.

Tablica 1. Klasifikacija retrovirusa i predstavnici pojedinih rodova.

Porodica	Potporodica	Rod	Primjeri virusa
Retroviridae	*Orthoretrovirinae*	*Alpharetrovirus*	*Avian leukosis virus* *Avian myeloblastosis virus*
		Betaretrovirus	*Mouse mammary tumour virus*
		Deltaretrovirus	*Bovine leukemia virus*
		Epsilonretrovirus	*Walleye dermal sarcoma virus*
		Gammaretrovirus	*Murine leukemia virus*
		Lentivirus	*Human immunodefficiency virus 1*
	Spumaretrovirinae	*Spumavirus*	*Simian foamy virus*

2.1.2. Građa retrovirusne čestice

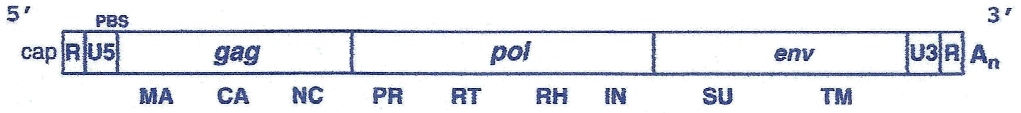
Zrela retrovirusna čestica promjera je oko 100 nm. U gradijentu saharoze odgovara gustoći od 1,16 do 1,18 g/ml. Virioni su osjetljivi na toplinu, detergente i formaldehid. Izgled retrovirusne čestice prikazan je na Slici 1. Virusna genomska RNA je visoko kondenzirana i vezana uz nukleoprotein (NC). Na svakoj kopiji virusne RNA nalazi se po jedna vezana molekula tRNA, koja služi kao početnica za transkripciju, a koja potječe iz stanice domaćina u kojoj se virus umnožio. Genomska RNA i NC nalaze se u proteinskoj ovojnici koja se naziva kapsida. Unutar kapside se uz genomsku RNA nalaze i enzimi reverzna transkriptaza (RT), proteaza i integraza (IN) koji sudjeluju u replikaciji virusa i procesiranju novonastalih genskih produkata. Kapsida predstavlja srž viriona i okružena je proteinima matriksa. Matriks je okružen lipidnim dvoslojem koji se naziva ovojnica. U ovojnici se nalazi glikoprotein s transmembranskom podjedinicom (TM) i površinskim dijelom (SU) kojim se virion veže na receptore stanice domaćina.



Slika 1. Retrovirusna čestica. RT- reverzna transkriptaza; NC – nukleokapsida; IN – integraza; TM – transmembranski glikoprotein; SU – površinski glikoprotein.
Preuzeto iz: Carter i Saunders, Virology Principles and Applications, 2007.

2.1.3. Retrovirusni genom

Retrovirusni genom čini dimer linearne jednolančane RNA. Svaki monomer je veličine 7 do 13 kilobaza (kb). Monomeri su međusobno jednaki i spajaju se preko komplementarnosti 5'-krajeva u regiji koja se naziva eng. *kissing-loop* kompleks. Budući da se u životnom ciklusu virusa RNA-genom stvara na isti način kao i mRNA, obje molekule imaju sličnu građu. Na 5'-kraju nalazi se klasična *cap*-sekvenca, a na 3'-kraju poliadenilna sekvenca. Retrovirusni genom građen je na način da su sve nekodirajuće sekvence koje sadrže važne signale za sintezu DNA ili RNA i za procesiranje smještene na krajevima genoma. Sekvence u unutrašnjosti genoma kodiraju za virusne proteine (Carter i Saunders, 2007). Općenita organizacija retrovirusnog genoma prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Organizacija retrovirusnog genoma. **Geni:** *gag*, *pol* i *env*; **Nekodirajuće sekvence:** R – ponavljajuće sekvence, U5 – jedinstvena sekvenca na 5'-kraju, U3 – jedinstvena sekvenca na 3'-kraju, PBS – vezno mjesto za početnicu; **Proteini:** MA – matriks, CA – kapsida, NC – nukleokapsida, PR – proteaza, RT – reverzna transkriptaza, RH – RNaza H, IN – integraza; SU – površinski glikoprotein, TM – transmembranski glikoprotein.
Preuzeto iz: Carter i Saunders, Virology Principles and Applications, 2007.

2.1.3.1. Nekodirajuća regija

Regija R (eng. *repeat,* R) je kratka sekvenca (15-240 nukleotida) koja se ponavlja na oba kraja genoma. Igra važnu ulogu tijekom reverzne transkripcije tako što omogućuje prijenos novonastale molekule DNA s jednog kraja genoma na drugi. Sekvenca U5 je jedinstvena (eng. *unique,* U) sekvenca od 75-200 nukleotida koja se prva prepisuje prilikom reverzne transkripcije. Također, sadrži mjesto koje omogućuje integraciju DNA provirusa. Vezno mjesto za početnicu (eng. *primer binding site,* PBS) je sekvenca od 18 nukleotida koja je komplementarna 3'-kraju specifične tRNA-početnice preko koje započinje sinteza negativnog DNA lanca (-DNA). Polipurinski trakt (*polypurine tract,* PPT) je kratka sekvenca bogata A i G nukleotidima s koje započinje sinteza pozitivnog DNA lanca (+DNA). Sekvenca U3 je jedinstvena sekvenca od oko 150-1200 nukleotida koja nastaje na 5'-kraju novonastalog provirusa nakon reverzne transkripcije. Sadrži brojne *cis*-aktivirajuće elemente potrebne za ekspresiju virusnih gena i mjesto potrebno za integraciju DNA provirusa.

2.1.3.2. Kodirajuća regija

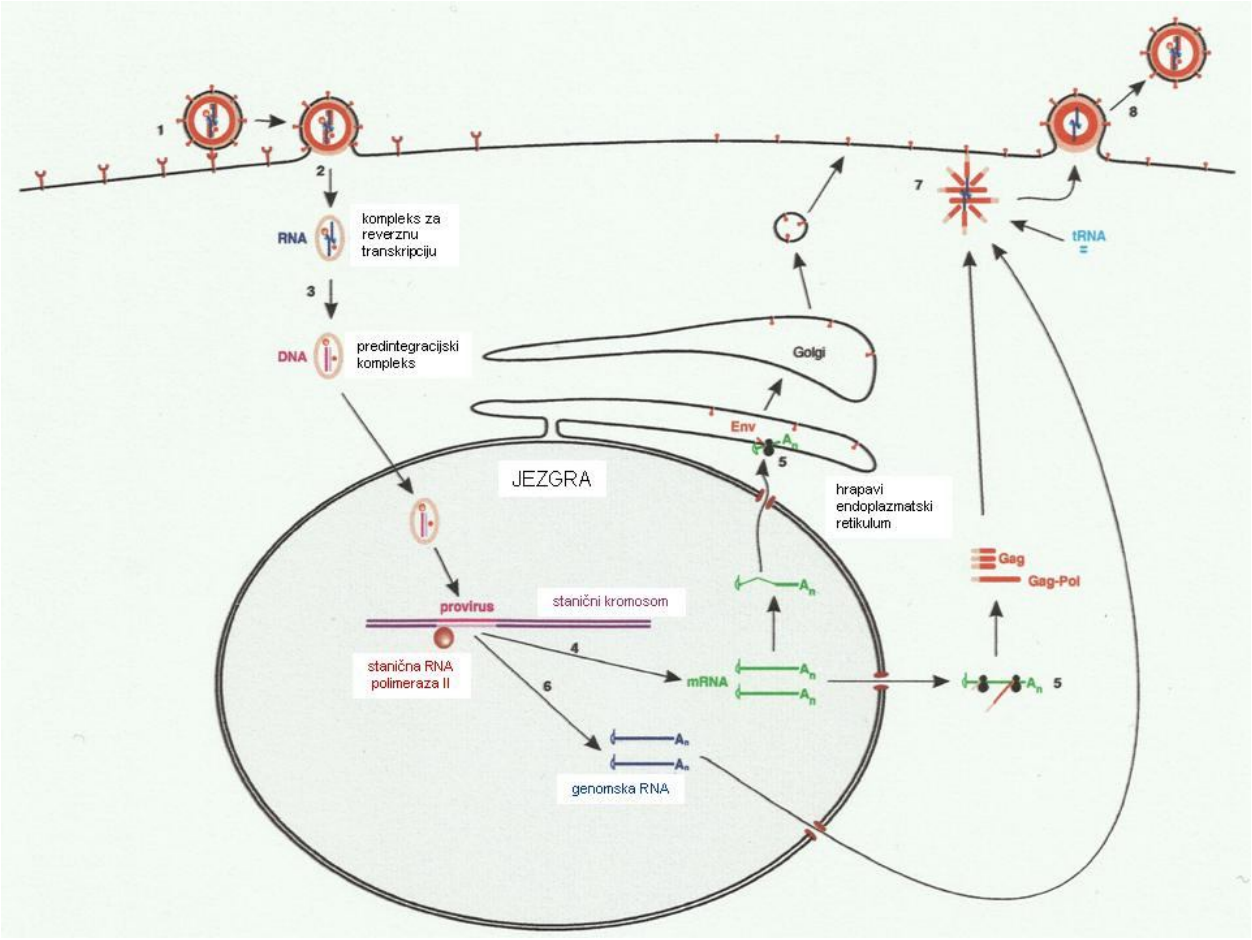
Genomi svih retrovirusa koji imaju sposobnost replikacije sadrže najmanje tri gena, odnosno otvorena okvira čitanja (eng. *open reading frame,* ORF). Od 5'-kraja prema 3'-kraju nalaze se geni *gag* (od eng. *group-specific antigen*), *pol* (od eng. *polymerase*) i *env* (od eng. *envelope*). Produkt gena *gag* se translatira s molekule mRNA kao prekursorski poliprotein. Poliprotein se nakon toga cijepa te nastaju unutarnji strukturni proteini. Gen *pol* kodira za enzime, a gen *env* kodira za dva glikoproteina ovojnice preko kojih se retrovirus veže na stanicu domaćina i ulazi u nju.

2.1.4. Životni ciklus retrovirusa

Životni ciklus retrovirusa prikazan je na Slici 3. Prvi događaj u životnom ciklusu retrovirusa je vezanje virusa preko glikoproteina SU na stanični receptor. Nakon vezanja dolazi do konformacijske promjene u TM glikoproteinu, što omogućuje stapanje virusne i stanične membrane i ulazak kompleksa za reverznu transkripciju u citoplazmu stanice domaćina. U kompleksu za reverznu transkripciju odvija se potom reverzna transkripcija RNA-genoma i stvaranje dvolančane molekule DNA, tj. provirusa. Provirus, za kojeg je još uvijek vezano nešto virusnih proteina prenosi se u jezgru kao predintegracijski kompleks i uz pomoć integraze ugrađuje se u DNA domaćina. Virusni geni mogu se odmah početi prepisivati ili infekcija može biti latentna (Carter i Saunders, 2007). Novonastale RNA molekule prepisane s provirusne DNA mogu se prevesti u virusne proteine (služe kao mRNA) ili služiti kao genomska RNA.

Gen *env* prevodi se u Env protein u hrapavom endoplazmatskom retikulumu, gdje se glikozilira. Env protein se potom prenosi u Golgi kompleks gdje se staničnim proteazama cijepa na SU i TM molekule, koje se dodatno glikoziliraju i transportiraju u staničnu membranu. Geni *gag* i *pol* prevode se u Gag i Gag-Pol poliproteine. Budući da virus treba puno više Gag proteina, u samo 5% slučajeva nastaje Gag-Pol poliprotein i to čitanjem kroz stop kodon na kraju *gag* gena. Gag i Gag-Pol proteini miristiliraju se na N-kraju (Carter i Saunders, 2007). Većina retrovirusa sastavlja virusne čestice na unutrašnjoj strani stanične membrane. Preko miristilnih grupa se Gag i Gag-Pol proteini vežu na staničnu membranu, a ta se veza učvršćuje preko elektrostatskih interakcija između pozitivnih matriks proteina i negativnih fosfatnih grupa u staničnoj membrani. Matriks proteini vežu se također i na citoplazmatski dio TM proteina u staničnoj membrani. Virusna RNA veže se na nukleokapsidne domene Gag i Gag-Pol proteina i nastaje RNA-dimer. Transportne RNA vežu se na vezna mjesta za početnice na RNA-genomu. Nezreli virion pupa sa stanične membrane i

nakon pupanja dolazi do cijepanja Gag i Gag-Pol proteina pomoću virusne proteaze te nastaju matriks, kapsida i nukleoproteini te virusni enzimi.

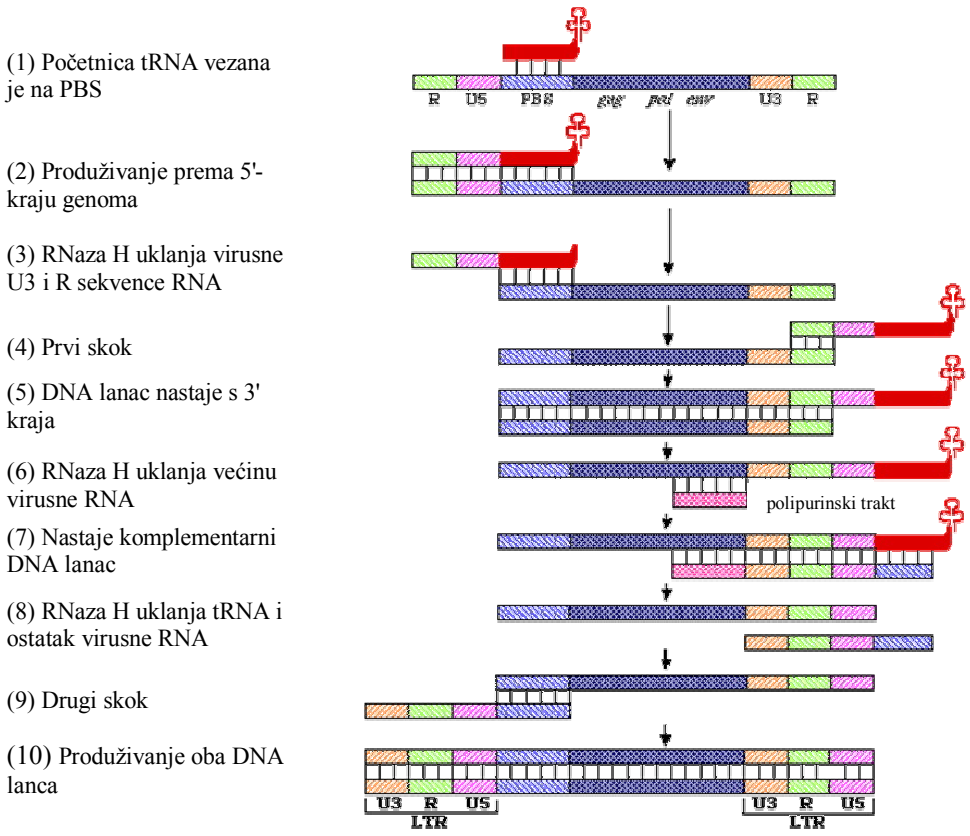


Slika 3. Životni ciklus retrovirusa. (1) Prihvaćanje virusa na stanicu; (2) Ulazak; (3) Reverzna transkripcija; (4) Transkripcija; (5) Translacija; (6) Replikacija genoma; (7) Sastavljanje i (8) Izlazak. *Preuzeto iz: Carter i Saunders, Virology Principles and Applications, 2007.*

2.1.5. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je jedinstven način replikacije prema kojem su retrovirusi dobili ime. Shematski prikaz reverzne transkripcije prikazan je na Slici 4. Transportna RNA koja služi kao početnica vezana je na odgovarajuće vezno mjesto (PBS). Stvaranje DNA počinje produživanjem 3'-kraja početnice do 5'-kraja virusnog genoma. Virusne sekvence U5 i R se zatim odstrane pomoću RNaze H. Novonastala sekvenca DNA radi prvi „skok“, odnosno premješta se na drugi kraj virusnog genoma i veže na komplementarnu sekvencu R. Slijedi zatim produživanje DNA s 3'-kraja, uklanjanje virusne RNA pomoću RNaze H do sekvence PPT, daljnje produživanje komplementarnog lanca DNA, uklanjanje tRNA i ostatka virusne RNA pomoću RNazeH, drugi „skok“ i završno produživanje oba lanca DNA. Reverznom

transkripcijom dobije se na kraju dvolančana DNA spremna za inserciju u genom stanice domaćina.



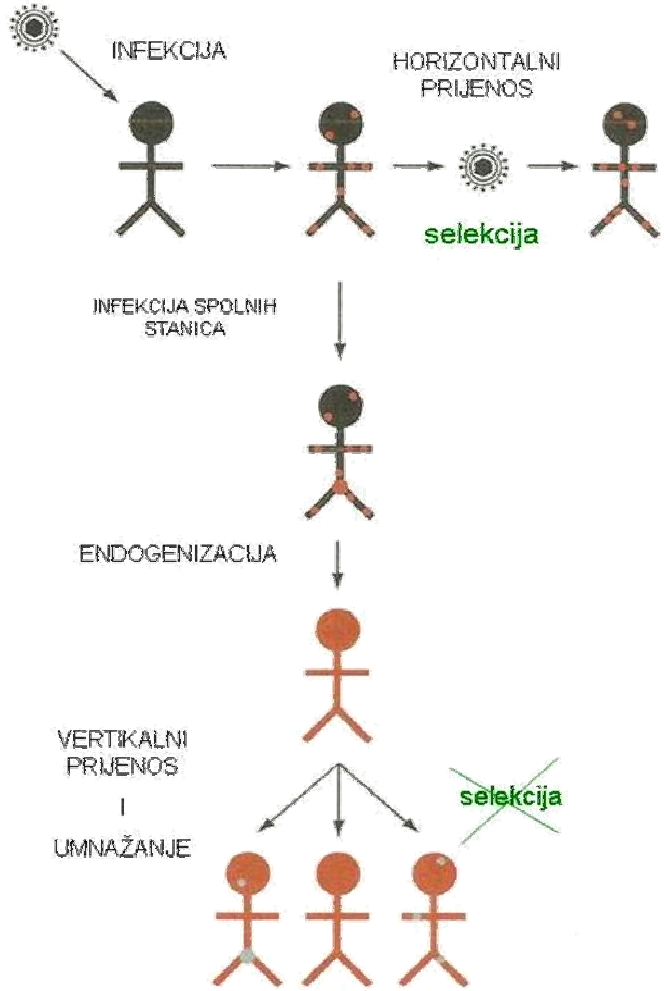
Slika 4. Reverzna transkripcija.
Preuzeto s: http://www.microbiologybytes.com/virology/Retroviruses.html

2.1.6. Endogeni retrovirusi

2.1.6.1. Definicija i opće značajke endogenih retrovirusa

Repetitivni elementi DNA koji se sami umnažaju i mijenjaju lokaciju u genomu (transponiraju se) nazivaju se transpozoni (Buzdin, 2007). Proliferiraju bilo direktno preko kopije DNA (transpozoni DNA) ili pak preko RNA-intermedijera (retroelementi), koristeći se pritom mehanizmom reverzne transkripcije (Kurth i Bannert, 2010). Kod većine genoma sisavaca samo mali dio genoma predstavljaju kodirajuće sekvence. Više od 40% genoma predstavljaju retroelementi koji su ujedno i jedina vrsta transpozona koji u genomu sisavaca imaju sposobnost transpozicije (Griffiths, 2001; Buzdin, 2007; Dewannieux i sur., 2010). Većina retroelemenata odgovaraju LINEs (eng. *long interspersed nuclear elements*) i SINEs (eng. s*hort interspersed nuclear elements*) sekvencama i nisu direktno povezane s niti jednim poznatim virusom. Druga skupina retroelemenata odgovara LTR retrotranspozonima, tj. endogenim retrovirusima (ERV) (Dewannieux i sur., 2010). Endogeni retrovirusi sačinjavaju

oko 5-10% genoma domaćina sisavaca (Nelson i sur., 2004; Belshaw i sur., 2004; Weiss, 2006; Dewannieux i sur., 2010; Miyazawa, 2010), što je velik postotak ako imamo na umu da samo oko 3% ljudskog genoma kodira proteine ili sudjeluje u proizvodnji proteina. ERV-i su nastali od egzogenih retrovirusa, infekcijom spolnih stanica, prilikom čega su se integrirali u genom stanica domaćina (Johnson i sur., 1999; Griffiths 2001; Nelson i sur., 2003, Gifford i sur., 2003; Weiss, 2006; Dewannieux i sur., 2010). Integrirane sekvence dalje su se prenosile iz generacije u generaciju, tijekom čega je moglo doći do re-infekcije spolnih stanica te povećanja broja kopija u genomu domaćina (Slika 5.).



Slika 5. Porijeklo i evolucija endogenih retrovirusa.
Preuzeto iz Dewannieux i sur., 2010.

Amplifikacija ERV-a vjerojatno je najveća odmah nakon kolonizacije domaćina, a zatim pada jer ERV može biti opasan za domaćina pa se domaćin brani na način da suprimira ekspresiju ERV-a mehanizmima kao što je na primjer metilacija (Mang, 2001) ili gubi receptore za taj virus (Gifford i sur., 2003).

Na početku procesa endogenzacije i endogeni i egzogeni retrovirus koegzistiraju u populaciji i njihove su sekvence jednake. Potvrda toga je jedan novi endogeni retrovirus u australskim koalama nazvan koala retrovirus (KoRV) (Miyazawa, 2010). KoRV ima sekvencu homolognu sekvenci patogenog egzogenog virusa leukemije gibona (eng. *Gibbon ape leukaemia virus*, GALV), od kojeg je vjerojatno potekao i prilagodio se u koalama, u kojima je slabije patogen (Tarlinton i sur., 2008). KoRV postoji i kao egzogeni infektivni virus, a uočen je i u svojoj endogenoj formi u većini populacije koala, osim u grupi koala koja od početka 20. stoljeća živi izolirano. Pretpostavlja se da će endogeni retrovirus s vremenom izgubiti svoja patogena svojstva, no zasad ima sposobnost prouzročiti neoplazije i imunosupresiju u novom domaćinu.

Razlika koja se kasnije pojavljuje između endogenog retrovirusa i egzogenog od kojega je potekao, posljedica je različite selekcije između ta dva virusa. Egzogeni retrovirus za replikaciju koristi reverznu transkriptazu s niskom razinom pouzdanosti replikacije i izložen je selektivnom pritisku zbog kojeg opstaju samo oni retrovirusi koji zadrže sve proteine funkcionalnima. S druge strane, endogeni retrovirusi se nakon endogenizacije repliciraju isključivo koristeći stanične enzime, koji su značajno pouzdaniji od reverzne transkriptaze, i tim virusima nije bitno održati sve proteine funkcionalnima. Većina endogenih provirusa sadrži brojne točkaste mutacije, delecije, insercije ili pomaknute otvorene okvire čitanja, i to sve više što su evolucijski ranije endogenizirani. Koristeći tu karakteristiku, moguće je na temelju sekvenci endogenih retrovirusa napraviti filogenetsko stablo koje se u visokom postotku poklapa s već utvrđenim i dobro poznatim filogenetskim stablom primata (Johnson i sur., 1999).

Općenito, karakteristika sekvenci ERV-a je da imaju LTR-sekvence koje okružuju otvorene okvire čitanja (ORF) slične onima koje kodiraju infektivni retrovirusi. ERV-i mogu biti podijeljeni u dvije kategorije, ovisno o tome imaju li ili ne gen za glikoproteine ovojnice (*env*), smješten nizvodno od očuvanog otvorenog okvira čitanja za proteine Gag i Pol. ERV-i nisu patogeni za svog domaćina (uz iznimke kao što su na primjer ERV-i iz AKR miševa koji u svom domaćinu uzrokuju limfome) no mogu biti infektivni. Primjer za to je mačji ERV RD-114 koji može inficirati mačje stanične kulture, ali i ljudske i pseće, što ga čini politropnim ERV-om. Ukoliko se mačje stanice koje sadrže RD-114 koriste za proizvodnju cjepiva (kao što je slučaj za neka veterinarska cjepiva), može doći do neželjenog širenja infekcije RD-114 ERV-om (Miyazawa, 2010). Budući da se općenito za proizvodnju cjepiva koriste stanične

kulture za koje se zna da sadrže (ne)infektivne ERV-e, jasno je zašto ERV-i predstavljaju zdravstveni rizik i zašto je nužno kvalitetnim metodama detekcije retrovirusa osiguravati neškodljivost cjepiva.

Uočeno je nadalje da neki uvjeti u staničnoj kulturi mogu pogodovati jačoj ili slabijoj ekspresiji ERV-a koji mogu i ne moraju biti infektivni (Khan i sur., 2001; Brorson i sur., 2002). Uvjeti stanične kulture koji izravno utječu na metabolizam stanica ili na razinu ekspresije proteina, kao što su temperatura, pH ili dodatak natrijevog butirata koji inhibira proliferaciju, potiče diferencijaciju i pojačava ili stišava gensku ekspresiju (Kruh, 1981) utječu značajno na razinu sinteze retrovirusnih čestica. Neki mišji retrovirusi počinju se spontano lučiti *in vivo* sa starenjem miša ili *in vitro* nakon dugotrajne kultivacije mišjih stanica. U mišjim stanicama lučenje infektivnih ERV-a može se potaknuti dodatkom 5-jododeoksiuridina (5-I dU, halogenirani nukleotid) (Khan i sur., 2001).

2.1.6.2. Negativne značajke endogenih retrovirusa

ERV-i se u zadnje vrijeme dosta povezuju s kroničnim bolestima u ljudi kao što su dijabetes, shizofrenija, multipla skleroza, sistemski lupus eritematozus i razne druge autoimune bolesti (Brodziak i sur., 2012). Mehanizmi preko kojih se smatra da ERV-i uzrokuju bolesti su molekularna mimikrija, aktivacija superantigena ili stvaranje novih antigena ukoliko dođe do rekombinacije endogenog i egzogenog retrovirusa (Perl, 2003; Nelson i sur., 2003 i 2004; Brodziak i sur., 2012).

ERV-i mogu predstavljati rizik i kod ksenotransplantacije, odnosno prijenosa organa, tkiva ili stanica iz jedne vrste u drugu, najčešće iz životinje u čovjeka (Mang, 2001; Mattiuzzo i sur., 2010). Mnogi ERV-i ne reinficiraju vlastite stanice, no mogu inficirati stanice druge vrste. Tako je uočeno da svinjski endogeni retrovirusi (eng. *Pig endogenous retrovirus*, PERV) mogu *in vitro* inficirati ljudske stanice, no zasad nije uočena takva infekcija *in vivo* kod ljudi koji imaju transplantirana tkiva svinje. Potreban je oprez i kod proizvodnje na primjer terapijskih monoklonskih protutijela u mišjim stanicama jer stanice mišjeg hibridoma luče ksenotropni virus mišje leukemije (eng. *Xenotropic murine leukaemia virus*, XMLV) (Weiss, 2006). Također, XMLV je pronađen u stanicama raka prostate, no njegova pojavnost mora biti dodatno istražena (Kurth i Bannert, 2010).

2.1.6.3. Pozitivne značajke endogenih retrovirusa

Osim opisanih patogenih i infektivnih svojstava ERV-a, postoje i sasvim drugačije karakteristike ERV-a koje svojem domaćinu služe na dobrobit. Za razliku od slučaja u kojem retrovirus koristi ugrađivanje u genom domaćina kao vlastitu selektivnu prednost, postoje slučajevi u kojima je domaćin iskoristio ugradnju retrovirusa u genom za svoju prednost (Mi i sur., 2000; Blond i sur., 2000; Griffiths, 2001; Blaise i sur., 2003; Frendo i sur., 2003; Dunn i sur., 2003; de Parseval i sur., 2005). Tako je otkriven retrovirusni protein sincitin koji sudjeluje u stvaranju sinciciotrofoblasta (Ryan FP, 2004; Black i sur., 2010; Kurth i Bannert, 2010). Sinciciotrofoblast je struktura debljine jedne stanice koja obavija placentu, odnosno nalazi se na međi između majke i fetusa i olakšava izmjenu otpadnih tvari. Sincitin je jako fuzogenični membranski glikoprotein i proizvod je *env* gena ljudskog ERV-a W (HERV-W). Sadrži 25 aminokiselina i potiče fuziju trofoblasta, što predstavlja ključan događaj u stvaranju posteljice (Mi i sur., 2000; Griffiths, 2001). Potiče fuziju stanica i u različitim staničnim kulturama nakon interakcije s tip D retrovirusnim receptorom (Blond i sur., 2000; Frendo i sur., 2003). Njegova moć da fuzionira stanice nije neočekivana, budući da je zadaća proteina Env da fuzionira virus sa stanicom prilikom infekcije. Uz sincitin se u posteljici eksprimira još jedan ljudski ERV, HERV-R (ERV-3) (Mi i sur., 2000; Nelson i sur., 2003). Oba HERV-a imaju imunosupresivnu peptidnu regiju te se smatra da imaju pozitivnu ulogu u sprečavanju majčinog imunosnog odgovora na semi-alogenski plod (Mang, 2001; Nelson i sur., 2003; Dupressoir i sur., 2012). U teoriji, endogenizirani retrovirusi su možda poslužili kao instrument u prelasku iz lijeganja jaja u razvoj sisavaca unutar maternice (Dupressoir i sur., 2012).

Još jedna pozitivna karakteristika HERV-a je obrana od egzogenih retrovirusa (Kurth i Bannert, 2010). Proteini HERV-a mogu, na primjer, blokirati receptore za ulazak egzogenih retrovirusa u stanice (Nelson i sur., 2003). Poznat je tako primjer prostitutki u Gambiji i Keniji koje su stalno izložene infekciji HIV-om, ali se njime ne inficiraju (seronegativne su). Uočena je visoka sličnost između peptida koji se prezentiraju na MHC I citotoksičnim T limfocitima koji inače nastaju kao odgovor na HIV infekciju i peptida koji potječu od HERV-K10 (Nelson i sur., 2003). Moguće je da HERV peptidi započinju imunosni odgovor na HIV. Pronađeno je da stanice karcinoma bubrega eksprimiraju HERV antigen koji potiče snažan imunosni odgovor u donorskim transplantiranim stanicama koštane srži te se time doprinosi smanjenju tumora (Kurth i Bannert, 2010).

2.1.6.4. Ptičji endogeni retrovirusi

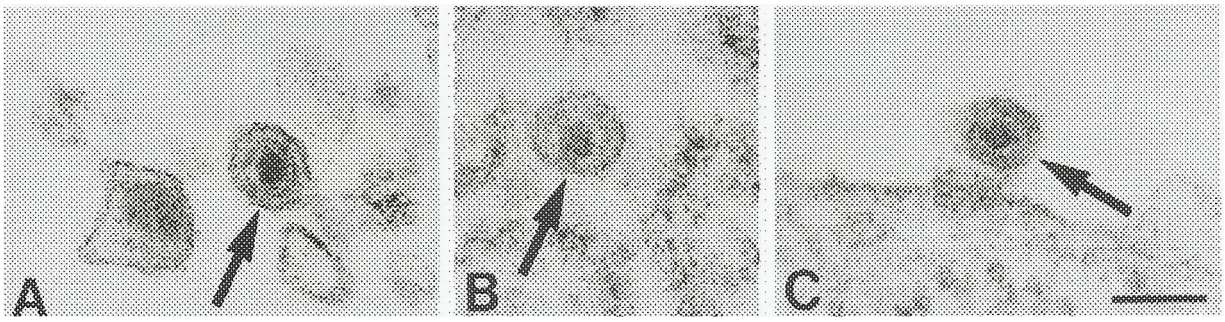
Kod ptica su također otkriveni ERV-i. Tijekom 1960-ih godina velik problem predstavljala je ptičja leukoza kokoši nesilica izazvana virusom ptičje leukoze (eng. *Avian leukosis virus*, ALV). U to vrijeme razvijen je serološki test za detekciju ALV Gag proteina p27, no uočeno je da i neinficirane kokoši daju pozitivan rezultat u testu. Također je križanjem gag negativnih i Gag-pozitivnih kokoši utvrđeno da se Gag antigen nasljeđuje po Mendelovim načelima. Tijekom 1970-ih godina otkrivena je prisutnost DNA povezane s ALV-om u neinficiranim pilićima (Weiss, 2006). Uočeno je i da kokošji filogenetski stariji srodnik, crvena perad iz džungle (eng. *red jungle fowl*) također sadrži endogeni ALV, što ukazuje na to da se genom ALV-a integrirao u genom kokoši prije mnogo godina, no nije prisutan u svim vrstama roda *Gallus*. Nakon pronalaska kokota kod kojeg nije nađen integrirani endogeni ALV, od njega je potekla linija kokoši slobodnih od ALV ERV-a, čime je potvrđeno da sekvence ALV nisu esencijalne za život kokoši (Weiss, 2006). No unatoč tome, navedene kokoši sadržavale su jedan drugi ERV, nazvan endogeni ptičji retrovirus (eng. *Endogenous avian retrovirus*, EAV). EAV nije infektivan i nalazi se u svim vrstama roda *Gallus*, što znači da je porijeklom stariji od ALV-a.

Treća vrsta ptičjih ERV-a je virus retikuloendotelioze (eng. *Reticuloendotheliosis virus*, REV), koji se ne ugrađuje u genom domaćina, već se nalazi u genomu herpersivirusa koji uzrokuje Marekovu bolest u peradi. Tako se virus endogenizirao u genom većeg i složenijeg DNA-virusa (Weiss, 2006).

2.1.6.4.1. Ptičji endogeni retrovirusi u cjepivima

Budući da se neka živa atenuirana virusna cjepiva, kao što je cjepivo protiv ospica, protiv mumpsa ili na primjer žute groznice, proizvode na primarnoj kulturi pilećih fibroblasta ili u embrioniranim jajima, bilo je za očekivati da će se endogeni retrovirusi prisutni u pilećim stanicama također moći detektirati i u virusnim cjepivima. Navedeno je dokazano za sva virusna cjepiva kod kojih je barem jedna komponenta proizvedena na pilećem supstratu (Böni i sur., 1996; Weissmahr i sur., 1997; Robertson i sur., 1997; Maudru i sur., 1998; Khan i sur., 1998; Tsang i sur., 1999; André i sur., 2000; Johnson i sur., 2001 i 2003; Shahabuddin i sur., 2001; Hussain i sur., 2001 i 2003; Victoria i sur., 2010). Dokazano je da aktivnost RT očitana u virusnim cjepivima potječe upravo od endogenih retrovirusa prisutnih u proizvodnom supstratu. Aktivnost RT vezana je barem dijelom uz česticu (aktivnost RT ne prolazi kroz 0,02 μm filtar, dok kroz 0,2 μm filtar prolazi; taloži se u gradijentu gustoće tipičnom za retroviruse; može se istaložiti ultracentrifugiranjem) (Böni i sur., 1996; Weissmahr i sur.,

1997). Identifikacijom RNA vezane uz aktivnost RT otkriveno je da potječe od ALV i EAV (Weissmahr i sur., 1997; Tsang i sur., 1999).



Slika 6. Prikazi elektronske mikroskopije. Strelice pokazuju ALV-slične čestice u talogu supernatanta kulture pilećih fibroblasta (A i B) i u talogu pilećih fibroblasta (C). *Preuzeto iz Tsang i sur., 1999.*

Elektronskom mikroskopijom (Slika 6.) u neinficiranoj kulturi pilećih fibroblasta (talog supernatanta i talog stanica) vizualizirane su čestice retrovirusa tipa C, promjera oko 90 nm, s vanjskom ovojnicom, unutarnjom membranom i centralnim nukleoidom. Ove morfološke karakteristike odgovaraju ALV-česticama.

Europska farmakopeja (Ph. Eur. 07/2010:50202) propisuje da embrionirana kokošja jaja koja se koriste za proizvodnju cjepiva moraju biti iz SPF (eng. *specific pathogen free*) jata kokoši, kod kojih je uvjetima uzgoja osigurano da su slobodna od propisanih stranih agensa, uključujući i retroviruse. U kokoši se odgovarajućim imunoenzimskim testom provjerava prisutnost, među ostalim, egzogenih ALV-a. Ukoliko se SPF jato kokoši pokaže da je pozitivno na prisutnost ALV-a ili bilo kojeg drugog stranog agensa, jato više nije SPF i ne može se koristiti za pripremu cjepiva. Ovim testiranjem je Ph. Eur. osigurala da se za proizvodnju cjepiva ne koriste embrionirana jaja koja sadrže egzogene ALV čestice, no ne propisuje testiranje na prisutnost endogenih ALV čestica. Ph. Eur. također ne propisuje testiranje na prisutnost EAV, premda se nalazi u svim virusnim cjepivima testiranima na prisutnost sekvence endogenih retrovirusa. S EAV sekvenci se stvaraju neinfektivne čestice koje sadrže RT. Budući da je pokazano da ptičji retrovirusi mogu upakirati glikoproteine na primjer VSV-a (eng. *Vesicular stomatitis virus*), bilo bi korisno pokazati mogu li upakirati hemaglutinin ili fuzijske proteine virusa ospica ili mumpsa i tako steći tropizam za ljudske stanice (Weiss, 2001).

2.1.6.4.2. Infektivnost ptičjih endogenih retrovirusa

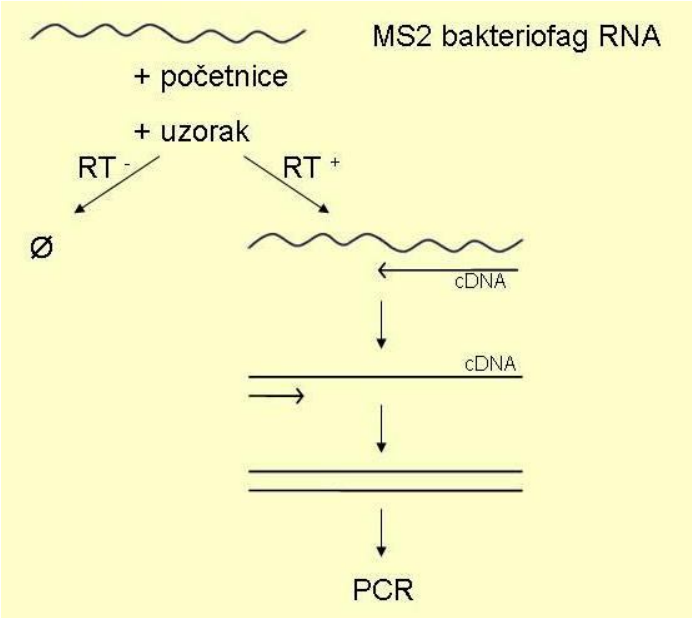
Testiran je prijenos aktivnosti RT porijeklom iz PERT-test pozitivnih uzoraka. Studije u kojima su s PERT-test pozitivnim uzorkom inficirane različite životinjske ili ljudske stanične kulture pokazale su da u tim kulturama nema porasta aktivnosti RT, odnosno da nije došlo do infekcije ptičjim ERV-om (Robertson i sur., 1997; Khan i sur., 1998).

Istražene su također mononuklearne stanice periferne krvi ljudi cijepljenih s cjepivima proizvedenima na pilećem supstratu (Tsang i sur., 1999; Shahabuddin i sur., 2001). U navedenim stanicama nisu pronađene sekvence bilo EAV-a bilo ALV-a. U serumima 206 cijepljene djece nisu nađena protutijela na endogeni ALV, od toga u limfocitima periferne krvi stotinu djece nije nađena prisutnost ni ALV ni EAV provirusnih sekvenci (testiranje PCR-om) (Hussain i sur., 2001). Također, u serumima 200 djece koja su primila cjepivo protiv ospica, mumpsa i rubele nisu pronađena protutijela na EAV kapsidni protein (Johnson i sur., 2003). U serumima 43 osobe koje su primile cjepivo protiv žute groznice nisu pronađena protutijela na EAV kapsidni protein, niti protutijela na ALV, niti su detektirane EAV ili ALV sekvence pomoću RT-PCR-a (Johnson i sur., 2003; Hussain i sur., 2003).

Svi ovi dokazi upućuju na neškodljivost cjepiva proizvedenih na pilećem supstratu, odnosno na neinfektivnu prirodu EAV-a i ALV-a.

2.2. PERT-test

Konvencionalni test za otkrivanje aktivnosti reverzne transkriptaze (RT), odnosno prisutnosti nepoznatih retrovirusa, uključuje ugradnju obilježenih nukleotida u novonastajuću DNA i potom očitanje količine ugrađenih nukleotida. Taj je test znatno manje osjetljiv od testova koji se koriste za detekciju poznatih retrovirusa, kao što su imunotestovi ili pogotovo PCR-testovi. Budući da retrovirusi izazivaju razne bolesti u ljudi i životinja, a svima je zajednička prisutnost RT, razvijen je vrlo osjetljiv test za otkrivanje prisutnosti nepoznatih retrovirusa preko aktivnosti RT (Pyra i sur., 1994). Test je nazvan eng. ***p**roduct **e**nhanced **r**everse **t**ranscriptase* test, odnosno PERT-test (Slika 7.). Ukoliko testni uzorak sadrži RT, ona će prepisati poznati RNA kalup porijeklom iz bakteriofaga MS2 u cDNA. cDNA će se zatim umnožiti PCR-om, nakon čega će se PCR produkti detektirati. MS2-RNA izabrana je kao kalup za test jer bakteriofag iz kojeg potječe tijekom replikacije nema DNA-intermedijer i jer DNA-polimeraze imaju slabiji afinitet za tu molekulu RNA nego za sintetske kalupe (Pyra i sur., 1994). Kalup je dodatno stabiliziran inhibitorom RNaze, kako stanične RNaze iz uzorka ne bi razgradile kalup i tako dale lažno negativan rezultat testa.



Slika 7. Princip PERT-testa.

2.2.1. Lažno pozitivni rezultati PERT-testa

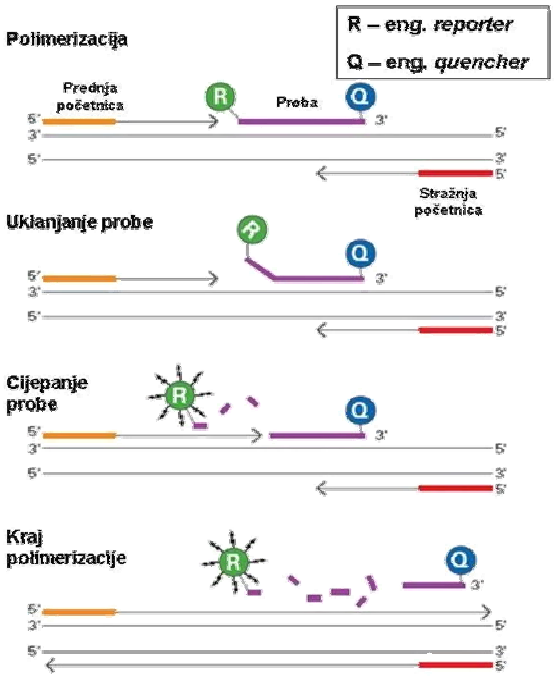
Budući da je PERT-test vrlo osjetljiv, odmah je uočena pojava lažno pozitivnih rezultata (Pyra i sur., 1994). Uzorak za PERT-test je uglavnom supernatant stanične kulture, koja može sadržavati žive netaknute stanice, ali i lizirane stanice iz kojih potječu razne stanične polimeraze, kao i drugi nuklearni enzimi povezani s RT-sličnom aktivnosti. Tako je pokazano da pročišćene DNA-polimeraze α, γ i δ daju pozitivan rezultat u PERT-testu (Lovatt i sur., 1999). Budući da nije vjerojatno da u uzorku za PERT-test postoji velik broj liziranih stanica od kojih bi potekla visoka koncentracija DNA-polimeraza, i s obzirom na labilnu prirodu tih enzima, doprinos DNA-polimeraza pozitivnom nalazu PERT-testa nije velika (Brorson i sur., 2002). Još jedan izvor aktivnosti RT mogu biti telomeraze, no budući da u testu nema specifičnog kalupa za njihovu aktivnost, nije vjerojatno da doprinose pozitivnom signalu.

Od reagencija za PERT-test, uočeno je da inhibitor RNaze također sadrži RT-sličnu aktivnost (Pyra i sur., 1994). Navedena se aktivnost može izbjeći provjerom svake serije inhibitora prije upotrebe za test i korištenjem samo onih serija koji nemaju RT-sličnu aktivnost (Pyra i sur., 1994). Također, uočena je potreba da se svaka serija MS2-RNA-kalupa provjeri prije testiranja, jer potječe iz bakteriofaga uzgojenog u bakteriji te je moguća kontaminacija bakterijskim polimerazama ili prisutnost reverzno transkribirane MS2-RNA (preko prokariotskih retroelemenata) (Brorson i sur., 2002; Kothapalli i sur., 2003). *Taq*-polimeraza također ima RT-sličnu aktivnost (Jones i sur., 1989; Pyra i sur., 1994; Maudru i sur., 1997). Ta je aktivnost eliminirana na nekoliko načina, (1) uvođenjem koraka razgrađivanja RNA

nakon koraka reverzne transkripcije (Maudru i sur., 1997) kako DNA-polimeraza ne bi imala kalup za prepisivanje ili (2) dodatkom kompetitivne molekule DNA za koju polimeraza ima veći afinitet nego za RNA (Lovatt i sur., 1999; André i sur., 2000; Voisset i sur., 2001) ili (3) dodatkom heparina koji je inhibitor DNA-polimeraze (Fan i sur., 2006).

2.2.2. PERT-test u stvarnom vremenu

Kako bi se poboljšala detekcija cDNA produkata, uvedena je 5' nukleazna TaqMan®-tehnologija u PCR-korak PERT-testa (Maudru i sur., 1998). Ona koristi 5'-egzonukleaznu aktivnost DNA-polimeraze kojom se sa specifične probe vezane na središnji dio molekule cDNA oslobađa fluorescentni signal. Detekcija produkata se odvija u stvarnom vremenu (eng. *real-time*).



Slika 8. Princip *real-time* PERT-testa.
Preuzeto s: http://www.asuragen.com/images/TaqMan%20GX%20cartoon.jpg

Specifična proba sadrži reportersku boju (R) na jednom kraju i stišavajuću boju (eng. *quencher*, Q) na drugom kraju. Kad su te dvije boje u blizini, nema fluorescentnog signala. Kako DNA polimeraza svojom egzonukleaznom aktivnosti oslobađa R boju, ona se udaljava od Q boje i počinje fluorescirati (de Wit i sur., 2000). PERT-test u stvarnom vremenu je osjetljiviji od PERT-testa s različitim načinom detekcije PCR produkata, razlučuje stvarnu aktivnost RT od RT-slične aktivnosti (Lovatt i sur., 1999), nema potrebe za korištenjem reagencija opasnih za zdravlje, kao što je etidijev bromid i rezultat se dobije u znatno kraćem vremenu. Opisano je i provođenje PERT-testa u stvarnom vremenu unutar samo jedne

reakcijske epruvete, uz korištenje Ampliwax®-kuglica kako bi se odijelila RT-reakcija od PCR-reakcije (Sears i sur., 2003; Fan i sur., 2006; Ma i sur., 2009). Navedene kuglice napravljene su od voska i stavljaju se u epruvetu povrh RT-reakcijske smjese, zagriju se da se otope i stvore čvrsti sloj iznad smjese. Na taj sloj dodaje se zatim PCR-reakcijska smjesa. Nakon RT-reakcije povisuje se temperatura uslijed čega se otopi sloj voska i PCR-reakcijska smjesa pomiješa se s RT-reakcijskom smjesom u kojoj se nalaze cDNA-produkti. Time se ta dva koraka odvijaju kontinuirano, što dodatno sprječava kontaminaciju.

2.2.3. PERT-test i regulativa

Odmah nakon što je otkriveno da se u živim atenuiranim cjepivima može detektirati aktivnost RT, Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) organizirala je sastanak stručnjaka da evaluira pitanje neškodljivosti takvih cjepiva, prvo u listopadu 1995., a zatim u srpnju 1998. godine (Weekly Epidemiological Report, 1998). Glavni zaključci sastanka bili su da treba ponovo evaluirati sve stanične supstrate za proizvodnju cjepiva, da su cjepiva koja se proizvode na pilećem supstratu vrlo značajna za suzbijanje zaraznih bolesti te da epidemiološki podaci do sad nisu pokazali nikakve neželjene učinke koji bi bili vezani uz prisutnost retrovirusa u cjepivima. Zaključeno je također da je potrebno i dalje pratiti epidemiološke podatke cjepljenika, kao i biološke i druge karakteristike endogenih retrovirusa u pilećim stanicama. U travnju 2005. godine održano je WHO savjetovanje o upotrebi molekularnih metoda za osiguravanje kvalitete, neškodljivosti i učinkovitosti cjepiva, gdje je zaključeno da treba i dalje raditi na razvoju PERT-testa u stvarnom vremenu i da treba odrediti razinu aktivnosti RT kod koje nema rizika za prijenos virusa u modelima *in vivo* i *in vitro* (WHO Conference report, 2007).

Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) uputila je u prosincu 1998. godine pismo svim proizvođačima virusnih cjepiva s uputom kako moraju testirati proizvodni stanični supstrat PERT-testom na prisutnost retrovirusa (CBER Letter to Viral Vaccine Product Manufacturers, 1998). Preporuka za primarne proizvodne stanične kulture je da se testira svaka serija, a za stanične kulture za koje postoji stanična banka, da se testira samo banka. U slučaju pozitivnog nalaza, što se očekuje kod pilećih stanica, potrebno je napraviti test infektivnosti kako bi se dokazalo da pozitivan nalaz ne potječe od infektivnih retrovirusnih čestica.

Europska farmakopeja (Ph. Eur. 01/2011:50203) propisuje testiranje matičnih banki proizvodnih diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura na prisutnost, među ostalim, retrovirusa koristeći PERT-test, uz transmisijsku elektronsku mikroskopiju (TEM). Ph. Eur.

ne propisuje jasne zahtjeve za rezultate PERT-testa i TEM, već kaže kako je u slučaju pozitivnog nalaza jednog ili oba testa potrebno provesti testiranje infektivnosti na ljudskim stanicama. Za PERT-test još navodi kako je vrlo osjetljiv i da pozitivan nalaz može biti dvosmislen te da se odluka o prihvatljivosti matične banke proizvodne stanične kulture mora donijeti na temelju svih raspoloživih podataka. Ph. Eur. ne propisuje da je potrebno testirati primarne stanične kulture pilećih fibroblasta PERT-testom.

2.3. Validacija testa

Validacija testa osigurava da je test dobar za namijenjenu upotrebu. Prema važećoj regulativi, PERT-testom se u biološkim uzorcima otkriva prisutnost neželjenih retrovirusa, pa tako taj test prema validacijskim značajkama najbliže pripada u grupu testova za otkrivanje nečistoća. Opće prihvaćene smjernice za validaciju analitičkih metoda testove za otkrivanje nečistoća dijele na kvantitativne testove i limit testove (ICH Q2(R1), 2005; WHO/VSQ/97.02, 1997). Svrha provođenja PERT-testa nije da kvantificira neželjene retroviruse, niti da se odredi da istih ima manje od neke granice. Svrha provođenja PERT-testa je kvalitativna, da se odredi ima li ili nema neželjenih retrovirusa. U tom smislu se PERT-test ne uklapa u potpunosti u ICH-smjernice, tako da je kod validacije PERT-testa važan znanstveno opravdan zdravorazumski pristup, imajući na umu principe i svrhu testa.

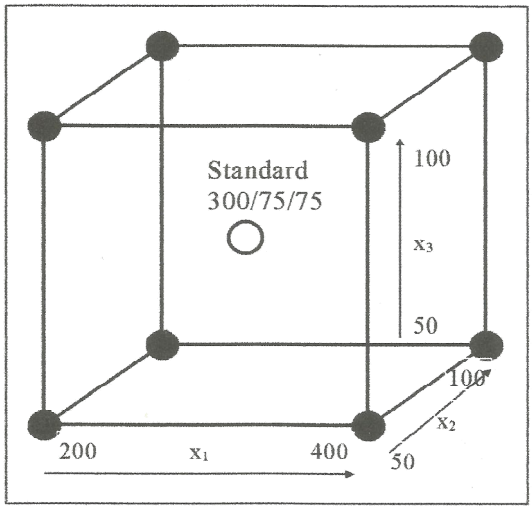
U validaciji PERT-testa istražena je njegova osjetljivost na detekciju reverzne transkriptaze (RT) porijeklom iz različitih retrovirusa (ptičjeg, mišjeg i ljudskog). Razrjeđivanjem RT pokazana je linearnost kroz razrjeđenja i posredno točnost testa. Usporedbom linearnih pravaca dobivenih iz više testova dokazana je njihova paralelnost i ponovljivost testa. Također je utvrđen raspon testa i granica detekcije. Istraživanjem otpornosti (eng. *robustness*) i izdržljivosti (eng. *ruggedness*) testa pokazano je koje namjerne manje promjene u parametrima testa utječu na rezultate PERT-testa. Općenito, kod otpornosti testiraju se skalabilni parametri unutar same metode (npr. temperatura, pH, vrijeme inkubacije, koncentracije reagencija), dok se kod izdržljivosti testiraju neskalabilni parametri koji se izvana unose u metodu (npr. različiti analitičari, proizvođači reagencija) (Araujo, 2009; Kutle i sur., 2010).

2.4. Dizajn eksperimenata

Dizajn eksperimenata (eng. *design of experiments*, DoE) je pristup sustavnog testiranja efekata više parametara (faktora) na istraživani postupak. Koristi se u razvoju novih proizvoda i procesa, kao i njihovom unaprjeđivanju ili istraživanju otpornosti te u pronalaženju faktora

koji su značajni za neki proizvod i proces (Markusic i sur., 2012). Navedeno u konačnici dovodi do pronalaženja optimuma u kojem je postignuta najbolja moguća kvaliteta uz najmanje troškove, te do spoznaje o rasponu parametara procesa unutar kojih ne dolazi do značajnog utjecaja na kvalitetu procesa ili krajnjeg proizvoda.

DoE se provodi na način da se istovremeno sustavno testiraju svi parametri za koje se smatra da imaju utjecaj na proizvod/proces. Razlikuje se od pristupa u kojem se testira utjecaj jednog po jednog parametra, koji je dugotrajan i skuplji.



Slika 9. Princip DoE - *Preuzeto iz Eriksson i sur., 2000, „Design of Experiments, Principles and Applications", Umetrics Academy, ISBN 91-973730-0-1.*

Princip provođenja DoE je takav da se definira neki standardni operativni uvjet (centralna vrijednost) i zatim provede niz eksperimenata oko te standardne vrijednosti. Navedeno je prikazano na Slici 9. Kao standardni uvjeti uzete su vrijednosti 300 za prvi parametar (x_1), 75 za drugi parametar (x_2) i 75 za treći parametar (x_3). U sljedećem koraku ovi se parametri variraju kako je naznačeno na kocki (x_1 se testira na razini 200 i na razini 400, x_2 i x_3 svaki na razini 50 i na razini 100), sustavno oko centralne vrijednosti. Na kraju se izračuna koji operativni parametar ima kakav utjecaj na proizvod/proces (Eriksson i sur., 2000). Ovakav pristup omogućava definiranje takozvanog „prostora dizajniranja" (eng. *design space*), kao multidimenzionalne kombinacije i interakcije ulaznih parametara i parametara procesa za koje je dokazano da nemaju utjecaja na kvalitetu proizvoda/procesa (ICH Q8). Ovaj pristup testiranja jedan je od temelja modernog pristupa dizajniranja kvalitete (eng. *Quality by Design*, QbD) u farmaceutskoj industriji (ICH Q8).

2.5. Tekućinska kromatografija

Kromatografija obuhvaća niz metoda za razdvajanje molekula u kojima se one raspodjeljuju između dvije faze: stacionarne i mobilne. Odvajanje se temelji na razlikama u svojstvima molekula zbog kojih se različite molekule različito dugo zadržavaju na stacionarnog fazi. Tekućinska kromatografija, u kojoj je mobilna faza tekuća, a stacionarna faza kruta i nalazi se u koloni, najčešće se koristi u izolaciji i pročišćavanju biomolekula u farmaceutskoj industriji, zahvaljujući tome što je osjetljiva, brza i učinkovita. Najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), u novije vrijeme i eng. *ultra high pressure liquid chromatography*, UPLC.

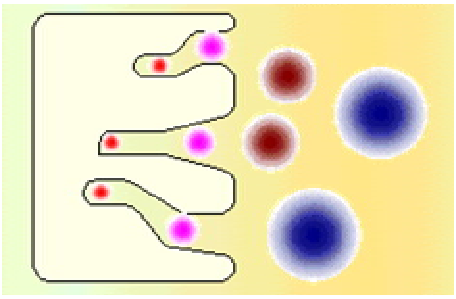
Ovisno o tipu kromatografskog odijeljivanja molekula, tekućinske kromatografije se dijele na:

1. molekulsko prosijavanje
2. hidrodinamičku kromatografiju
3. *slalom*-kromatografiju
4. adsorpcijske kromatogafske metode.

2.5.1. Molekulsko prosijavanje, hidrodinamička i *slalom*-kromatografija

Molekulskim prosijavanjem, tj. gel filtracijom, dolazi do razdvajanja molekula na temelju njihove veličine u odnosu na veličine pora stacionarne faze. Manje molekule ulaze u pore stacionarne faze, zbog čega duže putuju kroz kolonu, dok veće molekule ne mogu ući u pore i brže se ispiru (eluiraju) s kolone (Stryer, 1996) (Slika 10.).

U hidrodinamičkoj i *slalom*-kromatografiji razdjeljivanje molekula ovisi ponajviše o učinku toka mobilne faze. Odjeljivanje u ovoj vrsti kromatografije odvija se procesom konvekcije (kovekcija znači da se molekule kreću nošene strujanjem mobilne faze). *Slalom*-kromatografija je princip odvajanja koji se koristi za pročišćavanje velikih molekula DNA na kolonama za molekulsko prosijavanje. Budući da se dugački lanci DNA omotaju oko struktura na stacionarnoj fazi, brže se eluiraju manje molekule.

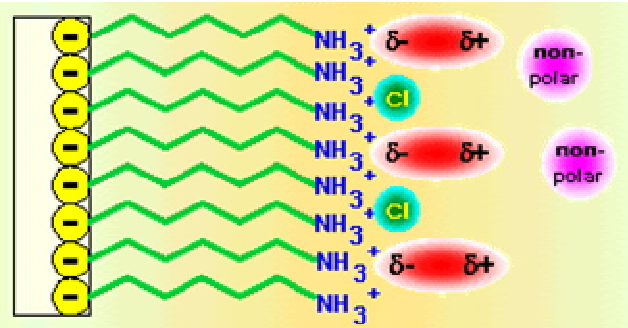


Slika 10. Molekulsko prosijavanje.
Preuzeto s: http://kinardf.people.cofc.edu/221LabCHEM/CHEM221L%20Gas%20Chromatography%20of%20Methyl%20Salicylate.htm

2.5.2. Adsorpcijske kromatografske metode

Za razliku od ranije navedenih kromatografskih metoda u kojima se molekule razdvajaju na temelju veličine i ne vežu se za stacionarnu fazu, u adsorpcijskim kromatografskim metodama molekule se vežu na aktivna mjesta stacionarne faze. Molekule koje nemaju afinitet da se vežu na stacionarnu fazu samo prolaze kroz kolonu. Vezane molekule otpuštaju se s kolone dodatkom tvari koja ih istiskuje uslijed kompeticije za vezanje na aktivna mjesta. Što su molekule čvršće vezane na stacionarnu fazu, to će se kasnije s nje otpustiti. Otpuštene (eluirane) molekule najčešće se skupljaju u zasebnim frakcijama. Postoji više vrsta adsorpcijskih kromatografskih metoda, ovisno o prirodi veze između tvari iz mobilne faze i aktivnih grupa na stacionarnoj fazi (ionska izmjena, afinitetna kromatografija, kromatografija hidrofobnih interakcija i reverzno-fazna kromatografija).

U ionskoj izmjeni kao stacionarna faza koristi se nosač koji je pozitivno ili negativno nabijen, kako bi se tvari iz mobilne faze koje su suprotnog naboja mogle na njega vezati (Slika 11.). Nosači koji nose pozitivni naboj i tako vežu negativno nabijene molekule nazivaju se anionski izmjenjivači. S druge strane, nosači koji nose negativan naboj i tako vežu pozitivno nabijene molekule nazivaju se kationski izmjenjivači. Tvari čiji je ukupni naboj površine mali, slabije će se vezati na nosač (Stryer, 1996). Otpuštanje vezanih tvari postiže se porastom koncentracije soli u puferu, tijekom čega ioni iz pufera uzrokuju desorpciju vezanih tvari.



Slika 11. Kromatografija ionskom izmjenom.
Preuzeto s: http://kinardf.people.cofc.edu/221LabCHEM/CHEM221L%20Gas%20Chromatography%20of%20Methyl%20Salicylate.htm

2.5.2.1. Nosači u adsorpcijskoj kromatografiji

Nosači u adsorpcijskoj kromatografiji trebaju zadovoljiti niz uvjeta koji će osigurati da se tvari iz mobilne faze mogu učinkovito vezati i otpustiti, da kapacitet kolone bude što veći, da bude dovoljno čvrst da može izdržati visoke protoke, da bude kemijski i fizički stabilan tijekom održavanja, i drugo. S obzirom na fizička svojstva, kromatografski nosači mogu biti građeni od (1) kuglica, mogu biti (2) membrane i mogu biti (3) monolitni nosači.

(1) S obzirom na poroznost kuglica, kromatografski nosači mogu biti građeni od poroznih kuglica (porozni nosači), neporoznih kuglica (neporozni nosači) ili protočnih (gigaporoznih) kuglica (protočni-gigaporozni nosači). Na površini i u unutrašnjosti poroznih nosača nalaze se ligandi za vezanje tvari iz mobilne faze. Tvari iz mobilne faze teku konvekcijom kroz prostor između kuglica, odnosno difuzijom unutar pora kuglica. Najveći dio površine ovih nosača nalazi se u porama kuglica, a poroznost iznosi oko 0,5 (50%). Budući da su velike biomolekule i virusi često veći od pora poroznih nosača, njihov kapacitet za ovu vrstu uzorka je vrlo mali (Jungbauer i sur., 2008).

Odvajanje na neporoznim nosačima odvija se samo na njihovoj površini, zbog čega je brzina odvajanja makromolekula povećana. No, budući da nemaju pore, površina ovih nosača je smanjena, a time i kapacitet.

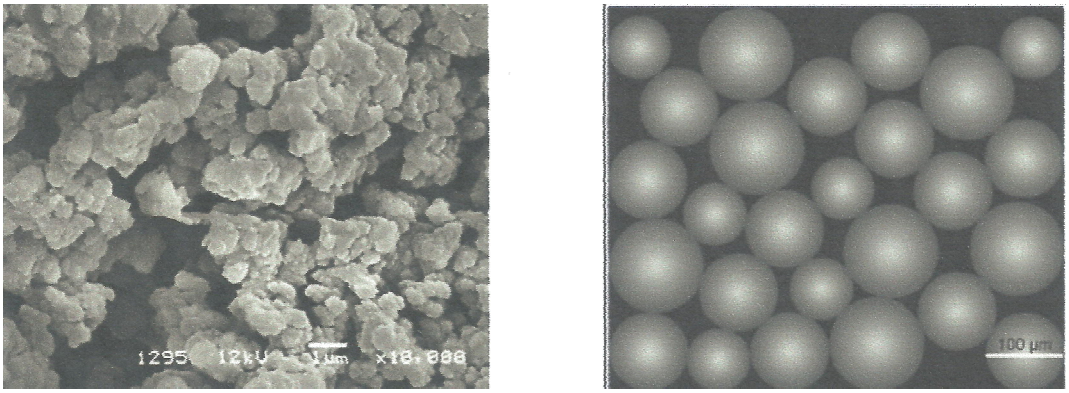
Kako bi se zaobišli nedostaci poroznih i neporoznih nosača, razvijen je protočni nosač, koji pored pora u koje tvari iz mobilne faze ulaze difuzijom imaju i pore kroz koje tvari teku konvekcijom. Uz zadržani visoki kapacitet, najvažnija karakteristika ovih nosača je da ne dolazi do povećanja tlaka povećanjem brzine protoka.

Najveći nedostatak navedenih nosača je da ne ispunjavaju čitav prostor kolone, čime im je smanjena učinkovitost (Strancar i sur., 2002). Također, u ovim nosačima postoji velika razlika u brzini toka mobilne faze kroz različite dijelove nosača, što uzrokuje nastanak vrtloga koji mogu oštetiti labilne biomolekule.

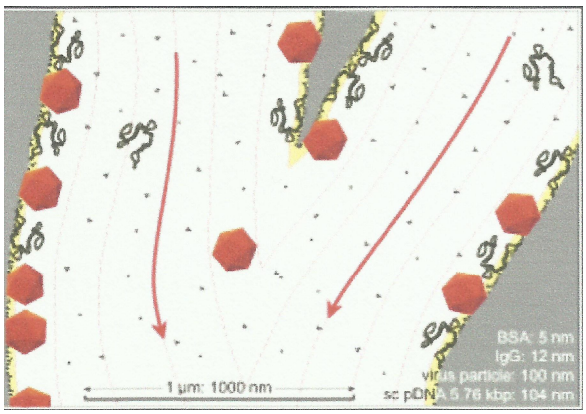
(2) Membrane su građene od vlaknastih struktura s velikim kanalima. Obično se sastoje od više slojeva membrane i debljine su nekoliko milimetara. Tvari u mobilnoj fazi se kroz njih kreću konvekcijom. U njima ne dolazi do povećanja tlaka povećanjem brzine protoka, no imaju vrlo veliki mrtvi volumen (Barut i sur., 2005).

(3) Monolitni nosači riješili su mnoge nedostatke uočene kod gore opisanih vrsta nosača (Slika 12.). Smatraju se četvrtom generacijom kromatografskih stacionarnih faza. Građeni su od jednog dijela, od vrlo poroznog materijala. Imaju otvorene, protočne pore koje čine mrežu kanala kroz koje teče mobilna faza. Glavne značajke su da je vrlo porozan (0,9, odnosno 90%), da ima visoku moć vezanja vrlo velikih molekula te da se tvari kreću konvekcijom. Tok mobilne faze je laminaran i bez turbulencija, što sprječava oštećivanje labilnih biomolekula. Zbog povećane poroznosti, smanjen je tlak u nosaču za oko 400 puta. Poroznost i veličina pora su nezavisne i mogu se namještati po želji (Podgornik i sur., 2013). (Slika 13.)

Monolitni nosači mogu biti napravljeni od silikata ili od organskih materijala kao što su poliakrilamid, celuloza, polivinil, stiren ili metakrilat.



Slika 12. Usporedba monolitnog nosača (lijevo) i nosača s kuglicama (desno). *Preuzeto s: http://www.validated.com/revalbio/pdffiles/London.pdf.*

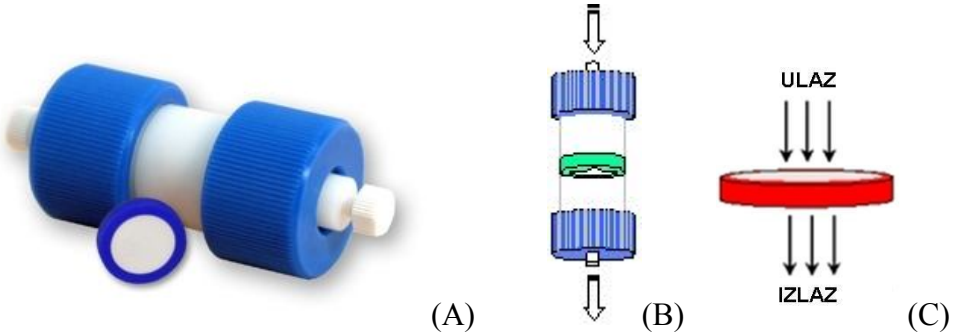


Slika 13. Tok mobilne faze kroz pore monolitnog nosača. Siva područja označavaju materijal monolita, bijela područja označavaju prostor pore, a crvene strelice označavaju laminarno strujanje. *Preuzeto s: http://www.validated.com/revalbio/pdffiles/London.pdf*

2.5.2.1.1. Metakrilatni monolitni diskovi CIM

Convective Interaction Media® (CIM) diskovi dobili su ime upravo po svojstvu da tvari iz mobilne faze prenose konvekcijom (Branovic i sur., 2003). Građeni su od čvrstog i visoko umreženog polimera metakrilata, s porama promjera od 100-1500 nm (Slika 13.). Kemijskom modifikacijom na metakrilatnu površinu postavljene su različite aktivne skupine. Dvije takve skupine su kvarterni amin i sulfonil. Kvarteni amin aktivna je skupina u CIM-QA-disku, koji je jaki anionski izmjenjivač prikladan za različite primjene, a posebno za purifikaciju virusa, DNA i velikih proteina. Može se također koristiti za uklanjanje endotoksina. Sulfonil je aktivna skupina u CIM-SO_3-disku, koji je jaki kationski izmjenjivač koji se ponajviše koristi

za odvajanja velikih molekula kao što su proteini i manjih molekula kao što su peptidi. Prikladan je i za pročišćavanje virusa. CIM-QA-disk uspješno je primijenjen za pročišćavanje virusa rubele, pri čemu je zadržana infektivnost virusa (Forčić i sur., 2011). Također se koristi za koncentriranje virusa mozaične bolesti rajčice (eng. *Tomato mosaic virus*, ToMV) (Kramberger i sur., 2004 i 2007). I druge vrste CIM-diskova mogu se koristiti za pročišćavanje virusa, kao što su virus morbila ili mumpsa (Branović i sur., 2003), ili za pročišćavanje virusnih i satelitnih molekula RNA (Krajačić i sur., 2007).



Slika 14. (A) CIM-disk i pripadajuće kućište; (B) i (C) Smjer toka mobilne faze.
Preuzeto s: http://www.biaseparations.com/sp/227/cim-laboratory-columns

CIM-QA i CIM-SO_3-diskovi korišteni su u ovom radu. Njihove značajke navedene su u Tablici 2.

Tablica 2. Značajke CIM-QA i CIM-SO_3-diskova.

Vrsta diska:	QA (jaki anionski izmjenjivač; kvarterni amin)	SO_3 (jaki kationski izmjenjivač; sulfonil)
Promjer pora:	prosječno 600-750 nm	prosječno 600-750 nm
Matriks:	poli(glicidilmetakrilat-ko-etilendimetakrilat)	poli(glicidilmetakrilat-ko-etilendimetakrilat)
Dimenzije diska:	promjer: 12,0 mm debljina: 3,0 mm volumen: 0,34 ml	promjer: 12,0 mm debljina: 3,0 mm volumen: 0,34 ml
Prsten oko diska:	polietilen visoke gustoće unutarnji promjer: 12,0 mm vanjski promjer: 16,0 mm	polietilen visoke gustoće unutarnji promjer: 12,0 mm vanjski promjer: 16,0 mm
Kapacitet dinamičkog vezanja:	≥21 mg BSA/ml (uvjeti: BSA 1,0 mg/ml, 20 mM Tris-HCl pufer, pH 7,4, protok 3 ml/min)	≥21 mg lizozima/ml (uvjeti: lizozim 0,5 mg/ml, 20 mM Tris-HCl pufer, pH 7,4, protok 3 ml/min)
Protok:	2-4 ml/min (max. 6 ml/min)	2-4 ml/min (max. 6 ml/min)
Tlak:	do 50 bara (5MPa)	do 50 bara (5MPa)
Temperaturna stabilnost:	4-40 ºC	4-40 ºC
pH:	za rad 2-13 za čišćenje 1-14	za rad 2-13 za čišćenje 1-14
Otopina za pohranu:	20% etanol	20% etanol
Rok valjanosti:	3 godine	3 godine

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Reagencije i otopine

Koristila sam reagencije visokog stupnja čistoće i kvalitete. Svojstva pojedinih reagencija navedena su u dokumentaciji priloženoj od strane proizvođača. Sve otopine pripremila sam u kabinetima s laminarnim strujanjem zraka. Gdje je bilo moguće, reagencije i otopine razdijelila sam u odgovarajuće volumene za jednokratnu upotrebu kako bih izbjegla mogućnost kontaminacije.

3.1.1. Reagencije i otopine za PERT-test

- standard za PERT-test – AMV-RT (Roche i Finnzymes)
- RT porijeklom iz mišjeg retrovirusa – MLV-RT (Invitrogen)
- RT porijeklom iz ljudskog retrovirusa – HIV-RT (Ambion)
- AMV-RT 5× pufer (Roche)
- specifične početnice (Applied Biosystems i Eurofins MWG Operon), 25 pmol/µl (Tablica 3.)
- fluorescentno obilježena proba (Applied Biosystems i Eurofins MWG Operon), 7,5 pmol/µl (Tablica 3.)
- MS2-RNA (Roche, 10 A_{260} jedinica (0,8 µg/µl) iz bakteriofaga MS2)
- komercijalna otopina za preciznu kvantifikaciju lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (2 × TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems)
- inhibitor RNaze (Applied Biosystems), 20 J/µl
- RNaza A iz goveđe gušterače (USB), 500 ng/µl
- dNTP smjesa (GE Healthcare) (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), pojedinačnih koncentracija 0,25 nmol/µl
- 10× PCR-pufer (GE Healthcare)
- voda koja ne sadrži RNazu (USB)
- pufer za lizu (50 mM Tris, pH 7,5; 80 mM KCl; 2,5 mM DTT; 0,75 mM etilendiamintetraoctene kiseline (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) i 0,5% Triton X-100 u dietilpirokarbonat-(diethylpyrocarbonate, DEPC)-vodi). Priprema DEPC-vode: pomiješa se 1000 ml destilirane vode s 1 ml dietilpirokarbonata, otopina se ostavi minimalno 4 sata na sobnoj temperaturi i potom autoklavira.

Tablica 3. Početnice za PERT-test.

Oznaka	Slijed nukleotida
Oligonukleotidna početnica A	5'-GCC TTA GCA GTG CCC TGT CT-3'
Oligonukleotidna početnica B	5'-AAC ATG CTC GAG GGC CTT A-3'
Fluorescentno obilježena proba	5'-FAM-CCC GTG GGA TGC TCC TAC ATG TCA-TAMRA-3'

3.1.2. Reagencije i otopine za održavanje staničnih kultura i infekciju stanica virusom

- MEM-H(N)[1]
- DMEM-H(N)[1]
- fetalni goveđi serum (FBS[1])
- tripsin[2] (Difco)
- EDTA[2] (Merck)
- tripansko modrilo 0,4%
- 0,5 %-tna suspenzija zamoračkih eritrocita za hemadsorpciju
- fiziološka otopina za ispiranje eritrocita

3.1.3. Reagencije i otopine za kromatografiju na kolonama CIM

- NaCl (Kemika)
- HCl (Kemika)
- NaOH (Kemika)

Za kromatografska odvajanja koristila sam pufere:

- pufer za vezanje (eng. *binding buffer*, BB) za QA-disk: 50 mM Tris pH = 8,5
- pufer za eluciju (eng. *elution buffer*, EB) za QA-disk: 50 mM Tris pH = 8,5 + 1 M NaCl
- pufer za vezanje (BB) za SO_3-disk: 50 mM citratni pufer pH = 4,4
- pufer za eluciju (EB) za SO_3-disk: 50 mM citratni pufer pH = 4,4 + 1 M NaCl

Pufere sam pripremila s pročišćenom vodom (Simplicity 185, Millipore). pH pufera podesila sam otopinom HCl i NaOH. Puferi su filtrirani kroz 0,45 μm filtar.

- otopine za regeneraciju CIM-diska: 2 M NaCl i 0,5 M NaOH; obje otopine sam filtrirala kroz 0,45 μm filtar
- otopina za čuvanje CIM-diska: 20%-tni etanol

[1] Stanice se kultiviraju u mediju MEM-H(N) (*Minimum Essential Medium* s *Hanks*-ovim solima i *Neomicin*-om) ili DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) s ili bez dodatka FBS-a (*Foetal Bovine Serum*).
[2] Otopina za odvajanje stanica od podloge je 0,25%-tna otopina tripsin-EDTA

3.2. Oprema, računalni programi i potrošni materijal

- StatSoft® Statistica Version 6.0 i 6.1
- Excel, MS Office 2003
- sustav za HPLC ÄKTA purifier 100 gradient cromatographic system s programskim paketom UNICORN (GE Healthcare)
- kromatografske kolone CIM:
  Convective Interaction Media® (CIM®) QA-disk Monolithic Column (BIA Separations)
  Convective Interaction Media® (CIM®) SO_3 Disk Monolithic Column (BIA Separations)
- kućište za disk CIM (BIA Separations)
- Hera Safe kabineti za rad u aseptičnim uvjetima s okomitim strujanjem zraka (Heraeus Instruments)
- stolna centrifuga s hlađenjem 5810 R (Eppendorf)
- Optima^{TM} XL-80K ultracentrifuga (Beckman Coulter)
- rotor SW 55 Ti (Beckman Coulter)
- sustav za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu: termociklički amplifikator 7500 Real Time PCR System i program 7500 System SDS (Applied Biosystems)
- vaga PB303-S DeltaRange (Mettler Toledo)
- mikroepruvete za PCR (Applied Biosystems)
- čepovi za mikroepruvete (Applied Biosystems)
- pločice za PCR s 96 mikroepruveta (Applied Biosystems)
- pokrovna folija za pločice za PCR (Applied Biosystems)
- Ampliwax kuglice (Applied Biosystems)
- Eppendorf epruvete od 0,5 ml, 1,5 ml i 2,0 ml (Eppendorf) – epruvete su prije korištenja autoklavirane na +121 ºC/20 minuta/1030 hPa
- epruvete za ultracentrifugu za SW 55 Ti rotor; thinwall polyallomer (Beckman Coulter) – epruvete su prije korištenja autoklavirane na +121 ºC/20 minuta/1030 hPa
- polipropilenske (PP) sterilne epruvete za centrifugu od 15 ml i 50 ml (Costar)
- filtar s porama 0,22 μm i 0,45 μm (Costar)
- jednokratna polipropilenska štrcaljka i igla za štrcaljku
- polipropilenske (PP) boce za kultivaciju stanica za jednokratnu upotrebu, 75 cm^2 i 150 cm^2 (Costar)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica i ravnim dnom (Sarstedt i TPP)
- Bürker-Türk i Neubauerova komora za brojanje stanica
- automatske pipete (10 μl, 20 μl, 200 μl i 1000 μl) (Eppendorf, Gilson)

- nastavci za automatske pipete (10 µl, 20 µl, 200 µl i 1000 µl) (Eppendorf, Gilson)
- pipete za jednokratnu upotrebu (1, 5, 10 i 25 ml) (Costar)
- pipetor (Costar)
- staklene epruvete (13 x 100 mm)
- staklene boce (100, 500 i 2000 ml) i pripadajući čepovi
- stalak za epruvete
- stalak za pipete
- kompresa od netkanog materijala
- odljevnica
- invertni mikroskop (Nikon, Leitz)
- inkubator s kontroliranom temperaturom i CO_2 (Heraeus)
- klima komore (2-8 ºC i 35 ± 2 °C) (Imunološki zavod d.d.)
- hladnjaci 2-8 ºC, -20 ºC ili niže, -60 ºC ili niže (Obod-Bauknecht, New Brunswick Scientific)

3.3. Biološki materijal

3.3.1. Embrionirana jaja i primarna kultura pilećih fibroblasta

Primarna kultura pilećih fibroblasta pripremljena je od embrija porijeklom iz SPF (eng. *specific pathogen free*) jaja (Charles River). SPF-jaja porijeklom su od jata kokoši koja se uzgajaju na način da se eliminiraju svi poznati egozgeni virusi.

Albumen sam uzela iz jaja obilježenih s 1-5 od 12.11.2009. (za kontrolnu staničnu kulturu pod brojem 159). Alantoisnu tekućinu uzela sam iz jaja obilježenih s 1, 4 i 6 od 25.03.2010. (za kontrolnu staničnu kulturu pod brojem 161).

3.3.2. Diploidne stanične kulture

Stanična kultura MRC-5 (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Accession No. 660902) je diploidna kultura stanica pluća muškog ljudskog fetusa. Testirala sam stanične kulture u PDL[3]-ima n=13 i 17.

[3] PDL (eng. population doubling level) je stupanj podvostručenja populacije; računa se prema jednadžbi: $PDL=\log_{10}(N/N_0)\times 3{,}33$, gdje je N broj stanica u boci za kultivaciju na kraju perioda rasta, a N_0 broj inokuliranih stanica

3.3.3. Kontinuirane stanične kulture

Stanična kultura Vero (ECACC, kataloški broj 84113001) je kontinuirana kultura stanica epitela bubrega afričkog zelenog majmuna. Korištena je u 36. pasaži.

Stanična kultura Vero WHO (ECACC, kataloški broj 88020401) je podlinija kontinuirane kulture stanica epitela bubrega afričkog zelenog majmuna. Korištena je u 145. pasaži.

Stanična kultura A549 (ECACC, kataloški broj 86012804) je kontinuirana kultura stanica ljudskog bazalnog epitela alveolarnog adenokarcinoma. Testirala sam jednu staničnu kulturu u 11., 12. i 13. pasaži od odmrzavanja.

Stanična kultura SH-SY5Y (ECACC, kataloški broj 94030304) je kontinuirana kultura stanica dobivenih iz ljudskog neuroblastoma. Testirala sam jednu staničnu kulturu u 10., 11. i 12. pasaži od odmrzavanja.

3.3.4. Virus mumpsa

Koristila sam radnu seriju virusa mumpsa, soj L-Zagreb (Imunološki zavod d.d.); serija RSP 4/04.

3.4. Metode

3.4.1. PERT-test

PERT-test provodi se u svrhu otkrivanja aktivnosti reverzne transkriptaze, te posredno prisutnosti retrovirusa u biološkom materijalu. Test se temelji na sposobnosti RT prisutne u testiranom uzorku da prepiše poznati RNA kalup u molekulu cDNA koja se nakon toga umnoži lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (eng. *real-time* PCR). Za detekciju umnoženih molekula DNA koristi se fluorescentna proba koja se specifično veže za središnji dio molekule DNA. Fluorescencija probe oslobađa se djelovanjem 5'-egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze i proporcionalna je količini umnožene DNA.

Aktivnost reverzne transkriptaze u PERT-testu izražava se preko rednog broja ciklusa PCR-a u kojem fluorescentni signal (odnosno količina umnožene DNA) prvi puta postane izraženiji od pozadinskih signala. Taj ciklus PCR-a naziva se početnim (eng. *threshold cycle*, Ct). Što je veća koncentracija RT u uzorku, to je veća količina umnoženih molekula DNA i Ct se pojavljuje ranije tijekom reakcije PCR-a (veća koncentracija RT → niža vrijednost Ct).

3.4.1.1. Aktivnost reverzne transkriptaze porijeklom iz različitih retrovirusa

U svrhu određivanja osjetljivosti, linearnosti, granica detekcije, raspona, preciznosti te odabira standarda za testiranje bioloških materijala, istražila sam aktivnost reverzne

transkriptaze (RT) porijeklom iz različitih retrovirusa. Testirala sam RT virusa uzročnika mijeloblastoze u ptica (eng. *Avian myeloblastosis virus*, AMV-RT), RT virusa uzročnika imunodeficijencije u ljudi (eng. *Human immunodeficiency virus*, HIV-RT) i RT virusa mišje leukemije (eng. *Murine leukemia virus*, MLV-RT). Također sam istražila otpornost (eng. *robustness*) i izdržljivost (eng. *ruggedness*) PERT-testa.

Opis navedenih validacijskih parametara PERT-testa:

Osjetljivost

Osjetljivost testa istražila sam na način da sam mjerila aktivnost RT porijeklom iz tri različita retrovirusa, prateći niže navedene validacijske karakteristike.

Linearnost

Potvrđivanje linearnosti (samo za kvantitativne metode) uključuje mjerenje različitih koncentracija dobivenih razrjeđivanjem uzoraka, kako bi se odredio raspon koncentracija unutar kojih rezultati pokazuju linearnu međuovisnost. Posredno se dokazuje i točnost metode. Rezultate PERT-testa u ovisnosti o koncentraciji testirane RT prikazala sam grafički, izvršila sam regresijsku analizu rezultata, odredila sam paralelnost pravaca među testovima i definirala sam koeficijent determinacije (R^2).

Granica detekcije

Granicu detekcije odredila sam kao najnižu koncentraciju RT u uzorku pri kojoj je u svim provedenim testovima moguće precizno detektirati pozitivan signal u PERT-testu.

Raspon

Raspon metode odredila sam u linearnom dijelu ovisnosti koncentracije RT i izmjerene aktivnosti RT.

Preciznost

Objektivnu procjenu (ne)preciznosti vezanu uz broj mjerenja iskazala sam preko 95%-tnog intervala pouzdanosti (interval unutar kojeg se s 95%-tnom vjerojatnosti nalazi dobivena vrijednost Ct). Odredila sam 95%-tni interval pouzdanosti za pojedini test, relativnu standardnu devijaciju (koeficijent varijacije) i 95%-tni interval pouzdanosti za srednju vrijednost dobivenu iz svih provedenih testova.

Otpornost

Otpornost metode istražila sam na način da sam:

- varirala volumen 2×TaqMan otopine za PCR i ukupne PCR reakcijske smjese (21 µl otopine u 50 µl smjese i 30 µl otopine u 60 µl smjese)
- varirala koncentraciju dNTP-a u testu (0,25 nmol/µl i 2,5 nmol/µl)
- varirala koncentraciju RNA u testu (0,32 µg/reakciji i 0,032 µg/reakciji)

- usporedila uspješnost provođenja PERT-testa s ili bez Ampliwax kuglica

Izdržljivost

U sklopu istraživanja izdržljivosti testirala sam uspješnost provođenja PERT-testa:

- s AMV-RT od dva različita proizvođača
- s početnicama od dva različita proizvođača
- s AMV-RT 5× puferom
- u pojedinačnim mikroepruvetama i u pločicama s mikroepruvetama

3.4.1.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka supernatanata

- uzorke testiranih supernatanata[4] pohranila sam nakon prikupljanja u zamrzivač na -60 °C ili niže
- dan prije daljnje obrade uzorka, izvadila sam uzorak iz zamrzivača i stavila u hladnjak na 2-8 °C da se otopi
- otopljeni uzorak centrifugirala sam na 7000× *g* kroz 25 minuta na 4 ºC
- supernatant nakon centrifugiranja pretočila sam u epruvetu za centrifugu
- pretočeni supernatant odmah sam filtrirala kroz 0,22 μm filtar
- filtrat sam pohranila na -60 °C ili niže
- dan prije ultracentrifugiranja, izvadila sam jednu epruvetu s -60 °C ili niže i stavila u hladnjak na 2-8 °C da se filtrat otopi
- otopljeni filtrat nanijela sam do vrha u epruvetu za ultracentrifugu (2×5 ml) koju sam potom stavila u nosač (eng. *bucket*), a nosač sam postavila na SW 55 Ti rotor
- postavila sam uvjete vrtnje na ultracentrifugi: 194 000×*g*, 1h, 4 °C, uz maksimalno ubrzavanje i zaustavljanje
- po završetku vrtnje, odbacila sam supernatant i stavila epruvete s otvorom prema dolje na staničevinu da se ocijede; višak kapi pokupila sam s nastavkom pipete
- epruvete sam postavila na stalak s otvorom prema gore i u svaku na talog (nije vidljiv) nanijela po 90 μl pufera za lizu
- nakon inkubacije od 5 minuta prenijela sam lizirani sadržaj u Eppendorf epruvetu od 0,5 ml, obilježila i pohranila na -60 °C ili niže

[4] Uzorak supernatanta je potrošeni medij sa stanične kulture.

3.4.1.3. Uzorkovanje i priprema ostalih uzoraka

Osim supernatanata sa staničnih kultura testirala sam i FBS, te albumen i alantoisnu tekućinu iz jaja. FBS sam dobila od proizvođača podloga kao zamrznutu tekućinu. Albumen sam pokupila pipetom iz 5 jaja (ukupno 5 ml), združila i centrifugirala. Zbog prirode materijala nije ga bilo moguće filtrirati kroz 0,22 μm filtar, stoga sam ga bez filtriranja ultracentrifugirala kako je opisano u 3.4.1.2. Alantoisnu tekućinu pokupila sam pipetom iz 3 jaja (ukupno 5 ml), združila i pripremila uzorak kako je opisano u 3.4.1.2.

3.4.1.4. Izvođenje PERT-testa

Svaki se uzorak u PERT-testu testira u triplikatu, te također u triplikatu uz dodatak RT-standarda. Reagense (početnice, proba, RNaza A, dNTP, 1×PCR-pufer) pripremila sam u kabinetu za sterilni rad s okomitim strujanjem zraka različitom od onog koji se koristi tijekom izvođenja testa. Cijeli test izvodi se u istom kabinetu za sterilni rad s okomitim strujanjem zraka na sljedeći način:

- Priprema RT-standarda:
  AMV-RT-standard razrijedila sam s 1×PCR-puferom na početnu koncentraciju od 1 J/μl. Od početne koncentracije AMV-RT (1 J/μl) pripremila sam deseterostruka razrjeđenja od 10^{-1} J/μl do 10^{-9} J/μl s 1×PCR-puferom.
- Priprema RT-standarda za dodatak RT poznate koncentracije u uzorak (eng. *spiking*):
  Od razrjeđenja 10^{-2} AMV-RT-standarda pripremila sam razrjeđenje za *spiking* s 1×PCR-puferom. Razrjeđenje RT za *spiking* je $2{,}08 \times 10^{-3}$ J/μl (jedan udio razrjeđenja 10^{-2} J/μl AMV-RT-standarda plus 3,8 udjela 1×PCR-pufera). Volumen standarda za *spiking* za jednu reakciju iznosi 4,8 μl.
- Priprema smjese za reverznu transkripciju:

  Volumeni za reakciju u jednoj mikroepruveti:
  10×PCR-pufer - 2,5 μl
  dNTP - 4,0 μl (0,25 nmol/μl)
  početnica A - 1,3 μl (25 pmol/μl)
  inhibitor RNaze - 0,4 μl (20 J/μl)
  Smjesu za reverznu transkripciju pripremila sam uvijek u suvišku tako da pripremljeni volumen dostaje za 3 mikroepruvete više nego što se testira (volumen za testiranje jednog uzorka uz standard, kontrolne uzorke i suvišak iznosi 246 μl).

- Za jedan uzorak potrebno je 27 mikroepruveta:
  - 12 mikroepruveta za AMV-RT-standard (četiri razrjeđenja, svako u triplikatu)
  - 3 mikroepruvete za kontrolu *spikinga*
  - 3 mikroepruvete za negativnu kontrolu bez dodane MS2-RNA
  - 3 mikroepruvete za negativnu kontrolu bez dodane RT
  - 3 mikroepruvete za uzorak koji se testira
  - 3 mikroepruvete za uzorak koji se testira sa *spikingom*
- Negativna kontrola bez dodane RNA:

  Prenijela sam po 8,2 µl smjese za reverznu transkripciju u 3 mikroepruvete za negativnu kontrolu bez dodane MS2-RNA. U svaku mikroepruvetu dodala sam čistim nastavkom po 6,8 µl vode koja ne sadrži RNazu i DNazu.
- Pripremila sam razrjeđenje MS2-RNA tako da koncentracija iznosi 0,16 µg/µl.
- Preostaloj smjesi za reverznu transkripciju (221,4 µl) dodala sam 54 µl razrjeđenja MS2-RNA (po 2 µl za svaku od preostale 24 mikroepruvete, plus 3 mikroepruvete u suvišku). Volumen smjese za reverznu transkripciju koja sadrži MS2-RNA sad iznosi 275,4 µl.
- Navedenu smjesu za reverznu transkripciju koja sadrži MS2-RNA dodala sam u:
  - 3 mikroepruvete za uzorak koji se testira sa *spikingom*, po 10,2 µl u svaku
  - 3 mikroepruvete za kontrolu *spikinga*, po 10,2 µl u svaku
- U ostatak smjese za reverznu transkripciju koja sadrži MS2-RNA (214,2 µl) dodala sam 100,8 µl vode koja ne sadrži RNazu i DNazu (po 4,8 µl za svaku od preostalih 18 mikroepruveta, plus 3 mikroepruvete u suvišku). Volumen smjese za reverznu transkripciju koja sadrži MS2-RNA sad iznosi 315 µl.
- Po 15 µl smjese za reverznu transkripciju koja sadrži MS2-RNA prenijela sam s čistim nastavcima u preostale mikroepruvete.
- Nanošenje uzoraka:
  - dodala sam s čistim nastavcima po 10 µl 1×PCR-pufera u svaku od 3 mikroepruvete za negativnu kontrolu bez dodane RT
  - dodala sam s čistim nastavcima po 10 µl 1×PCR-pufera u svaku od 3 mikroepruvete za kontrolu *spikinga*

- dodala sam s čistim nastavcima po 10 µl uzorka u svaku od 3 mikroepruvete namijenjene za uzorak koji se testira
- dodala sam s čistim nastavcima po 4,8 µl razrjeđenja AMV-RT za *spiking* u svaku od 3 mikroepruvete za uzorak koji se testira sa *spikingom*
- dodala sam s čistim nastavcima po 4,8 µl razrjeđenja AMV-RT za *spiking* u svaku od 3 mikroepruvete za kontrolu *spikinga*

- Nanošenje standarda:
  - dodala sam s čistim nastavcima po 10 µl svake koncentracije AMV-RT-standarda (10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} i 10^{-9} J/µl – predstavlja raspon od 10^{10} do 10^{4} pj RT po reakciji) u svaku od 3 mikroepruvete, počevši od najvećeg razrjeđenja (10^{-9}) do najmanjeg (10^{-3}) – standardni pravac
  - dodala sam s čistim nastavcima po 10 µl AMV-RT-standarda koncentracije 10^{-3} J/µl u 3 mikroepruvete za negativnu kontrolu bez dodane MS2-RNA

Mikroepruvete sam zatvorila i postavila u termociklički amplifikator. Uvjeti reverzne transkripcije postavljeni su na 37 °C kroz 90 minuta.

- Pred kraj reakcije reverzne transkripcije pripremila sam smjesu za PCR:

  Volumeni za reakciju u jednoj mikroepruveti:
  2 × TaqMan® Gene Expression Master Mix - 30 µl
  početnica A - 1,4 µl (25 pmol/µl)
  početnica B - 1,4 µl (25 pmol/µl)
  proba - 1,4 µl (25 pmol/µl)
  RNaza - 1,4 µl (25 pmol/µl)

Smjesu za PCR pripremila sam uvijek u suvišku tako da pripremljeni volumen dostaje za 3 mikroepruvete više nego što se testira (volumen za testiranje jednog uzorka uz standard, kontrolne uzorke i suvišak iznosi 1050 µl).

- Na kraju reakcije reverzne transkripcije izvadila sam mikroepruvete iz termocikličkog amplifikatora, skinula čepove/pokrovnu foliju i u svaku mikroepruvetu čistim nastavkom dodala po 35 µl smjese za PCR.

Mikroepruvete sam ponovo zatvorila i postavila ponovo u termociklički amplifikator.
Reakcija PCR-a odvijala se u sljedećim uvjetima: 37 °C/15 minuta; 95 °C/10 minuta; 43 ciklusa PCR-a: 95 °C/15 sekundi; 60 °C 1 minuta.

3.4.1.5. Normalizacija rezultata PERT-testa

Ukoliko je pojedini uzorak inhibirao PERT-test, izvršena je korekcija dobivene Ct vrijednosti prema rezultatu za RT-standard na sljedeći način:

Uzorak normaliziran prema RT-standardu = Uzorak - [(Uzorak + RT-standard) – RT-standard]

Isti korigirani rezultat se dobije ukoliko se računa preko broja pj / molekula RT / virusnih čestica:

Uzorak normaliziran prema RT-standardu = Uzorak / [(Uzorak + RT-standard) / RT-standard].

3.4.2. Infekcija primarne kulture pilećih fibroblasta RNA virusom

3.4.2.1. Operativni faktori

Istražila sam utjecaj tri operativna faktora na replikaciju i titar virusa mumpsa, cjepnog soja L-Zagreb. Faktori su bili sljedeći:

X1 – metoda pripreme primarne stanične kulture,

X2 – metoda infekcije

X3 – vrijeme skupljanja žetve (supernatanta sa stanične kulture).

Navedene operativne faktore istražila sam kroz osam pokusa označenih kao P1 do P8, koristeći matricu punog faktorijalnog dizajna eksperimenata (eng. *full factorial design of experiments*). U svakom pokusu skupljeno je šest uzoraka žetvi označenih kao Ž0 do Ž5. Uzorci iz pokusa P1 do P8 analizirani su u četiri zasebna PERT-testa. U svim testovima korištena je ista serija standarda AMV-RT.

3.4.2.1.1. Faktor X1 – metoda pripreme stanične kulture

Istražila sam utjecaj metode pripreme primarne stanične kulture (protokol K i protokol P) pilećih fibroblasta (PF) na titar virusa mumpsa u žetvama. Prema protokolu K, koji se koristi kod obrade manjeg broja pilećih embrija, embriju se odstranjuju glava, utroba i ekstremiteti. Preostalo tkivo sam homogenizirala i isprala tri puta u mediju MEM-H(N). Tkivo sam zatim tripsinizirala tri puta kroz 15 minuta na 37 ºC. Tripsin sam neutralizirala s MEM-H(N)+10% FBS. Stanice sam centrifugirala, resuspendirala u svježem mediju MEM-H(N)+10% FBS i filtrirala. Prema protokolu P, koji je namijenjen obradi velikog broja pilećih embrija, embrijima se odstranjuje glava i utroba, dok ekstremiteti ostaju. Za razliku od protokola K, prema protokolu P tripsinizirala sam stanice samo jedanput kroz 30 minuta na 35 ºC i zatim filtrirala bez prethodnog centrifugiranja.

3.4.2.1.2. Faktor X2 – metoda infekcije

Istražila sam utjecaj infekcije virusom mumpsa na stanični sloj (oznaka A) i utjecaj infekcije virusom mumpsa u suspenziju (prije formiranja staničnog sloja, oznaka B) na titar virusa mumpsa u žetvama. U oba sam slučaja inficirala stanice s m.o.i. 0,03 (eng. *multiplicity of infection*) odnosno s 3 virusne čestice na 100 stanica. U pokusima A, inokulum stanica iznosio je $1,0\times10^5$ stanica/cm^2 u mediju MEM-H(N)+10% FBS. U pokusima B, inokulum stanica iznosio je $1,5\times10^5$ stanica/cm^2 u mediju MEM-H(N)+10% FBS. Nakon inokulacije, stanice sam inkubirala na 37±1 ºC bez CO_2.

U pokusima A, 24 sata nakon uspostave kulture promijenila sam medij, a stanice sam inficirala virusom 72 sata nakon uspostave kulture (32±1 ºC bez CO_2 kroz 1 sat), nakon čega sam na stanični sloj dodala medij MEM-H(N)+2% FBS. Inkubacija stanica odvijala se dalje na 32±1 ºC bez CO_2.

U pokusima B, virus sam dodala odmah pri uspostavljanju kulture u suspenziju stanica u mediju MEM-H(N)+10% FBS. Stanice sam inkubirala na 37±1 ºC bez CO_2 kroz prvih 24 sata, zatim na 35±1 ºC bez CO_2 kroz sljedećih 24 sata i potom na 32±1 ºC bez CO_2 od 72-og sata na dalje.

3.4.2.1.3. Faktor X3 – vrijeme skupljanja žetve

Istražila sam utjecaj vremena skupljanja žetvi na titar virusa mumpsa u žetvama. Sa svih staničnih kultura prvu žetvu (Ž0) skupila sam 72 sata nakon infekcije, nakon čega sam isprala serum sa stanične kulture koristeći MEM-H(N). Žetve Ž1 do Ž5 skupljala sam svakih 24 sata (oznaka 24) ili svakih 48 sati (oznaka 48), ovisno o pokusu. Kod svih sljedećih žetvi dodala sam MEM-H(N) bez FBS-a u sve stanične kulture.

Tablica 4. Popis testiranih faktora i njihovih razina.

Faktor	**Opis**	**Razina**	
		-	+
X1	Metoda pripreme primarne stanične kulture	**P**	**K**
X2	Metoda infekcije	**A**	**B**
X3	Vrijeme između žetava	**24**	**48**

Tablica 5. Uvjeti pokusa P1 do P8.

Pokus	Faktori		
	X1	**X2**	**X3**
P1	-	-	-
P2	+	-	-
P3	-	+	-
P4	+	+	-
P5	-	-	+
P6	+	-	+
P7	-	+	+
P8	+	+	+

3.4.2.2. Istraživanje utjecaja stabilizatora na PERT-test

Za potrebe gore navedene studije planirano je u uzorke odmah nakon žetve dodati 20% stabilizatora[5] (v/v). Kako bih istražila mogu li se uzorci stabilizirani sa stabilizatorom testirati u PERT-testu te ima li prisutnost stabilizatora u uzorku bilo kakvog utjecaja na rezultate PERT-testa, izvršila sam pokusno testiranje. Pripremila sam uzorke supernatanata s primarne stanične kulture PF. U uzorcima nije bio prisutan virus mumpsa, no uzorci su prema matriksu odgovarali uzorcima iz studije. Supernatante sa stanične kulture PF prikupila sam 24 sata i 96 sati nakon uspostave stanične kulture te sam u njih dodala 20% stabilizatora (v/v). Za kontrolu razrjeđenja supernatanata pripremila sam uzorke istih supernatanata u koje sam dodala 20% MEM-H(N) (v/v). Zajedno s navedenim uzorcima testirala sam i nerazrijeđene uzorke istih supernatanata. Negativna kontrola bili su uzorci medija MEM-H(N)+10% FBS (matriks), medija razrijeđenog s 20% stabilizatora (v/v) i medija razrijeđenog s 20% MEM-H(N) (v/v).

3.4.2.3. Izračun broja endogenih retrovirusnih čestica

Broj virusnih čestica računala sam tako da sam prvo izračunala omjer broja pikojedinica (pj) AMV-RT i broja molekula AMV-RT (Ma i sur., 2009) kako slijedi:

Molarna masa (M) AMV-RT = 157 000 Da (g/mol)

Masa jedne molekule AMV-RT $[(M/6{,}02\times10^{23}\ mol^{-1})\times10^{12}\ pg]$ = $0{,}261\times10^{-6}$ pg

Specifična aktivnost AMV-RT (podatak od proizvođača) = $4{,}325\times10^{-5}$ j/pg

Iz specifične aktivnosti slijedi da 10^{-5} j odgovara 0,231 pg (10^{-5} j=1/4,325 pg).

Temeljem mase jedne molekule RT izračunala sam broj molekula AMV-RT koji je sadržan u 0,231 pg, odnosno 10^{-5} j:

[5] Stabilizator - sastav 1 litre otopine: želatina (125 g), sorbitol (250 g) i voda za injekcije (do 1 l)

= 0,231 pg / $0,261\times10^{-6}$ pg = $8,86\times10^{5}$ molekula

Broj pj ekvivalentan jednoj molekuli RT = 10^{-5} j / $8,86\times10^{5}$ molekula =

= $1,13\times10^{-11}$ j/molekuli = 11,3 pj/molekuli

1 molekula RT = 11,3 pj (1 pj = 0,0885 molekula RT)

Prema podacima za ptičje retroviruse, jedna virusna čestica sadrži 70 molekula RT.

1 virusna čestica = 791 pj

Za svaki pokus dobivena je jednadžba pravca za AMV-RT-standard. U jednadžbu je uvrštena vrijednost Ct (y) za svaki uzorak žetve te je izračunat broj pj (x). Na temelju broja pj izračunat je broj virusnih čestica na gore navedeni način. Jednadžbe glase:

Pokusi P1 i P2 : y = -2,9082x + 43,016

Pokusi P3 i P4 : y = -3,1502x + 45,279

Pokusi P5 i P6 : y = -3,0843x + 45,072

Pokusi P7 i P8 : y = -2,9413x + 43,046

3.4.2.4. Izračun prinosa endogenih retrovirusnih čestica po stanici

Kako bi se izračunalo u kojim uvjetima operativnih faktora nastaje najveći broj endogenih retrovirusnih čestica, izračunala sam prinos endogenih retrovirusnih čestica po stanici kroz žetve. Posebno sam računala prinos za Ž0 (budući da u Ž0 još uvijek ima FBS-a), a posebno kumulativni prinos za Ž1 do Ž5.

Primijenila sam sljedeće jednadžbe:

$c_{RT} = n_{RT} / V$

$Y_{RT} = (c_{RT} \times V_{Ž}) / (n^0_{ST} \times P)$

gdje je:

c_{RT} – koncentracija endogenih retrovirusnih čestica

n_{RT} – broj endogenih retrovirusnih čestica (izračunat kao u 3.4.2.3.)

V – volumen (računala sam po 1 ml)

Y_{RT} – prinos endogenih retrovirusnih čestica (eng. *yield*)

$V_{Ž}$ – volumen jedne žetve (30 ml)

$(c_{RT} \times V_{Ž})$ – ukupan broj endogenih retrovirusnih čestica u žetvi

n^0_{ST} – broj stanica u trenutku infekcije virusom mumpsa po cm^2

P – površina boce za kultivaciju stanica (cm^2)

$(n^0_{ST} \times P)$ – ukupan broj stanica u boci za kultivaciju

U pokusima su korištene boce za kultivaciju površine 75 cm^2. Kod infekcije na stanični sloj (pokusi P1, P2, P5 i P6) nasad stanica bio je $1,0\times10^5$ stanica/cm^2 te je nakon 72 sata, tj. do trenutka infekcije, dostigao ukupni broj od $18,95\times10^6$ stanica/boci (stanice prema protokolu P), odnosno $17,80\times10^6$ stanica/boci (stanice prema protokolu K). Kod infekcije u suspenziju (pokusi P3, P4, P7 i P8) nasad stanica bio je $1,5\times10^5$ stanica/cm^2, odnosno ukupni broj iznosi $11,25\times10^6$ stanica/boci.

Za Ž0 izračunala sam prinos preko gornje jednadžbe (Y_{RT}).

Za Ž1 do Ž5 izračunala sam prvo ukupan broj endogenih retrovirusnih čestica u svakoj pojedinoj žetvi. Za Ž1 izračunala sam prinos preko gornje jednadžbe (Y_{RT}). Za Ž2 prvo sam zbrojila ukupan broj endogenih retrovirusnih čestica iz Ž1 i Ž2 i zatim podijelila s ukupnim brojem stanica u boci za kultivaciju, te tako izračunala prinos ($Y_{RT\ Ž2}$). Za Ž3 prvo sam zbrojila ukupan broj endogenih retrovirusnih čestica iz Ž1, Ž2 i Ž3 i zatim podijelila s ukupnim brojem stanica u boci za kultivaciju ($Y_{RT\ Ž3}$), i tako do Ž5.

3.4.2.5. Izračun utjecaja operativnih faktora na prinos endogenih retrovirusnih čestica po stanici

3.4.2.5.1. Prinos u Ž0

Za Ž0 sam kao odziv procesa za računanje kritičnih efekata operativnih faktora uzela gore izračunati prinos (Y_{RT}). Budući da se faktor X3 (vrijeme skupljanja žetve) ne odnosi na Ž0, pratila sam samo utjecaj faktora X1 (metoda pripreme primarne stanične kulture) i faktora X2 (metoda infekcije). Ako se izuzme faktor X3, u 8 pokusa je za Ž0 puni faktorijelni dizajn eksperimenata proveden dva puta.

Pomoću programa Statistica 6.1 izračunala sam glavne efekte operativnih faktora, primjenjujući donju jednadžbu:

$Y^i_m = \beta_0 + \Sigma^3_{i=1}\ \beta_i X_i$

gdje je Y^i_m - vrijednost odziva, β_0 - srednja vrijednost odziva, β_i - koeficijenti uz osnovne faktore, X_i - pojedini faktor. Treba napomenuti da je vrijednost efekta pojedinog faktora jednak dvostrukoj vrijednosti odgovarajućeg koeficijenta u matematičkom modelu. Ovo proizlazi iz postavke modela na prostor kodiranih vrijednosti osnovnih faktora {-1 ; 1}. Dakle $E_{X_1} = 2\beta_1$ i tako nadalje za ostale efekte.

Za procjenu statističke značajnosti uočenih efekata procijenila sam standardnu grešku za efekte, $(SE)_e$, također pomoću programa Statistica 6.1. Izračun se zasniva na sumi kvadrata reziduala eksperimentalnih podataka od matematičkog modela. Za identifikaciju statistički

značajnih efekata izračunala sam pomoću programa Statistica 6.1 *t*-vrijednost za svaki osnovni efekt prema formuli:

$$t = \frac{|E_X|}{(SE)_e}$$

Apsolutne vrijednosti efekata i pripadajuće *t*-vrijednosti usporedila sam s kritičnim vrijednostima t_{Krit} i E_{Krit} a koje sam izračunala prema formulama:

$$t_{Krit} = TINV(\alpha, DF)$$

$$E_{Krit} = t_{Krit}(SE)_e$$

gdje je: α - razina značajnosti ($\alpha = 0,05$) i *DF* je broj stupnjeva slobode. Efekt sam smatrala statistički značajnim, za uzeti razina značajnosti α, ako je $|E_X| > E_{Krit}$, odnosno $t > t_{Krit}$.

3.4.2.5.2. Prinos u Ž1 do Ž5

Iz podataka je vidljivo da promjena kumulativnog prinosa naglo raste do Ž1 ili do Ž2, a nadalje ima slabi linearni uspon. Ukoliko sam kao odziv procesa za računanje kritičnih efekata operativnih faktora uzela maksimalnu specifičnu brzinu promjene kumulativnog prinosa, računajući pritom promjenu kroz sve žetve (Ž1 do Ž5), dobila sam da se specifična maksimalna brzina u svim pokusima nalazi u vremenu t=0, te na taj način nisam mogla razlučiti efekte među faktorima. Ovo upućuje na činjenicu da se tijekom žetvi Ž1 i Ž2 većina endogenih retrovirusnih čestica ispere sa stanica, te da za stanice u uvjetima bez FBS-a može biti karakterističan samo linearni uspon kumulativnog prinosa kod zadnjih žetvi (Ž3 do Ž5, eventualno uključujući Ž2, ukoliko je u linearnom odnosu s Ž3 do Ž5). Podatke sam prikazala u nelinearnom modelu, te u linearnom modelu na vrijednostima zadnjih žetvi. Nagib pravca linearnog modela predstavlja specifičnu brzinu promjene kumulativnog prinosa, odnosno predstavlja odziv procesa za računanje kritičnih efekata operativnih faktora. Efekti i kritične vrijednosti efekata su ponovo izračunati kao u 3.4.2.5.1.

3.4.2.6. Određivanje titra virusa mumpsa

Titar virusa mumpsa određen je kao infektivna doza virusa mumpsa koja izaziva citopatske promjene (eng. *cytopathic effect*, CPE) na 50% inficiranih staničnih kultura (eng. *cell culture infectious dose 50*, $CCID_{50}$). Stanična kultura Vero nasađena je u mikrotitracijske pločice s 96 udubina. Pripremila sam po deset trostrukih razrjeđenja svakog uzorka koja su nanesena na stanične kulture u deset udubina mikrotitracijske pločice. U svakom testu korišten je također

laboratorijski referens od kojeg je pripremljeno po četiri niza trostrukih razrjeđenja i prema kojem je na kraju testa izvršena korekcija za uzorak. Nakon inkubacije mikrotitracijskih pločica s inficiranim staničnim kulturama od 10 dana, mikroskopski su očitane stanične kulture na prisutnost CPE. Titar virusa mumpsa određen je preko Spärman-Kerber-ove jednadžbe.

3.4.3. Infektivnost retrovirusnih čestica porijeklom iz staničnih kultura

Kako bih otkrila potječe li aktivnost RT od infektivnih endogenih retrovirusnih čestica, istražila sam njihovu infektivnost na indikatorskim staničnim kulturama te utjecaj endogenih retrovirusnih čestica na opće stanje miševa i zamorčića.

3.4.3.1. Priprema indikatorskih staničnih kultura

Koristila sam indikatorske kulture MRC-5 i Vero stanica. Prvi korak u pripremi indikatorskih staničnih kultura je disocijacija postojeće stanične kulture enzimskom metodom (tripsinizacijom). Nakon mikroskopskog pregleda odabrala sam boce u kojima su stanice konfluentne i bez vidljivih znakova kontaminacije. Iz boca sam izbacila potrošeni supernatant i zatim isprala stanični sloj s nekoliko mililitara otopine tripsina prethodno zagrijanog na 37 ºC, kako bih uklonila ostatak seruma na stanicama koji bi mogao inhibirati daljnje djelovanje tripsina. Otopinu tripsina zajedno s ostatkom medija izbacila sam iz boce. Ponovo sam dodala otopinu tripsina (oko 1 ml) i polegla bocu tako da otopina prekrije stanični sloj. Nakon oko 2 minute stanice su se odvojile od boce. Djelovanje tripsina prekinula sam dodatkom 5 ml medija MEM-H(N)+10% FBS zagrijanog na 37 °C. Stanice sam mehanički raspršila pomoću pipete tako da sam mlaz stanične suspenzije iz pipete snažno istisnula u stjenku boce za kultivaciju.

Sljedeći korak bio je određivanje koncentracije i vijabilnosti stanica u suspenziji. U epruvetu sam dodala 0,1 ml stanične suspenzije dobivene tripsinizacijom i 0,9 ml tripanskog modrila (razrjeđenje 1:10). Nakon miješanja, automatskom pipetom sam dodala po kap razrijeđene stanične suspenzije uz rub pokrovnog stakalca u dvije komorice za brojanje stanica i pustila da kapilarnim silama suspenzija uđe pod pokrovno stakalce. U svakoj komorici izbrojala sam žive i mrtve (obojene) stanice u četiri velika vanjska kvadrata koji se nalaze na uglovima mrežice (površina jednog kvadrata iznosi 1 mm^2). Koncentraciju stanica izračunala sam prema formuli:

$$c = n/8 \times 10^4 \times d$$

gdje je

c = stanična koncentracija (br. stanica/ml)

n = broj stanica u 8 kvadrata

d = faktor razrjeđenja

10^4 = faktor za pretvorbu broja stanica iz 0,1 mm^3 u 1 ml

Vijabilnost stanica izračunala sam prema formuli:

vijabilnost (%) = (br. živih stanica / ukupan br. stanica) x 100

Suspenzija čija je vijabilnost < 85% ne uzima se u daljnji postupak.

U boce za kultivaciju prenijela sam volumen stanične suspenzije tako da bude $2{,}0x10^4$ vijabilnih stanica/cm^2 i dodala medij za rast i održavanje stanica (MEM-H + 10% FBS) do 40 ml u bocu za kultivaciju od 75 cm^2. Stanice su inkubirane na 37 ºC kroz 72 sata prije infekcije.

3.4.3.2. Testiranje u indikatorskim staničnim kulturama

Indikatorske stanične kulture MRC-5 i Vero inficirala sam supernatantom primarne kulture PF koji je bio pozitivan u PERT-testu. Indikatorske stanične kulture sam zatim kultivirala kroz 14 dana tijekom kojih sam skupljala uzorke za PERT-test prema niže navedenom protokolu. Sve sam uzorke nakon prikupljanja pohranila prvo na -60 ºC ili niže, a nakon toga centrifugirala, filtrirala i ultracentrifugirala kako je opisano u 3.4.1.2.

Tijekom izvođenja protokola koristila sam stalno istu seriju medija (od MEM-H(N)+10% FBS i MEM-H(N) pripremljeni su svi mediji).

Pripremila sam suspenziju PF u bocama za kultivaciju stanica površine 150 cm^2 s inokulumom $1{,}2\times10^5$ stanica/cm^2. Dodala sam podlogu MEM-H(N)+5% FBS (uzorak 1) do ukupnog volumena od 75 ml po boci. Pripremljenu staničnu kulturu inkubirala sam na 35±2 ºC. Nakon 24 sata promijenila sam podlogu tako da sam izbacila supernatant (uzorak 2) i dodala MEM-H(N)+5% FBS do 75 ml. Nakon 72 sata kultivacije izbacila sam supernatant (uzorak 3) i dodala MEM-H(N)+2% FBS (uzorak 4). Zatim sam staničnu kulturu inkubirala 14 dana na 32 ºC.

Četrnaesti dan inkubacije mikroskopski sam pregledala sve boce na prisutnost citopatskog učinka, združila sam supernatant iz svih boca s PF, alikvotirala, uzorkovala (uzorak 5) i pohranila na -60 ºC ili niže (supernatant prikupljen ovdje služio je i kao uzorak za kromatografiju, vidi 3.4.4.). Na PF iz četiri boce napravila sam test hemadsorpcije sa

zamoračkim eritrocitima. Eritrociti su bili pripremljeni dan ranije, inkubirani su 30 minuta sa stanicama u dvije boce na sobnoj temperaturi i 30 minuta sa stanicama u dvije boce na 2-8 ºC.

Pripremila sam sedam boca s indikatorskom kulturom MRC-5 i 7 boca s indikatorskom kulturom Vero. Podloga za rast MRC-5 i Vero stanica bila je MEM-H(N)+10% FBS (uzorak 6).

Na dan infekcije združila sam supernatante iz sedam boca s indikatorskom kulturom MRC-5 (uzorak 7) i iz sedam boca s indikatorskom kulturom Vero (uzorak 8).

U pet boca s indikatorskom kulturom MRC-5 dodala sam po 10 ml supernatanta PF i nadopunila do 40 ml s podlogom MEM-H(N)+2,5% FBS. Preostale dvije boce s indikatorskom kulturom MRC-5 bile su kontrola stanične kulture i u njih sam dodala samo 40 ml podloge.

U pet boca s indikatorskom kulturom Vero dodala sam po 10 ml supernatanta PF i nadopunila do 40 ml s podlogom MEM-H(N)+2,5% FBS. Preostale dvije boce s indikatorskom kulturom Vero bile su kontrola stanične kulture i u njih sam dodala samo 40 ml podloge.

Sve boce s MRC-5 i Vero stanicama inkubirane su na 35±2 ºC kroz 14 dana. Uzorke sam uzimala prema shemi:

1. dan inkubacije – supernatant iz prve od 5 boca s MRC-5 stanicama (uzorak 9)
– supernatant iz prve od 5 boca s Vero stanicama (uzorak 10)

3. dan inkubacije – supernatant iz druge od 5 boca s MRC-5 stanicama (uzorak 11)
– supernatant iz druge od 5 boca s Vero stanicama (uzorak 12)

7. dan inkubacije – supernatant iz treće od 5 boca s MRC-5 stanicama (uzorak 13)
– supernatant iz treće od 5 boca s Vero stanicama (uzorak 14)

10. dan inkubacije – supernatant iz četvrte od 5 boca s MRC-5 stanicama (uzorak 15)
– supernatant iz četvrte od 5 boca s Vero stanicama (uzorak 16)

14. dan inkubacije – supernatant iz pete od 5 boca s MRC-5 stanicama (uzorak 17)
– supernatant iz pete od 5 boca s Vero stanicama (uzorak 18)

Svaki put prije uzimanja uzorka pregledala sam boce mikroskopski na prisutnost CPE.

Četrnaesti dan inkubacije združila sam supernatant iz dvije kontrolne boce s indikatorskom kulturom MRC-5 (uzorak 19) i iz dvije kontrolne boce s indikatorskom kulturom Vero (uzorak 20). Napravila sam test hemadsorpcije sa zamoračkim eritrocitima (pripremljenima dva dana ranije) tako da su stanice iz po jedne boce svake indikatorske kulture inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi i 30 minuta na 2-8 ºC.

Tablica 6: Uzroci za PERT-test.

Uzorak broj	**Opis uzorka**			
	Stanična kultura	**Medij**	**Supernatant kulture**[1]	**Inkubacija**
1	/	MEM-H(N)+5% FBS	-	/
2	PF	/	+	24 sata
3	PF	/	+	72 sata
4	/	MEM-H(N)+2% FBS	-	/
5	PF	/	+	14 dana
6	/	MEM-H(N)+10% FBS	-	/
7	MRC-5	/	+	72 sata
8	Vero	/	+	72 sata
9	MRC-5	/	+	1. dan p.i.[2]
10	Vero	/	+	1. dan p.i.
11	MRC-5	/	+	4. dan p.i.
12	Vero	/	+	4. dan p.i.
13	MRC-5	/	+	7. dan p.i.
14	Vero	/	+	7. dan p.i.
15	MRC-5	/	+	12. dan p.i.
16	Vero	/	+	12. dan p.i.
17	MRC-5	/	+	14. dan p.i.
18	Vero	/	+	14. dan p.i.
19	MRC-5	/	+	14. dan p.i. (kontrola)
20	Vero	/	+	14. dan p.i. (kontrola)

[1] Potrošeni medij nakon inkubacije

[2] p.i.=nakon infekcije MRC-5 i Vero stanica s uzorkom 5 (potrošeni medij, odnosno supernatant kulture PF)

Korekcija rezultata prema RT-standardu i izračun broja endogenih retrovirusnih čestica, odnosno molekula RT u uzorku proveden je po istom principu kao u 3.4.1.5. i 3.4.2.3. Jednadžbe pravaca za izračun glase:

uzorci 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 17, 18 i 19: $y = -4{,}0203x + 55{,}607$

uzorci 3, 4 i 5: $y = -3{,}3695x + 49{,}041$

uzorak 20: $y = -3{,}532x + 50{,}644$

3.4.3.3. Istraživanje u životinjama

Negativan utjecaj endogenih retrovirusnih čestica na opće stanje zamorčadi i miševa istražen je u testu opće neškodljivosti (Ph. Eur. 01/2008:20609). U testu su upotrijebljena dva zdrava zamorčeta i pet zdravih miševa koji nisu ranije upotrebljavani u testu. Filtrirani supernatant pilećih fibroblasta (0,22 μm filtar) koji sadrži endogene retrovirusne čestice injiciran je životinjama intraperitonealno. Opće stanje životinja praćeno je kroz sljedećih sedam dana te su zadnji dan životinje izvagane.

3.4.4. Kromatografija na monolitnim nosačima

3.4.4.1. Priprema uzoraka za PERT-test na monolitnim nosačima

U svrhu standardizacije pripreme uzoraka za PERT-test, koncentrirala sam endogene retrovirusne čestice i reverznu transkriptazu kromatografijom na monolitnim nosačima, odnosno CIM-QA-disku (jaki anionski izmjenjivač) i CIM-SO_3-disku (jaki kationski izmjenjivač). Uzorci za kromatografiju bili su supernatant primarne kulture PF i medij MEM-H(N)+2% FBS za održavanje pilećih fibroblasta (centrifugirani i filtrirani kao u 3.4.1.2.). Endogene retrovirusne čestice i njihove RT koncentrirala sam ionskom kromatografijom koristeći stupnjeviti gradijent soli (tj. eluiranje povećanjem ionske jakosti). S oba diska elucija je provedena s trostupanjskim gradijentom NaCl-a: 0,2 M, 0,5 M i 1 M. Prije nanošenja na QA i SO_3-disk, uzorak sam svaki puta pomiješala s puferom za vezanje (BB) u omjeru 1:1 (v/v).

Enzime RT koncentrirala sam na dva načina:
(1) uzorak sam nanijela na diskove, eluirala ga u tri stupnja i testirala u PERT-testu – oznaka uzorka 1a; i (2) uzorak sam prvo pomiješala s puferom za lizu u omjeru 1:1 (v/v) kroz 5 minuta, nanijela na diskove, eluirala ga u tri stupnja i testirala u PERT-testu – oznaka uzorka 1c.
U prvom slučaju (1a) koncentrirala sam slobodnu RT prisutnu u uzorku, a u drugom slučaju (1c), uz RT iz 1a, koncentrirala sam RT oslobođenu iz endogenih retrovirusnih čestica prisutnih u uzorku.

Endogene retrovirusne čestice kao takve koncentrirala sam na način da sam uzorak nanijela na diskove, eluirala ga u tri stupnja, zatim pomiješala s puferom za lizu u omjeru 1:1 (v/v) kroz 5 minuta i testirala u PERT-testu – oznaka uzorka 1b. U ovom slučaju, dobiveni rezultat

odgovara broju molekula RT koje su kao slobodne prisutne u uzorku (1a) zajedno s brojem molekula RT oslobođenih iz virusnih čestica koncentriranih na disku (1b).

Koncentrirane uzorke prikupila sam kroz pet kromatografija (Tablica 7.) U svakoj kromatografiji skupila sam uzorak nakon prolaska kroz disk (eng. *flowthrough*, FT) u kojem se nalaze molekule RT/virusne čestice koje se nisu vezale na disk. Zatim sam s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om eluirala molekule RT/virusne čestice vezane na disk.

Mjerila sam apsorbanciju na 280 nm i uzorke skupljala ručno.

Kromatografija na QA-disku

(1) QA-disk, protok 4 ml/min

Pomiješala sam 17,5 ml MEM-H(N)+2% FBS s 17,5 ml BB i nanijela na disk. Skupila sam uzorak FT i uzorke eluirane s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om. Po 3 ml svakog uzorka pohranila sam na -80 ºC. Oznake uzoraka su: MEM 1aQAFT, MEM 1aQA0,2, MEM 1aQA0,5 i MEM 1aQA1,0. Od 3 ml uzorka odvojila sam nakon otapanja po 1 ml i pomiješala s 1 ml pufera za lizu (opcija 1b), testirala sam u PERT-testu i ostatak pohranila na -80 ºC. Oznake uzoraka su: MEM 1bQAFT, MEM 1bQA0,2, MEM 1bQA0,5 i MEM 1bQA1,0.

(2) QA-disk, protok 4 ml/min

Pomiješala sam 10 ml supernatanta primarne kulture PF s 10 ml BB i nanijela na disk. Skupila sam uzorak FT i uzorke eluirane s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om. Skupila sam po 3 ml svakog uzorka. Odvojila sam po 1 ml i pomiješala s 1 ml pufera za lizu (opcija 1b), rastočila 4×0,5 ml i pohranila na -80 ºC. Preostalih 2 ml rastočila sam 4×0,5 ml i pohranila na -80 ºC (opcija 1a). Oznake uzoraka su: 1aQAFT, 1aQA0,2, 1aQA0,5 i 1aQA1,0, te 1bQAFT, 1bQA0,2, 1bQA0,5 i 1bQA1,0.

(3) QA-disk, protok 4 ml/min

Pomiješala sam 10 ml supernatanta primarne kulture PF s 10 ml pufera za lizu, inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi i zatim pomiješala s 20 ml BB i nanijela na disk. Skupila sam uzorak FT i uzorke eluirane s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om. Skupila sam po 3 ml svakog uzorka, rastočila 6×0,5 ml i pohranila na -80 ºC. Oznake uzoraka su: 1cQAFT, 1cQA0,2, 1cQA0,5 i 1cQA1,0.

Kromatografija na SO_3-disku

(4) SO_3-disk, protok 4 ml/min

Pomiješala sam 10 ml supernatanta primarne kulture PF s 10 ml BB i nanijela na disk. Skupila sam uzorak FT i uzorke eluirane s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om. Skupila sam po 3 ml svakog uzorka. Od 3 ml odvojila sam 1 ml i pomiješala s 1 ml pufera za lizu (opcija 1b), rastočila 4×0,5 ml i pohranila na -80 ºC. Preostalih 2 ml rastočila sam 4×0,5 ml i pohranila na -80 ºC (opcija 1a). Uzorci nose nazive: 1aSO_3FT, 1a$SO_3$0,2, 1a$SO_3$0,5 i 1a$SO_3$1,0, te 1bSO_3FT, 1b$SO_3$0,2, 1b$SO_3$0,5 i 1b$SO_3$1,0.

(5) SO_3-disk, protok 4 ml/min

Pomiješala sam 10 ml supernatanta primarne kulture PF s 10 ml pufera za lizu, inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi i zatim pomiješala s 20 ml BB i nanijela na disk. Skupila sam uzorak FT i uzorke eluirane s 0,2 M, 0,5 M i 1,0 M NaCl-om. Skupila sam po 3 ml svakog uzorka, rastočila 6×0,5 ml i pohranila na -80 ºC. Uzorci nose nazive: 1cSO_3FT, 1c$SO_3$0,2, 1c$SO_3$0,5 i 1c$SO_3$1,0.

3.4.4.2. Membranska ultrafiltracija kromatografskih uzoraka

Uzorke dobivene kromatografijom dodatno sam koncentrirala membranskom ultrafiltracijom na Vivaspin™ 500 koncentratorima. Membrana ima propusnost za molekule manje od Mr = 3000. Navedeno sam provela ne toliko zbog koncentriranja uzorka, koliko zbog uklanjanja soli koja potječe od pufera za eluciju (EB), a koja inhibira RT/PCR reakciju u PERT-testu. U gornji dio četiri Vivaspin epruvete prvo sam nanijela po 500 µl DEPC vode i centrifugirala na 15 000 g kroz 10 minuta kako bi voda prošla kroz membranu koja dijeli gornji i donji dio i tako ju pripremila za uzorak. Višak vode iz gornjeg dijela sam dekantirala. U gornji dio Vivaspin epruveta sam zatim dodala po 500 µl uzorka iz kromatografije broj (2) - 1aQAFT, 1aQA0,2, 1aQA0,5 i 1aQA1,0. Uzorke sam centrifugirala kroz 15 minuta na 15 000 g, na temperaturi 20 ºC. U gornjem dijelu na membrani ostalo je još oko 50 µl uzorka. Dekantirala sam otopinu koja je prošla kroz membranu u donji dio, a u gornji dio dodala po 400 µl PCR-pufera 1x. Ponovo sam centrifugirala kroz 10 minuta na 15 000 g, na temperaturi 20 ºC. U gornjem dijelu na membrani ostalo je još oko 100 µl uzorka. Dekantirala sam otopinu koja je prošla kroz membranu u donji dio, a u gornji dio dodala ponovo po 400 µl PCR-pufera 1x. Ponovo sam centrifugirala kroz 15 minuta na 15 000 g, na temperaturi 20 ºC. U gornjem dijelu na membrani ostalo je oko 90 µl uzorka koji sam skupila u novu Eppendorf epruvetu od 500 µl i pohranila na -80 ºC.

3.4.4.3. Testiranje uzoraka iz kromatografije u PERT-testu

U prvom PERT-testu testirala sam uzorke 1aQA – nerazrijeđene i razrijeđene, te koncentrirane, odnosno odsoljene membranskom ultrafiltracijom kako bih definirala koji je uzorak najbolji za testiranje u PERT-testu. Uzorak 1aQAFT testirala sam nerazrijeđen i koncentriran membranskom ultrafiltracijom. Uzorak 1aQA0,2 testirala sam nerazrijeđen, razrijeđen 1/100 i 1/1000 i koncentriran membranskom ultrafiltracijom, a uzorke 1aQA0,5 i 1aQA1,0 testirala sam razrijeđene 1/100 i 1/1000 i koncentrirane membranskom ultrafiltracijom (Tablica 7.). U sljedećim PERT-testovima testirala sam uzorke MEM 1aQA, 1bQA, 1cQA, $1aSO_3$, $1bSO_3$ i $1cSO_3$ razrijeđene na način: FT – 1/10, a eluati 0,2, 0,5 i 1,0 – 1/100 (Tablica 7.)

Budući da sam za 10, 100, odnosno 1000 puta razrijedila uzorke, izvršila sam korekciju rezultata na način da sam prvo preko Ct rezultata i jednadžbe standardnog pravca u pojedinom testu izračunala broj pj za svaki uzorak (kao u 3.4.2.3.), zatim sam broj pj pomnožila sa 10, 100 ili 1000 i preračunala natrag u Ct vrijednosti. Svi Ct rezultati kod kojih je uočena inhibicija su na početku korigirani prema RT-standardu kako je opisano u 3.4.1.5.

Jednadžbe pravaca glase:

uzorci 1aQA: $y=-3,056x+44,417$

uzorci 1bQA, 1cQA i $1aSO_3$: $y=-2,9363x+43,209$

uzorci $1bSO_3$, $1cSO_3$: $y=-3,6027x+51,027$

Konačni Ct rezultat za 1aQA je srednja vrijednost mjerenja uzorka 1/100 i 1/1000.

Korigirane Ct vrijednosti sam zatim preračunala u broj molekula RT kao u 3.4.2.3. Dobiveni broj molekula RT odgovarao je broju molekula RT prisutnom u 10 µl uzorka koji sam stavila po reakciji u PERT-test. Da bih dobila broj molekula RT prisutnih u volumenu pojedinog eluata (3 ml za 1aQA i 1cQA; 1bQA je dvostruko razrijeđeni uzorak 1aQA) pomnožila sam dobiveni broj molekula RT s 300 za 1aQA i 1cQA, odnosno 600 za 1bQA.

Budući da je volumen FT veći od 3 ml uzorka FT koji sam skupila, pomnožila sam dobiveni broj molekula RT tako da odgovara ukupnom volumenu uzorka koji je nanesen na disk. Konačno, ukupni broj molekula RT koncentriranih u pojedinoj varijanti na disku izračunala sam na način da sam zbrojila molekule RT iz svih eluata (0,2, 0,5 i 1,0 M).

Tablica 7: Priprema uzoraka za PERT-test na monolitnim nosačima.

Početni uzorak za kromatografiju	Kroma-tografija	Oznaka uzorka	Obrada uzorka nakon kromatografije	Ultrafil-tracija (UF)	Razrjeđenje uzorka za PERT-test	U uzorku za PERT-test očekuje se prisutnost
MEM-H(N)+2% FBS + BB	(1) QA-disk	MEM 1aQAFT	-	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka
		MEM 1aQA0,2	-	-	1/100	
		MEM 1aQA0,5	-	-	1/100	
		MEM 1aQA1,0	-	-	1/100	
		MEM 1bQAFT	+pufer za lizu	-	-	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka + molekula RT iz koncentriranih retrovirusnih čestica
		MEM 1bQA0,2	+pufer za lizu	-	-	
		MEM 1bQA0,5	+pufer za lizu	-	-	
		MEM 1bQA1,0	+pufer za lizu	-	-	
Supernatant PF + BB	(2) QA-disk	1aQAFT	-	+	neraz. i UF	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka
		1aQA0,2	-	+	neraz., 1/100, 1/1000 i UF	
		1aQA0,5	-	+		
		1aQA1,0	-	+		
		1bQAFT	+pufer za lizu	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka + molekula RT iz koncentriranih retrovirusnih čestica
		1bQA0,2	+pufer za lizu	-	1/100	
		1bQA0,5	+pufer za lizu	-	1/100	
		1bQA1,0	+pufer za lizu	-	1/100	
Supernatant PF + pufer za lizu + BB	(3) QA-disk	1cQAFT	-	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka + koncentriranih molekula RT oslobođenih iz retrovirusnih čestica
		1cQA0,2	-	-	1/100	
		1cQA0,5	-	-	1/100	
		1cQA1,0	-	-	1/100	
Supernatant PF + BB	(4) SO_3-disk	1aSO_3FT	-	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka
		1a$SO_3$0,2	-	-	1/100	
		1a$SO_3$0,5	-	-	1/100	
		1a$SO_3$1,0	-	-	1/100	
		1bSO_3FT	+pufer za lizu	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka + molekula RT iz koncentriranih retrovirusnih čestica
		1b$SO_3$0,2	+pufer za lizu	-	1/100	
		1b$SO_3$0,5	+pufer za lizu	-	1/100	
		1b$SO_3$1,0	+pufer za lizu	-	1/100	
Supernatant PF + pufer za lizu + BB	(5) SO_3-disk	1cSO_3FT	-	-	1/10	koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka + koncentriranih molekula RT oslobođenih iz retrovirusnih čestica
		1c$SO_3$0,2	-	-	1/100	
		1c$SO_3$0,5	-	-	1/100	
		1c$SO_3$1,0	-	-	1/100	

3.4.4.4. Usporedba uspješnosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica

Kako bi se mogla usporediti uspješnost koncentriranja molekula RT/virusnih čestica kromatografijom i ultracentrifugiranjem u odnosu na broj molekula RT/virusnih čestica prisutan u neobrađenom uzorku supernatanta kulture PF, u PERT-testu sam također testirala uzorak supernatanta PF. Uzorak supernatanta stavila sam neobrađen u test, ili sam ga prethodno pomiješala s puferom za lizu u omjeru 1/1 i 1/10. Radi usporedbe s kulturom PF, u test sam stavila i supernatant kulture stanica MRC-5, sam i pomiješan s puferom za lizu u omjeru 1/1.

Također sam testirala supernatant PF nakon ultracentrifugiranja, sam i pomiješan s puferom za lizu u omjeru 1/1, kako bih vidjela ostaju li u supernatantu RT molekule/virusne čestice.

4. REZULTATI

4.1. Aktivnost reverzne transkriptaze porijeklom iz različitih retrovirusa

U svrhu standardizacije PERT-testa i odabira standarda RT za testiranje bioloških materijala, testirala sam tri RT porijeklom iz različitih animalnih retrovirusa (3.1.1.). Tijekom uvođenja i standardizacije PERT-testa odredila sam sljedeće karakteristike: osjetljivost, linearnost, raspon, granicu detekcije, preciznost, otpornost i izdržljivost.

4.1.1. Standardizacija PERT-testa

U Tablicama 8., 9. i 10. prikazala sam rezultate za svaku RT kao srednju vrijednost Ct iz svih provedenih testova za pojedinu koncentraciju RT ($\overline{X}$ n_r), uz standardnu devijaciju (SD n_r) i 95%-tni interval pouzdanosti (95%IP n_r). Također je za svaku koncentraciju RT prikazan raspon 95%-tnih intervala pouzdanosti (95%IP) i raspon relativnih standardnih devijacija (RSD) za pojedinačne testove, te RSD među svim testovima (međutestna RSD).

Rezultati pokazuju da se PERT-testom može uspješno mjeriti aktivnost AMV-RT, HIV-RT i MLV-RT, odnosno da je test osjetljiv za sve testirane RT. PERT-test je precizan, na što ukazuju vrijednosti 95%IP i RSD. Pravci dobiveni iz pojedinih testova za svaku RT su paralelni, što dodatno potvrđuje preciznost i posredno ukazuje na točnost testa u linearnom rasponu koncentracija (Slike 15., 17. i 19.).

4.1.1.1. Aktivnost AMV-RT

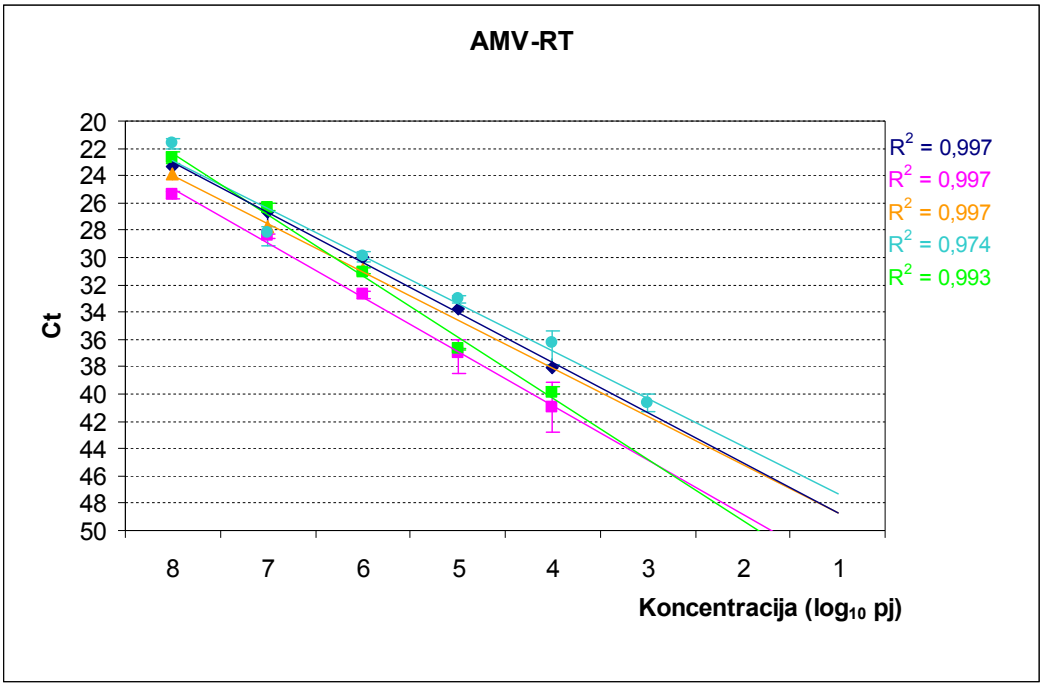
AMV-RT testirala sam u pet navrata: jedanput u rasponu koncentracija od 10^8 do 10^6 pj/reakciji, te četiri puta u rasponu koncentracija od 10^8 do 10^1 pj/reakciji. Razrjeđenja uzorka bila su desetostruka. U Tablici 8. prikazala sam statističku obradu vrijednosti Ct iz svih testova za pojedinu koncentraciju AMV-RT.

Tablica 8. Vrijednost Ct za različite koncentracije AMV-RT u PERT-testu.

Konc.RT (pj/ reakciji)	AMV-RT							
	broj testova[a]	broj dobivenih rezultata (n_r)	Ct			±95%IP u pojedinom testu, raspon[b]	RSD u pojedinom testu, raspon (%)	međutestna RSD (%)
			$\overline{X}$ n_r	±SD n_r	±95%IP n_r			
10^8	5	15/15	23,35	1,34	0,74	0,70 - 1,48	1,11 - 2,56	5,75
10^7	5	15/15	27,46	0,97	0,54	0,58 - 1,94	0,83 - 2,76	3,52
10^6	5	14/15	30,90	1,12	0,65	0,53 - 1,58	0,01 - 2,12	3,61
10^5	4	12/12	35,11	1,91	1,21	0,24 - 3,24	0,27 - 3,53	5,44
10^4	4	11/12	38,59	2,09	1,41	0,76 - 3,35	0,77 - 6,22	5,43
10^3	4	2/12	40,67	0,87	-	-	2,15	-
10^2	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^1	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-

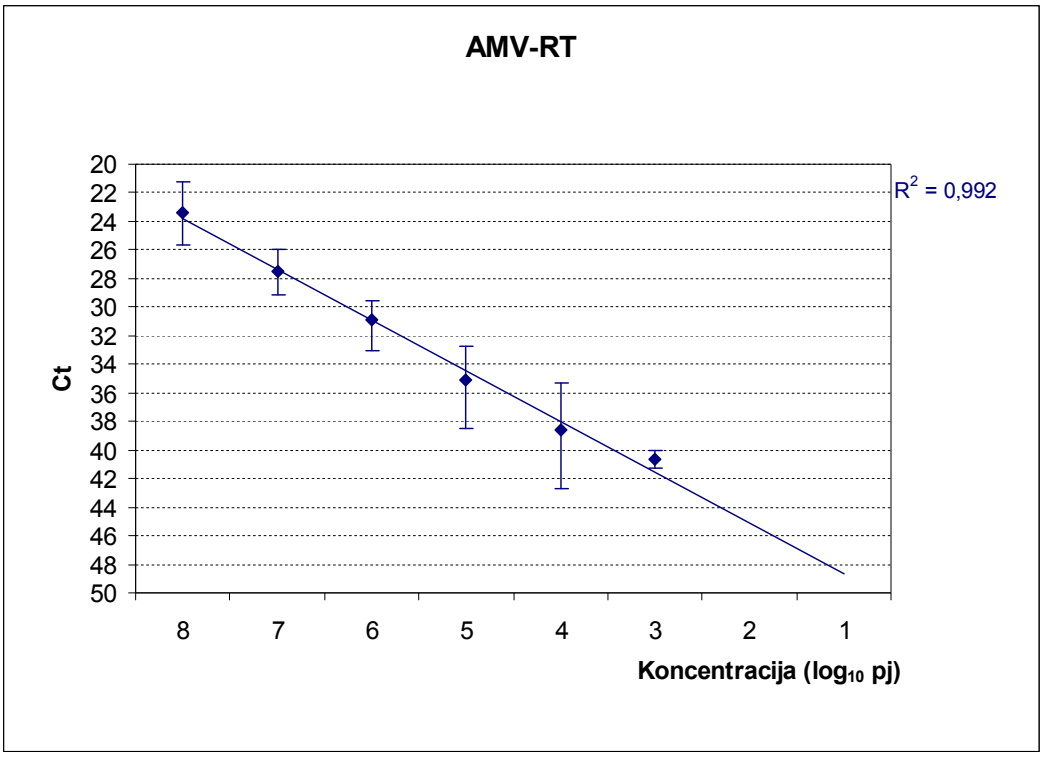
[a] U jednom testu svaka koncentracija RT testirana je u triplikatu.
[b] Prikazano samo za testove u kojima je dobiven rezultat od čitavog triplikata.

Linearni prikaz odnosa koncentracije ($\log_{10}$ pj) i aktivnosti AMV-RT (Ct) u PERT-testu pokazuje da pravci dobiveni iz pojedinih testova zadovoljavaju kriterije za paralelnost (p=0,93) u programu Statistica 6.0 (Slika 15.).



Slika 15. Pojedinačna testiranja AMV-RT u PERT-testu. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost Ct, a stupci pogreške predstavljaju raspon Ct za pojedinu koncentraciju RT u jednom testu. Za svaki test povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

Regresijska analiza (MO Excel 2003) rezultata iz svih testiranja pokazala je linearnu ovisnost između pada koncentracije AMV-RT i porasta vrijednosti Ct (p=2,42×10^{-5}), koju dodatno potvrđuje koeficijent determinacije od 0,992 (Slika 16.).



Slika 16. Srednja vrijednost Ct za AMV-RT u pet PERT-testova ($\overline{X}$ n_r, Tablica 8.). Stupci pogreške predstavljaju raspon Ct iz svih testiranja pojedine koncentracije RT. Povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

4.1.1.2. Aktivnost HIV-RT

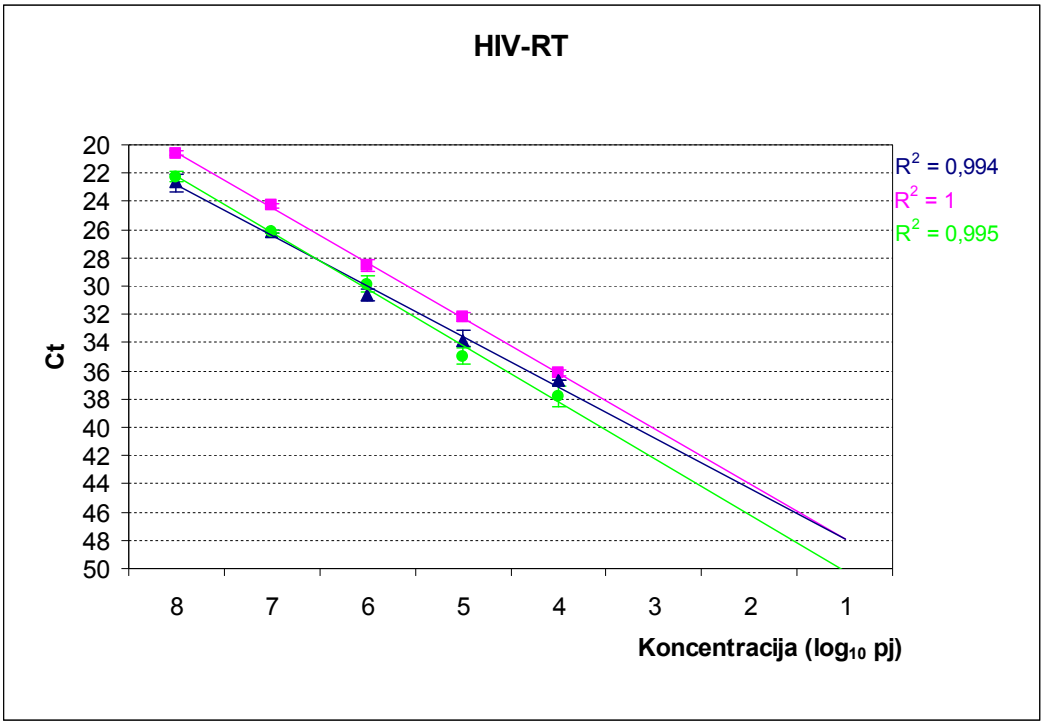
HIV-RT testirala sam u tri navrata u rasponu koncentracija od 10^8 do 10^1 pj/reakciji. Razrjeđenja uzorka bila su desetostruka. U Tablici 9. prikazala sam statističku obradu vrijednosti Ct iz svih testova za pojedinu koncentraciju HIV-RT.

Tablica 9. Vrijednost Ct za različite koncentracije HIV-RT u PERT-testu.

Konc.RT (pJ/ reakciji)	HIV-RT							
	broj testova[a]	broj dobivenih rezultata (n_r)	Ct			±95%IP u pojedinom testu, raspon[b]	RSD u pojedinom testu, raspon (%)	međutestna RSD (%)
			$\overline{X}$ n_r	±SD n_r	±95%IP n_r			
10^8	3	9/9	21,82	1,02	0,78	0,45 - 1,63	0,88 - 2,90	4,66
10^7	3	8/9	25,46	0,96	0,80	0,22 - 0,43	0,34 - 0,72	3,75
10^6	3	8/9	29,57	0,98	0,82	0,94 - 1,35	1,33 - 1,84	3,31
10^5	3	9/9	33,66	1,32	1,01	0,89 - 1,64	1,12 - 1,96	3,91
10^4	3	7/9	36,79	0,85	0,78	0,48	0,06 - 2,61	2,30
10^3	3	0/9	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^2	3	0/9	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^1	3	0/9	nedetektirano	-	-	-	-	-

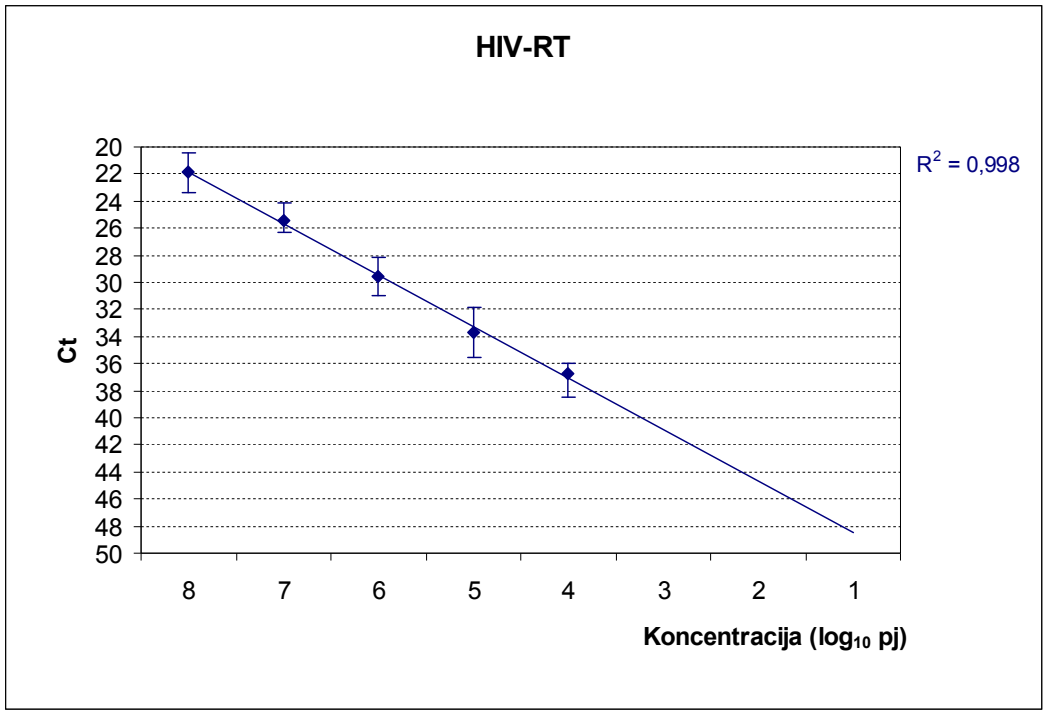
[a] U jednom testu svaka koncentracija RT testirana je u triplikatu.
[b] Prikazano samo za testove u kojima je dobiven rezultat za čitav triplikat

Linearni prikaz odnosa koncentracije ($\log_{10}$ pj) i aktivnosti HIV-RT (Ct) u PERT-testu pokazuje da pravci dobiveni iz pojedinih testova zadovoljavaju kriterije za paralelnost (p=0,99) u programu Statistica 6.0 (Slika 17.).



Slika 17. Pojedinačna testiranja HIV-RT u PERT-testu. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost Ct, a stupci pogreške predstavljaju raspon Ct za pojedinu koncentraciju RT u jednom testu. Za svaki test povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

Regresijska analiza (MO Excel 2003) rezultata iz svih testiranja pokazala je linearnu ovisnost između pada koncentracije HIV-RT i porasta vrijednosti Ct (p=3,72×10^{-5}), koju dodatno potvrđuje koeficijent determinacije od 0,998 (Slika 18.).



Slika 18. Srednja vrijednost Ct za HIV-RT u tri PERT-testa ($\overline{X}\,n_r$, Tablica 9.). Stupci pogreške predstavljaju raspon Ct iz svih testiranja pojedine koncentracije RT. Povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

4.1.1.3. Aktivnost MLV-RT

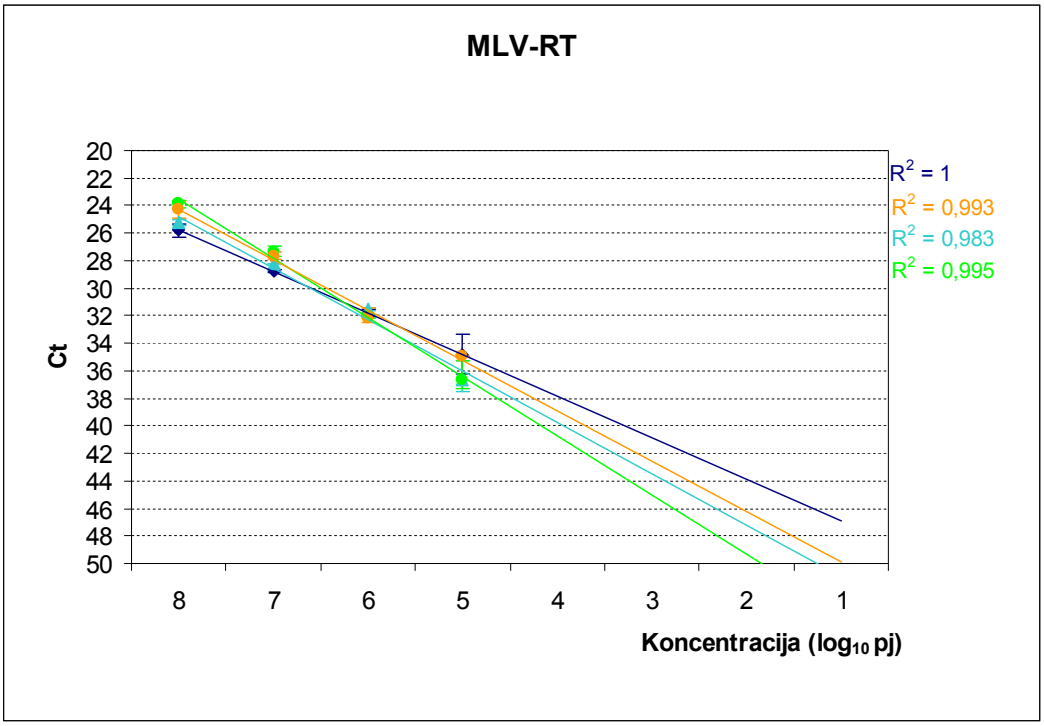
MLV-RT testirala sam u četiri navrata u rasponu koncentracija od 10^8 do 10^1 pj/reakciji. Razrjeđenja uzorka bila su desetostruka. U Tablici 10. prikazala sam statističku obradu vrijednosti Ct iz svih testova za pojedinu koncentraciju MLV-RT.

Tablica 10. Vrijednost Ct za različite koncentracije MLV-RT u PERT-testu.

Konc.RT (pJ/ reakciji)	MLV-RT							
	broj testova[a]	broj dobivenih rezultata (n_r)	Ct			±95%IP u pojedinom testu, raspon[b]	RSD u pojedinom testu, raspon (%)	međutestna RSD (%)
			$\overline{X}$ n_r	±SD n_r	±95%IP n_r			
10^8	4	12/12	24,78	0,86	0,54	0,61 - 1,57	0,97 - 2,61	3,46
10^7	4	11/12	27,97	0,63	0,43	0,27 - 0,93	0,02 - 1,37	2,27
10^6	4	12/12	31,89	0,38	0,24	0,20 - 1,40	0,26 - 1,76	1,20
10^5	4	11/12	35,82	1,34	0,90	2,84 - 3,61	0,02 - 4,17	3,74
10^4	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^3	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^2	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-
10^1	4	0/12	nedetektirano	-	-	-	-	-

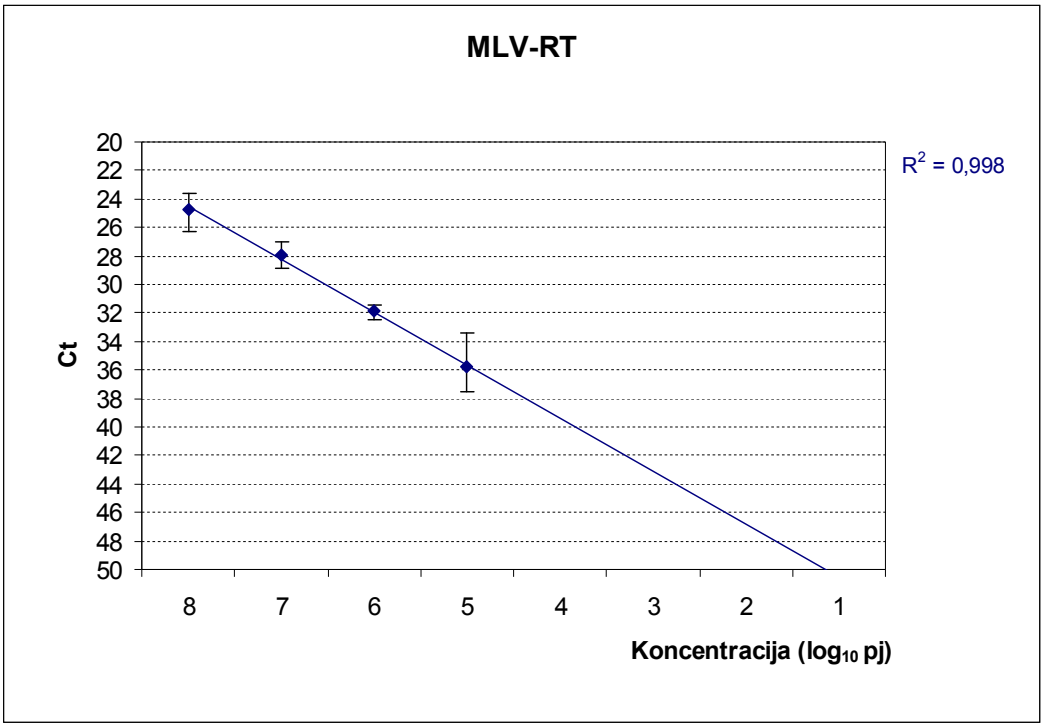
[a] U jednom testu svaka koncentracija RT testirana je u triplikatu.
[b] Prikazano samo za testove u kojima je dobiven rezultat za čitav triplikat.

Linearni prikaz odnosa koncentracije ($\log_{10}$ pj) i aktivnosti MLV-RT (Ct) u PERT-testu pokazuje da pravci dobiveni iz pojedinih testova zadovoljavaju kriterije za paralelnost (p=0,98) u programu Statistica 6.0 (Slika 19.).



Slika 19. Pojedinačna testiranja MLV-RT u PERT-testu. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost Ct, a stupci pogreške predstavljaju raspon Ct za pojedinu koncentraciju RT u jednom testu. Za svaki test povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

Regresijska analiza (MO Excel 2003) rezultata iz svih testiranja pokazala je linearnu ovisnost između pada koncentracije MLV-RT i porasta vrijednosti Ct (p=1,03×10^{-3}), koju dodatno potvrđuje koeficijent determinacije od 0,998 (Slika 20.).



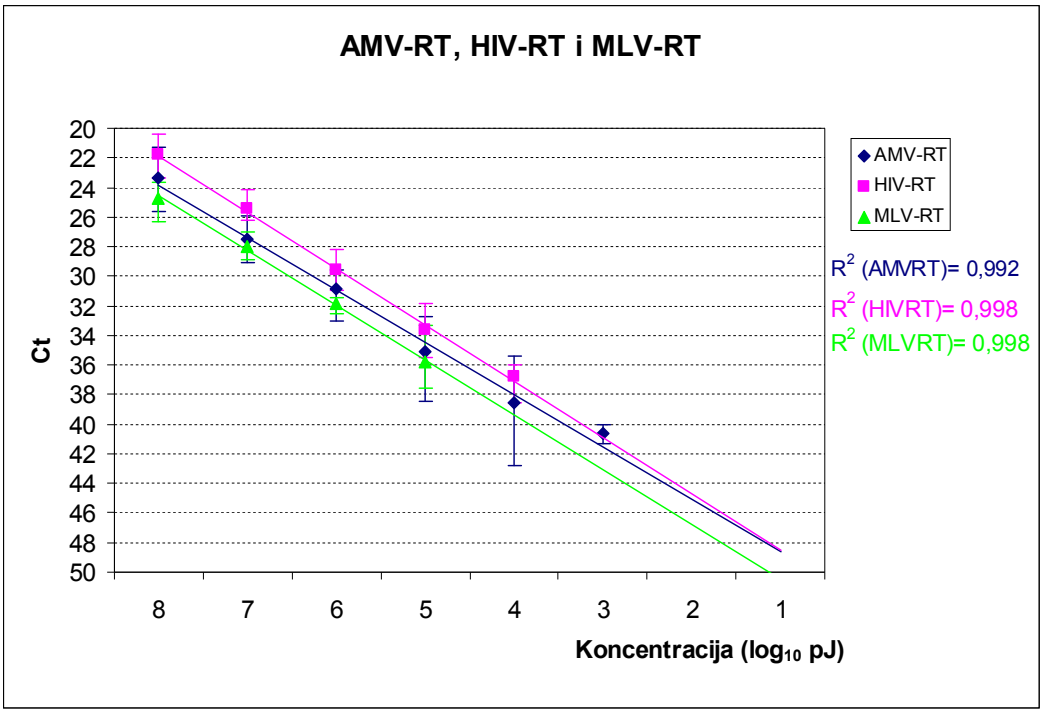
Slika 20. Srednja vrijednost Ct za MLV-RT u četiri PERT-testa ($\overline{X}$ n_r, Tablica 10.). Stupci pogreške predstavljaju raspon Ct iz svih testiranja za pojedinu koncentraciju RT. Povučen je regresijski pravac i određen koeficijent determinacije.

4.1.1.4. Usporedba aktivnosti RT porijeklom iz različitih retrovirusa

Usporedila sam rezultate PERT-testa za tri RT porijeklom iz različitih retrovirusa (Tablica 11., Slika 21.). Podatke sam analizirala linearnom regresijom i izračunala sam koeficijent determinacije. Pravci dobiveni iz testova za svaku RT su paralelni. Varijable koje sam mjerila u PERT-testu u linearnoj su korelaciji. Korelacija je pozitivna: niska koncentracija RT odgovara manjoj aktivnosti RT (porast vrijednosti Ct). Koeficijenti determinacije vrlo su visoki (0,99).

Tablica 11. Linearnost i koeficijent determinacije za RT porijeklom iz različitih retrovirusa u PERT-testu.

	Reverzna transkriptaza		
	AMV-RT	**HIV-RT**	**MLV-RT**
Linearnost	10^3 do 10^8 pj	10^4 do 10^8 pj	10^5 do 10^8 pj
Koeficijent determinacije (R^2)	0,992	0,998	0,998



Slika 21. Usporedba rezultata PERT-testa tri RT porijeklom iz različitih retrovirusa (sumarni prikaz Slika 16. 18. i 20.).

4.1.2. Granica detekcije PERT-testa

PERT-testom se mogu detektirati vrlo niske koncentracije RT u uzorku (10^3 pj RT označava koncentraciju uzorka koji je od koncentracije 1 j/µl razrijeđen 10^9 puta). U Tablici 12. prikazane su granice detekcije za testirane RT. Test je nešto osjetljiviji za AMV-RT i HIV-RT (granica detekcije 10^3 pj, odnosno 10^4 pj) nego za MLV-RT (granica detekcije 10^5 pj).

Tablica 12. Granica detekcije za RT porijeklom iz različitih retrovirusa u PERT-testu.

	Reverzna transkriptaza		
	AMV-RT	**HIV-RT**	**MLV-RT**
Granica detekcije	10^3 pj	10^4 pj	10^5 pj

4.1.3. Otpornost PERT-testa

Tijekom uvođenja PERT-testa prvotni volumen PCR smjese po reakciji bio je 25 µl, a ukupni volumen u mikroepruveti tijekom PCR-a 50 µl. Komercijalni komplet za preciznu kvantifikaciju lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (2 × TaqMan® Gene Expression Master Mix) dvostruko je koncentriran te ga je trebalo razrijediti tako da se na 50 µl ukupnog volumena doda 25 µl reagensa iz komercijalnog kompleta. No, da bi se zadovoljio volumen od 50 µl tijekom PCR-a nisam ga mogla dodati u volumenu u kojem je

trebalo (25 µl), već sam dodala u volumenu od 21 µl kako bi ostalo prostora za druge reagense. Rezultati PERT-testa sa smanjenom koncentracijom ovog reagensa nisu bili zadovoljavajući, odnosno Ct je bio viši od očekivanog. Upotrebom odgovarajuće koncentracije reagensa (30 µl na 60 µl PCR smjese), odnosno podešavanjem volumena PCR smjese na 60 µl poboljšala sam izvedbu i granicu detekcije PERT-testa (primjer za razrjeđenje 10^{-5} AMV-RT: prije korekcije Ct je 28,37, nakon korekcije Ct je 24,33).

Tijekom uvođenja PERT-testa koristila sam AmpliWax kuglice koje omogućuju odvijanje reakcije RT i PCR reakcije bez otvaranja mikroepruveta između ta dva koraka i tako smanjuju mogućnost kontaminacije. Rezultati PERT-testa izvođenog s AmpliWax kuglicama nisu bili zadovoljavajući, odnosno Ct je bio viši od očekivanog (primjer za razrjeđenje 10^{-5} AMV-RT: s AmpliWax kuglicama Ct je 29,89, bez AmpliWax kuglica Ct je 28,37). AmpliWax kuglice vrlo su nespretne za upotrebu i teško se njima manipulira. Iz navedenih razloga nisam ih dalje koristila. Tijekom izvođenja PERT-testova bez kuglica niti jednom nisam uočila kontaminaciju.

Tijekom uvođenja PERT-testa koristila sam koncentraciju dNTP-a od 0,25 nmol/µl i deset puta veću koncentraciju. Nije uočena razlika između dobivenih rezultata PERT-testa te sam dalje koristila koncentraciju 0,25 nmol/µl (primjer za razrjeđenje 10^{-5} AMV-RT: s koncentracijom dNTP-a 0,25 nmol/µl Ct je 29,89, deset puta veća koncentracija dNTP-a daje Ct 29,85).

Tijekom uvođenja PERT-testa testirala sam koncentraciju MS2-RNA od 0,32 µg/reakciji (Pyra i sur., 1994; Andre i sur., 2000), deset puta manju koncentraciju (0,032 µg/reakciji) i koncentraciju 1,6 µg/reakciji (nerazrijeđena RNA). Rezultati PERT-testa izvođenog s koncentracijama MS2-RNA od 0,32 µg/reakciji i 1,6 µg/reakciji bili su podjednaki. Rezultati PERT-testa izvođenog s koncentracijom MS2-RNA 0,032 µg/reakciji bili su lošiji, odnosno Ct je bio viši u odnosu na rezultate s većom koncentracijom MS2-RNA (primjer za razrjeđenje 10^{-7} AMV-RT: uz koncentraciju RNA 0,32 µg/reakciji Ct je 36,62, a uz koncentraciju 0,032 µg/reakciji Ct je 39,27). Nastavila sam koristiti koncentraciju 0,32 µg/reakciji.

4.1.4. Izdržljivost

Izdržljivost PERT-testa testirala sam na slijedeće načine:

(1) Tijekom istraživanja aktivnosti AMV-RT koristila sam enzim od dva različita proizvođača (Roche i Finnzymes). Nije uočena značajna razlika između aktivnosti AMV-RT (primjer za

razrjeđenje 10^{-5} AMV-RT: uz enzim od Roche-a Ct je 24,33, a uz enzim od Finnzymes-a Ct je 23,72).

(2) Tijekom istraživanja aktivnosti RT koristila sam početnice od dva različita proizvođača (Applied Biosystems i Eurofins MWG Operon). Nije uočena razlika između aktivnosti RT (primjer je jednak kao pod (1)).

(3) Tijekom uvođenja PERT-testa u RT koraku koristila sam 10×PCR-pufer (GE Healthcare) ili umjesto njega odgovarajući pufer za AMV-RT (5 × Incubation buffer for AMV-RT, Roche). Rezultati PERT-testa izvođenog s puferom za AMV-RT nisu bili zadovoljavajući (Ct je bio viši od očekivanog) te sam dalje koristila 10×PCR-pufer (primjer za razrjeđenje 10^{-5} AMV-RT: uz 10×PCR-pufer Ct je 24,33, uz pufer za AMV-RT Ct je 28,31).

(4) Tijekom uvođenja PERT-testa koristila sam pojedinačne mikroepruvete za PCR s odgovarajućim čepovima i također pločice za PCR s 96 mikroepruveta s odgovarajućom pokrivnom folijom. Izmjerene aktivnosti RT nisu se razlikovale ovisno o vrsti upotrijebljene mikroepruvete te se mogu koristiti obje vrste mikroepruveta.

4.1.5. Odabir standarda za testiranje biološkog materijala

Budući da se prisutnost RT očekuje u biološkom materijalu porijeklom iz ptica, odlučila sam kao standard u PERT-testu koristiti AMV-RT. Navedena RT pokazala se kao dobar standard, lako je dostupna, a aktivnosti AMV-RT različitih proizvođača se ne razlikuju.

4.2. Aktivnost reverzne transkriptaze u staničnim kulturama i embrioniranim jajima

PERT-testom istražila sam aktivnost reverzne transkriptaze u matriksu, supernatantima različitih neinficiranih primarnih, diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura i supernatantima primarne kulture pilećih fibroblasta (PF) inficirane virusom mumpsa. Također sam istražila aktivnost RT u embrioniranim jajima.

Kod istraživanja staničnih kultura, početni materijal za pripremu uzorka za PERT-test bio je supernatant stanične kulture koji sam ultracentrifugirala. Na talog sam nakon ultracentrifugiranja dodala pufer za lizu. Resuspendirani talog je uzorak za PERT-test. Na isti način pripremila sam i uzorke alantoisne tekućine i albumena embrioniranih jaja.

U svakom PERT-testu testirala sam standard AMV-RT u rasponu koncentracija od 10^4 do 10^{10} pj po reakciji. Svaki uzorak testirala sam u izvornom obliku i nakon što sam dodala 10^{10} pj AMV-RT-standarda (eng. *spike*). Rezultati su izraženi kao broj Ct, koji predstavlja srednju vrijednost tri, odnosno najmanje dva mjerenja u sklopu jednog PERT-testa.

4.2.1. Aktivnost reverzne transkriptaze u matriksu

Matriks supernatanta stanične kulture je medij za rast ili održavanje stanica. Testirala sam medij MEM-H(N), u koji sam dodala različite volumne udjele fetalnog goveđeg seruma (FBS). Testirala sam i sami FBS. Vrijednosti Ct za testirane uzorke medija i FBS-a prikazane su u Tablici 13.

Tablica 13. Aktivnost RT u podlozi za rast ili održavanje stanica i FBS-u.

Podloga	Serija	Ct			
		(A) uzorak	(B) RT-standard	(C) uzorak+ RT-standard	C-B
MEM-H(N)	1	nedetektirano	16,68	17,01	0,33
MEM-H(N) + 2% FBS	1	nedetektirano	16,68	17,50	0,82
	2	38,81*	16,57	18,76	2,19
MEM-H(N) + 5% FBS	1	34,51*	16,47	16,12	-0,35
	2	nedetektirano	15,32	16,21	0,89
MEM-H(N) + 10% FBS	1	nedetektirano	16,68	25,65	8,97
	2	nedetektirano	15,16	18,82	3,66
	3	33,53*	16,47	16,33	-0,14
	4	nedetektirano	15,32	18,77	3,45
FBS 1:100**	1	nedetektirano	15,32	14,93	-0,39

* MEM-H(N)+2% FBS ili 5% FBS dobiven je od MEM-H(N)+10% FBS razrjeđivanjem s MEM-H(N)

** FBS sam razrijedila 100× jer sam zbog pozitivnog rezultata za MEM-H(N)+10% FBS očekivala njegovu visoku vrijednost, a ujedno sam željela razrjeđivanjem maknuti inhibiciju

U mediju bez FBS-a nisam uočila aktivnost RT. Medij s FBS-om u većini pokusa inhibira RT-standard u uzorku, što je posebno vidljivo za MEM-H(N)+10% FBS. U jedinom pokusu u kojem nije bilo inhibicije PERT-testa detektirala sam neočekivano visoku aktivnost RT u mediju s 10% FBS-a. Budući da su medij s 2% FBS-a i s 5% FBS-a pripremljeni od medija s 10% FBS-a, pozitivan rezultat u njima bio je očekivan, a i aktivnost je padala sukladno padu postotka FBS-a, što je posebno uočljivo između uzoraka s 10% FBS-a (49383 RT molekule/ml) i 5% FBS-a (28172 RT molekule/ml). Testirani čisti FBS iste je serije kao i FBS u mediju, samo iz različite pošiljke.

Budući da sam uočila da medij s FBS-om inhibira PERT-test, istražila sam utjecaj FBS-a iz potrošenog medija, odnosno supernatanta stanične kulture PF porijeklom iz komercijalnih jaja, na PERT-test. Dio stanica PF kultivirala sam kontinuirano od 1. do 16. dana u mediju za rast stanica s 2,5% FBS-a, dok sam s drugog dijela stanica 13. dan od uspostave kulture

uklonila medij s 2,5% FBS-a i dodala isti medij bez FBS-a. Šesnaesti dan skupila sam oba supernatanta, obradila ih i testirala u PERT-testu. Rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Utjecaj seruma (FBS) u supernatantu primarne kulture PF na rezultat PERT-testa.

Primarna stanična kultura PF	**Serija**	**Starost stanične kulture**	**Medij za rast stanica**	**Ct**			
				uzorak	**RT-standard**	**uzorak+ RT-standard**	**uzorak korigiran prema RT-standardu**
konzu-mna jaja	**1**	16 dana	Stanice kultivirane od 1. do 16. dana u mediju s 2,5% FBS-a	23,19	16,68	19,47	20,40
	1	16 dana	Stanice kultivirane od 1. do 13. dana u mediju s 2,5% FBS-a, od 13. do 16. dana u mediju bez FBS-a	23,21	16,68	18,19	21,70

Rezultati iz Tablice 14. pokazuju (1) da u supernatantu kulture PF ima molekula RT, (2) da je veća aktivnost RT u kulturi kontinuirano kultiviranoj u prisutnosti FBS-a (ukoliko gledamo korigirane vrijednosti Ct) i (3) da supernatant primarne kulture PF porijeklom iz komercijalnih jaja inhibira RT-standard, a inhibicija je izraženija u kulturi koja je kontinuirano kultivirana u prisutnosti seruma.

4.2.2. Stabilnost uzoraka za PERT-test

Uzorak za PERT-test je resuspendirani talog filtrata supernatanta kulture nakon ultracentrifugiranja. Istražila sam stabilnost filtrata s kulture PF porijeklom s SPF-jaja, starih 24 sata i 72 sata, obzirom na operativne uvjete tijekom pripreme uzoraka. Uzorkovani supernatant sam filtrirala i filtrat podijelila u tri dijela – prvi dio ultracentrifugirala sam odmah nakon filtriranja, drugi dio nakon 24 sata pohrane filtrata na 2-8 °C (samo s 24 sata stare kulture) i treći dio nakon zamrzavanja na -80 °C kroz nekoliko dana. Izmjerene vrijednosti Ct prikazane su u Tablici 15.

Tablica 15. Stabilnost filtrata za pripremu uzorka za PERT-test.

Primarna stanična kultura PF	**Serija**	**Starost stanične kulture**	**Filtrat ultracentrifugiran**	**Ct**		
				uzorak	**RT-standard**	**uzorak+ RT-standard**
SPF-jaja	**1**	24 sata	svjež	29,76	15,82	26,94
	1	24 sata	nakon 24 sata na 2-8 °C	31,73	15,82	nije testirano
	1	24 sata	nakon zamrzavanja na -80 °C	30,78	15,82	nije testirano
	1	72 sata	svjež	23,58	15,82	17,37
	1	72 sata	nakon zamrzavanja na -80 °C	21,88	15,82	nije testirano

U odnosu na svježe pripremljeni filtrat, pohrana filtrata prije ultracentrifugiranja kroz 24 sata na 2-8 °C ili pohrana na -80 °C nije značajno utjecala na rezultate PERT-testa.

Stabilnost dva uzorka resuspendiranog taloga za PERT-test testirala sam nakon dugotrajne pohrane na -80 °C. Resuspendirani talog sam nakon pripreme podijelila na više alikvota, jedan alikvot testirala sam odmah u PERT-testu, a drugi nakon pohrane od 1 godine. Rezultati prikazani u Tablici 16. pokazuju da pokazuju da tijekom pohrane uzoraka za PERT-test na -80 °C kroz godinu dana razina aktivnosti RT pada, odnosno da stabilnost uzorka pada. Testirani svježi uzorci imali su odmah u početku visoku razinu aktivnosti RT tako da je aktivnost RT uočena i nakon godinu dana, bez obzira na pad. U slučaju uzoraka s niskom razinom aktivnosti RT u početku, važno je voditi računa o vremenu pohrane prije testiranja.

Tablica 16. Stabilnost uzorka za PERT-test.

Primarna stanična kultura PF	**Serija**	**Starost stanične kulture**	**Uzorak testiran**	**Ct**		
				uzorak	**RT-standard**	**uzorak+ RT-standard**
komercijalna jaja	**1**	24 sata	svjež	16,26	23,72*	17,09
	1	24 sata	nakon 1 godine na -80 °C	24,57	16,68	19,97
	1	9 dana	svjež	14,90	23,72*	15,39
	1	9 dana	nakon 1 godine na -80 °C	20,28	16,68	19,67

* Koncentracija RT-standarda nije bila 10^{10} pj po reakciji kao za sve druge uzorke već 10^{8} pj po reakciji (navedeni uzorci bili su prvi ikad testirani te je nakon njihovog testiranja korigirana koncentracija RT-standarda). Ct za uzorak+RT-standard je stoga irelevantan jer je koncentracija RT u uzorku znatno veća od koncentracije RT u RT-standardu.

4.2.3. Aktivnost reverzne transkriptaze u neinficiranim staničnim kulturama i embrioniranim jajima

4.2.3.1. Primarne stanične kulture

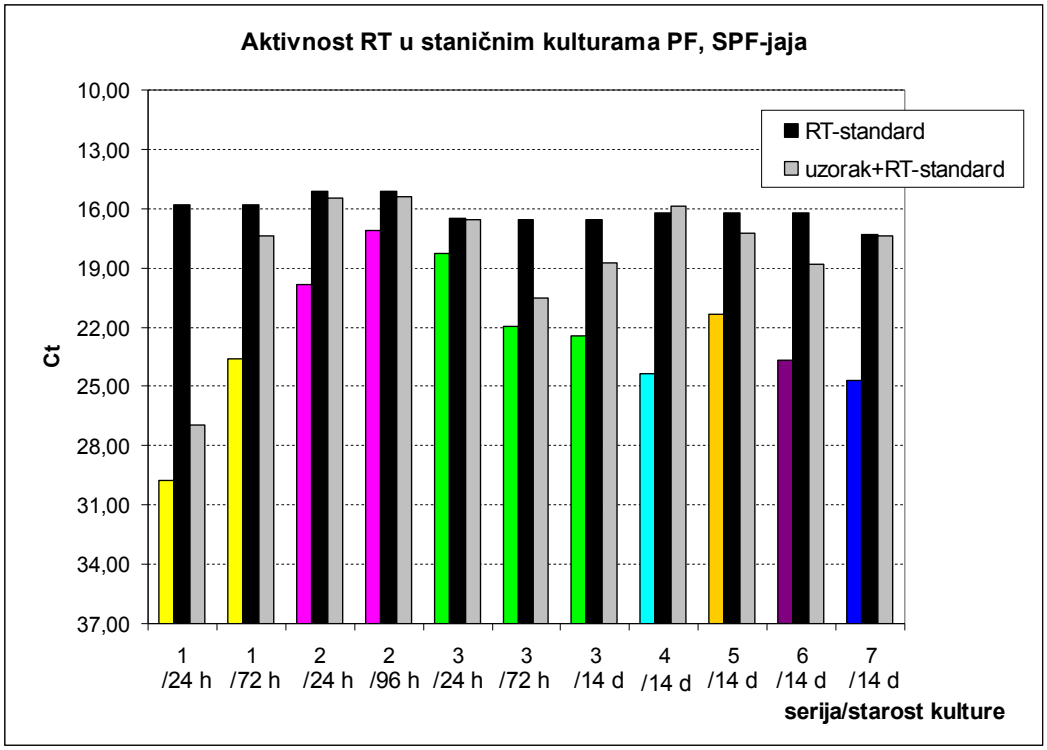
PERT-testom istražila sam primarnu kulturu pilećih fibroblasta (PF) porijeklom iz dva izvora: oplođenih komercijalnih jaja i oplođenih SPF-jaja.

Primarna kultura PF porijeklom iz oplođenih SPF-jaja, pripremljena prema protokolu P, kultivirana je kroz 24, 72 i 96 sati (serije 1 i 2), a ona pripremljena prema protokolu K kultivirana je kroz 24 i 72 sata (serija 3). Primarna kultura PF porijeklom iz oplođenih SPF-jaja, pripremljena prema protokolu K, kultivirana je 14 dana.

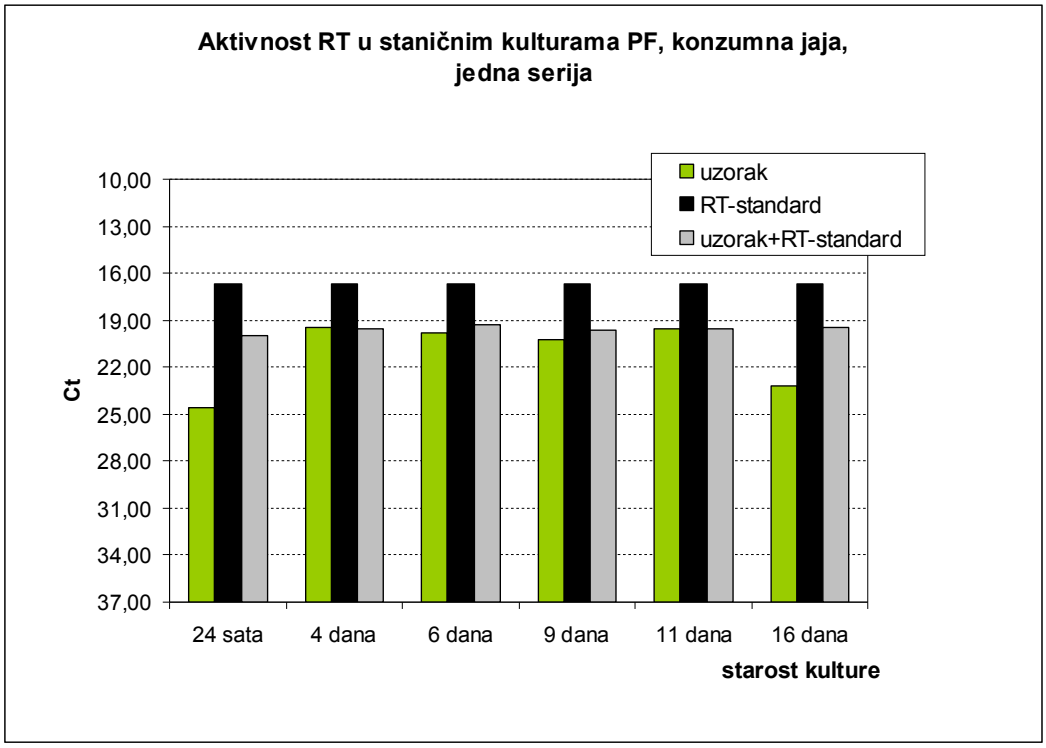
Primarna kultura PF porijeklom iz oplođenih komercijalnih jaja pripremljena je prema protokolu K. Rezultati istraživanja prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Aktivnost RT u neinficiranim primarnim staničnim kulturama PF.

Porijeklo stanica	Primarna stanična kultura (PF)	**Serija**	**Starost stanične kulture**	**Ct**			
				uzorak	**RT-standard**	**uzorak+ RT-standard**	**uzorak korigiran prema RT-standardu**
embrij pileta	SPF-jaja	**1**	24 sata	29,76	15,82	26,94	18,64
			72 sata	23,58	15,82	17,37	22,03
		2	24 sata	19,86	15,16	15,50	19,52
			96 sati	17,09	15,16	15,42	16,83
		3	24 sata	18,25	16,47	16,55	18,17
			72 sata	21,95	16,57	20,50	18,02
			14 dana	22,41	16,57	18,75	20,23
		4	14 dana	24,35	16,23	15,90	24,35
		5	14 dana	21,33	16,23	17,22	20,34
		6	14 dana	23,69	16,23	18,81	21,11
		7	14 dana	24,70	17,32	17,39	24,63
	komercijalna jaja	**1**	24 sata	24,57	16,68	19,97	21,28
			4 dana	19,42	16,68	19,57	16,53
			6 dana	19,83	16,68	19,28	17,23
			9 dana	20,28	16,68	19,67	17,29
			11 dana	19,52	16,68	19,56	16,64
			16 dana	23,19	16,68	19,47	20,40



Slika 22. Aktivnost RT u staničnim kulturama pilećih fibroblasta porijeklom iz SPF-jaja. - serija 1 (24h i 72h); - serija 2 (24h i 96h); - serija 3 (24h, 72h i 14 dana); - serija 4 (14 dana); - serija 5 (14 dana); - serija 6 (14 dana) i - serija 7 (14 dana).



Slika 23. Aktivnost RT u staničnim kulturama pilećih fibroblasta porijeklom iz komercijalnih jaja.

U svim sam testiranim primarnim staničnim kulturama porijeklom iz pilećih embrija otkrila aktivnost RT (Tablica 17., Slike 22. i 23).

U supernatantu 24-satne primarne kulture PF porijeklom iz SPF-jaja (serija 1) postoji faktor koji inhibira aktivnost RT (vrijednost Ct za uzorak+RT-standard je znatno veća od vrijednosti Ct za sam RT-standard) (Tablica 17. i Slika 22.). U uzorku s iste stanične kulture stare 72 sata inhibicija je znatno manja. Nakon korekcije za inhibiciju, uočavam da je aktivnost RT veća u kulturi staroj 24 sata.

Uzorci serije 2 nisu inhibirali PERT-test niti u kulturi staroj 24 sata niti u kulturi staroj 96 sati. Aktivnost RT u kulturi staroj 96 sati je veća nego u kulturi staroj 24 sata.

U uzorcima iz serije 3 inhibicija je uočena u kulturama starim 72 sata i 14 dana, ali je nema u kulturi staroj 24 sata. Nakon korekcije za inhibiciju, aktivnost RT je podjednaka u kulturi staroj 24 i 72 sata, a manja je u kulturi staroj 14 dana.

Prema rezultatima prikazanima u Tablici 17. i na Slici 22. zaključila sam da je aktivnost RT podjednaka u svim testiranim supernatantima porijeklom s kontrolnih kultura PF starih 14 dana, uz raspon Ct od 20 do 24. U tri uzorka primarne kulture PF uočila sam inhibiciju aktivnosti RT, dok u ostala dva uzorka nisam.
Rezultati ukazuju na neujednačenost kvalitete supernatanata kulture SPF-jaja obzirom na aktivnost RT i inhibiciju PERT-testa pri kratkotrajnoj kultivaciji.

Supernatanti kulture pilećih fibroblasta iz komercijalnih jaja kultivirani su kroz 16 dana, a uzorkovani su 24 sata i zatim 4, 6, 9, 11 i 16 dana nakon uspostave kulture. U uzorcima je detektirana aktivnost reverzne transkriptaze koja pokazuje tendenciju porasta unutar prva četiri dana kultivacije. Aktivnost RT je konstantna od 4. do 11. dana kultivacije, ali se 16. dana vraća na vrijednost očitanu nakon 24 sata kultivacije. U tim supernatantima također postoji faktor koji inhibira RT standard u uzorku i količina tog faktora se ne mijenja tijekom kultivacije (Tablica 17., Slika 23.). Obzirom da sam istražila samo jednu seriju kulture iz komercijalnih jaja ne mogu suditi o ujednačenosti kvalitete supernatanata kulture komercijalnih jaja.

Razina aktivnosti RT u svim istraženim kulturama pilećih fibroblasta (i od oplođenih SPF-jaja i od oplođenih komercijalnih jaja) nakon kultivacije od 14, odnosno 16 dana, jednaka je ili manja od razine aktivnosti nakon uspostave stanične kulture. Prema tome zaključujem da aktivnost RT potječe od neinfektivnih endogenih retrovirusnih čestica koje se luče iz stanica tijekom kultivacije, no nisu se sposobne umnažati.

4.2.3.2. Embrionirana jaja

Testirani uzorci alantoisne tekućine i albumen embrioniranih jaja bili su pozitivni u PERT-testu. U uzorku alantoisne tekućine prisutno je 300 000× više endogenih retrovirusnih čestica.

Tablica 18. Aktivnost RT u embrioniranim jajima.

Uzorak	Porijeklo uzorka	Ct			
		uzorak	RT-standard	uzorak+ RT-standard	uzorak korigiran prema razrjeđenju i RT-standardu
Albumen 1:10	5 ml združenog uzorka iz 5 jaja	37,41	15,32	16,64	36,09
Alantoisna tekućina 1:10	5 ml združenog uzorka iz 3 jaja	19,63	15,32	17,59	17,36

4.2.3.3. Diploidne i kontinuirane stanične kulture

U PERT-testu istražila sam supernatante diploidne stanične kulture MRC-5 i kontinuiranih staničnih kultura A549, SH-SY5Y, Vero i Vero WHO.

Tablica 19. Rezultati PERT-testa za diploidnu i kontinuirane stanične kulture.

Uzorak	Medij	Rezultati (Ct)		
		uzorak	RT-standard	uzorak+RT-standard
MRC-5 n+13	MEM-H(N)+10% FBS	42,23	16,47	15,87
MRC-5 n+17	MEM-H(N)+10% FBS	42,57	16,30	15,34
A549 11. p.	DMEM-H(N)+10% FBS	38,83	16,30	16,32
A549 12. p.	DMEM-H(N)+10% FBS	41,12	16,30	16,06
A549 13. p.	DMEM-H(N)+10% FBS	41,05	16,30	16,13
SH-SY5Y 10. p	DMEM-H(N)+10% FBS	41,27	16,30	16,60
SH-SY5Y 11. p	DMEM-H(N)+10% FBS	38,96	16,30	15,51
SH-SY5Y 12. p	DMEM-H(N)+10% FBS	39,23	16,30	15,38
Vero, 36. p.	MEM-H(N)+10% FBS	42,66	16,47	15,66
Vero (WHO) 145. p.	MEM-H(N)+10% FBS	nedetektirano	16,30	18,27

U svim testiranim supernatantima, osim u supernatantu Vero WHO stanica, dobila sam pozitivan rezultat u PERT-testu. Visoka vrijednost Ct ukazuje na mali broj molekula RT prisutnih u supernatantu. Supernatant Vero WHO stanica inhibirao je PERT-test te stoga rezultat nisam mogla očitati, što ne znači da u tom supernatantu također ne postoji mali broj molekula RT. Visoke vrijednosti Ct za navedene stanične kulture nalaze se na samom rubu detekcije metode.

4.2.4. Aktivnost reverzne transkriptaze u inficiranim staničnim kulturama

Istražila sam aktivnost RT u primarnim staničnim kulturama pilećih fibroblasta porijeklom iz SPF-jaja, koje su bile inficirane virusom mumpsa, cjepni soj L-Zagreb. U supernatantima inficiranih staničnih kultura se, uz virus, medij i serum, nalazi i stabilizator za virus.

4.2.4.1. Utjecaj stabilizatora u uzorku na PERT-test

Provjerila sam ima li prisutnost stabilizatora u uzorku utjecaj na rezultate PERT-testa. Rezultati iz Tablice 20. pokazuju da se nerazrijeđeni supernatanti i supernatanti razrijeđeni s 20% MEM-H(N) (v/v) u PERT-testu ne razlikuju. Također, ti uzorci nisu inhibirali PERT-test. Supernatanti u koje sam dodala 20% stabilizatora (v/v) inhibirali su PERT-test. Iz tog razloga, uzorke supernatanata inficirane kulture pilećih fibroblasta nisam stabilizirala sa stabilizatorom nakon prikupljanja, već sam ih odmah pohranila na -80 ºC ili niže.

Tablica 20. Istraživanje utjecaja stabilizatora na rezultate PERT-testa (postoci predstavljaju volumne udjele).

Uzorci	Matriks	Ct		
		uzorak	RT-standard	uzorak+ RT-standard
supernatant PF, 24 sata nakon uspostave kulture	MEM-H(N)+10%FBS	19,86	15,16	15,50
supernatant PF, 24 sata nakon uspostave kulture + 20% MEM-H(N) (kontrola)	MEM-H(N)+10%FBS + 20% MEM-H(N)	19,41	15,16	15,32
supernatant PF, 24 sata nakon uspostave kulture + 20% Stabilizatora	MEM-H(N)+10%FBS + 20% Stabilizatora	20,71	15,16	17,07
supernatant PF, 96 sata nakon uspostave kulture	MEM-H(N)+10%FBS	17,09	15,16	15,42
supernatant PF, 96 sata nakon uspostave kulture + 20% MEM-H(N) (kontrola)	MEM-H(N)+10%FBS + 20% MEM-H(N)	16,38	15,16	15,07
supernatant PF, 96 sata nakon uspostave kulture + 20% Stabilizatora	MEM-H(N)+10%FBS + 20% Stabilizatora	19,25	15,16	17,79
MEM-H(N)+10% FBS	-	nedetektirano	15,16	18,63
MEM-H(N)+10% FBS + 20% MEM-H(N) (kontrola)	-	nedetektirano	15,16	18,82
MEM-H(N)+10% FBS + 20% Stabilizatora	-	nedetektirano	15,16	nedetektirano

4.2.4.2. Aktivnost RT u inficiranim staničnim kulturama – Ct vrijednosti

Rezultati koji slijede su rezultati analize uzoraka žetvi iz pokusa P1 do P8 bez dodanog stabilizatora.

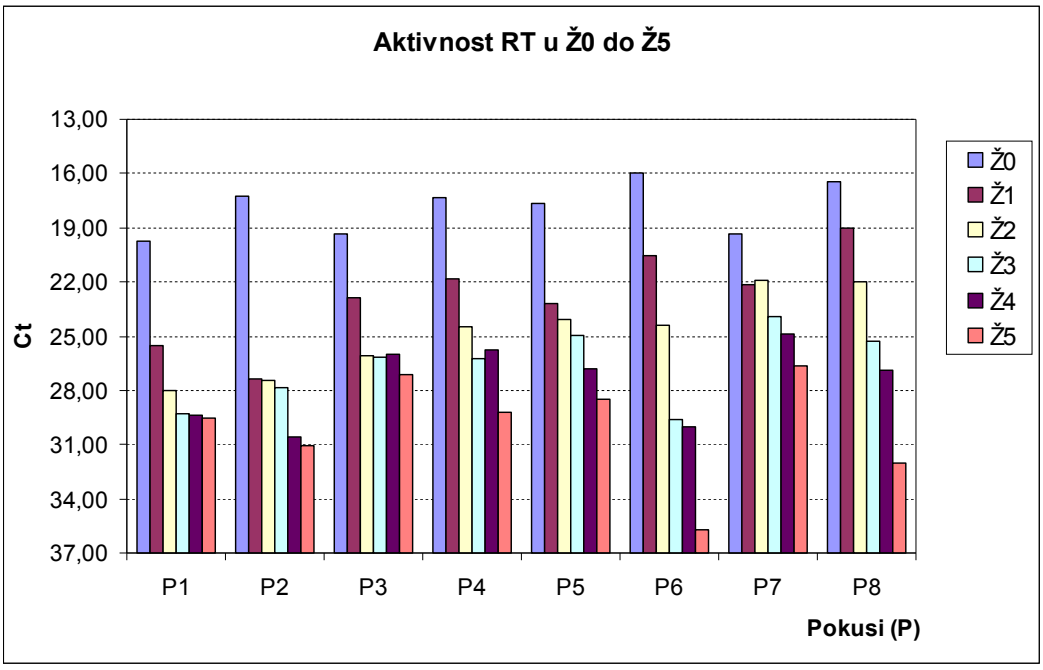
Tablica 21. Aktivnost RT (Ct) u žetvama Ž0 do Ž5 u pokusima P1 do P8.

Pokus	Operativni faktori	Žetve	Ct		
			uzorak	RT-standard	uzorak+ RT-standard
P1	P, A, 24 sata	Ž0	21,12	15,34	16,73
		Ž1	26,16	15,34	15,95
		Ž2	28,43	15,34	15,77
		Ž3	29,28	15,34	15,21
		Ž4	29,45	15,34	15,38
		Ž5	29,64	15,34	15,48
P2	K, A, 24 sata	Ž0	17,92	15,34	15,98
		Ž1	27,35	15,34	15,30
		Ž2	29,10	15,34	17,02
		Ž3	28,10	15,34	15,61
		Ž4	30,82	15,34	15,55
		Ž5	31,06	15,34	15,34
P3	P, B, 24 sata	Ž0	22,85	14,96	18,44
		Ž1	25,09	14,96	17,19
		Ž2	26,98	14,96	15,82
		Ž3	26,81	14,96	15,60
		Ž4	26,30	14,96	15,27
		Ž5	27,51	14,96	15,37
P4	K, B, 24 sata	Ž0	19,21	14,96	16,80
		Ž1	22,96	14,96	16,08
		Ž2	24,65	14,96	15,13
		Ž3	26,65	14,96	15,40
		Ž4	26,29	14,96	15,51
		Ž5	29,50	14,96	15,24
P5	P, A, 48 sati	Ž0	19,59	15,24	17,16
		Ž1	25,35	15,24	17,37
		Ž2	24,84	15,24	15,99
		Ž3	25,16	15,24	15,44
		Ž4	27,37	15,24	15,77
		Ž5	28,90	15,24	15,63
P6	K, A, 48 sati	Ž0	17,50	15,24	16,76
		Ž1	23,80	15,24	18,50
		Ž2	24,57	15,24	15,39
		Ž3	30,00	15,24	15,66
		Ž4	30,44	15,24	15,69
		Ž5	36,14	15,24	15,65

nastavak Tablice 21.

Pokus	Operativni faktori	Žetve	Ct		
			uzorak	RT-standard	uzorak+ RT-standard
P7	P, B, 48 sati	Ž0	22,46	14,82	17,96
		Ž1	26,29	14,82	18,95
		Ž2	28,32	14,82	21,22
		Ž3	24,73	14,82	15,60
		Ž4	25,87	14,82	15,79
		Ž5	27,14	14,82	15,30
P8	K, B, 48 sati	Ž0	19,68	14,82	18,01
		Ž1	20,80	14,82	16,59
		Ž2	22,88	14,82	15,72
		Ž3	25,82	14,82	15,36
		Ž4	27,34	14,82	15,25
		Ž5	32,48	14,82	15,31

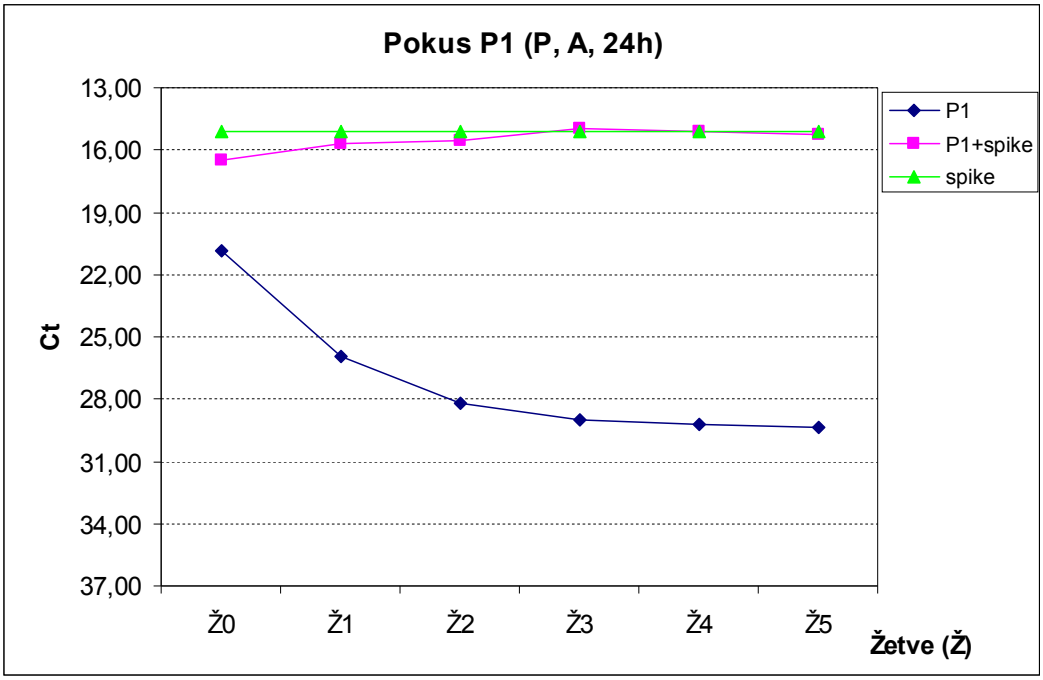
Aktivnost RT u pojedinim žetvama (Ž0 do Ž5) kroz pokuse prikazana je na Slici 24.. Vrijednost Ct u uzorku korigirana je prema vrijednosti Ct u uzorku+RT-standard.



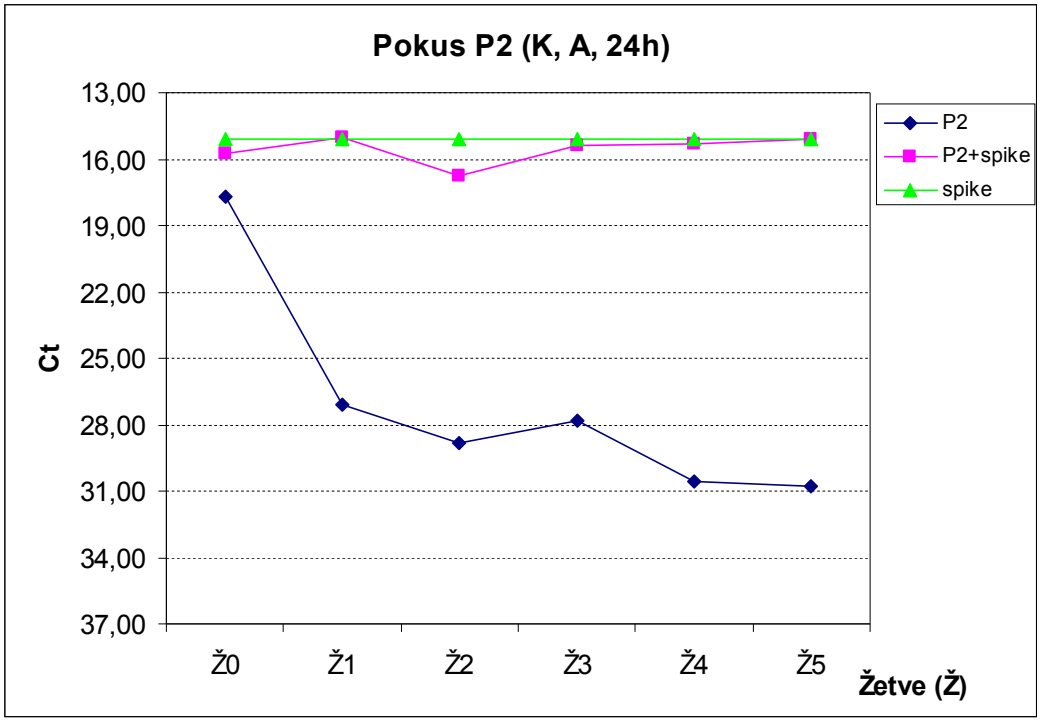
Slika 24. Usporedba aktivnosti RT u žetvama i pokusima (korigirano prema RT-standardu).

U svim pokusima aktivnost RT najviša je u žetvi nula (Ž0) (Slika 24.), a zatim se smanjuje u svakoj sljedećoj žetvi i najniža je u petoj žetvi (Ž5), bez obzira na operativne uvjete pojedinog pokusa. Navedeno je i očekivano jer je vrijeme prije skupljanja žetve Ž0 najduže (72h), za razliku od žetvi Ž1-Ž5 koje su prikupljane nakon 24h ili 48h.

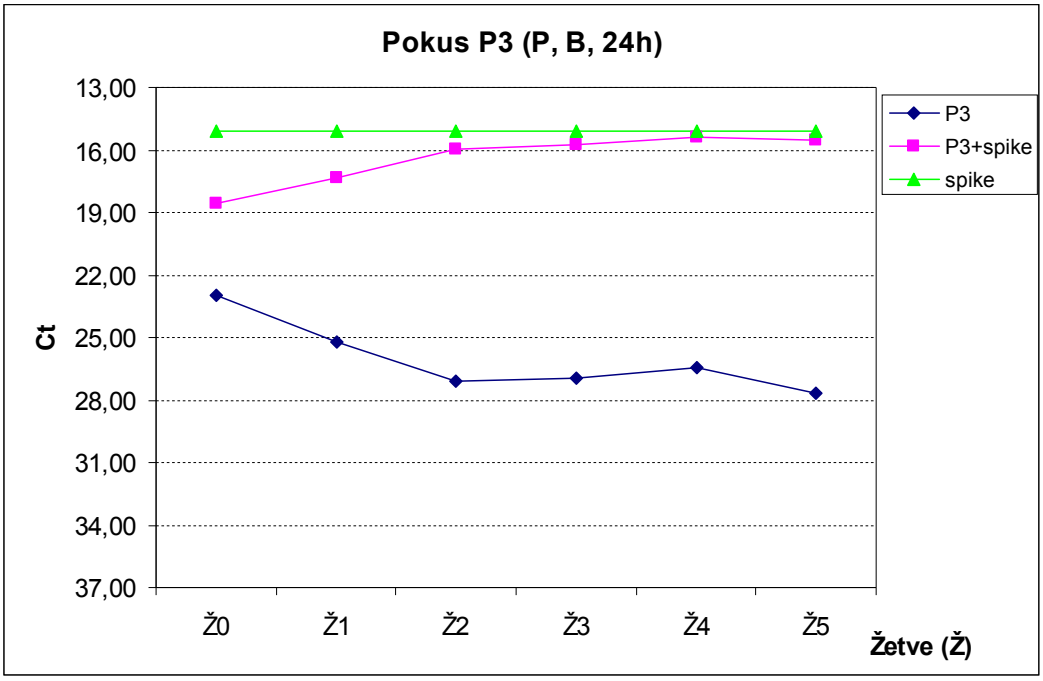
Slike 25. do 32. koje slijede sadrže prikaze rezultata iz Tablice 21., po pokusima (P1 do P8), bez korekcije rezultata prema uzorku RT-standarda.



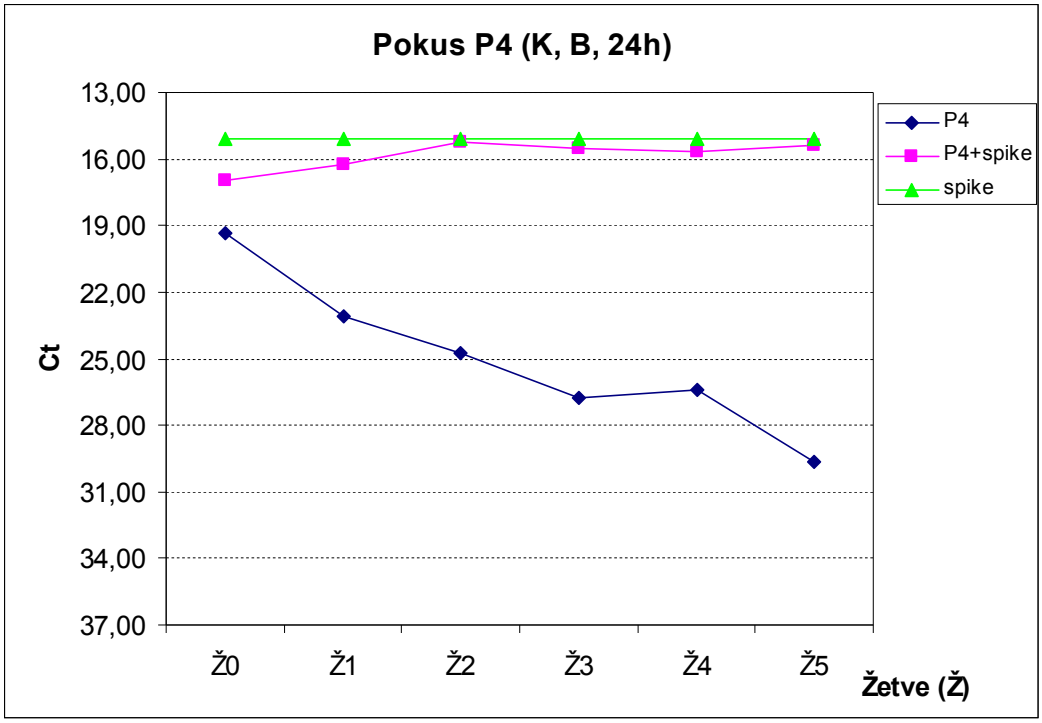
Slika 25. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P1 (P: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



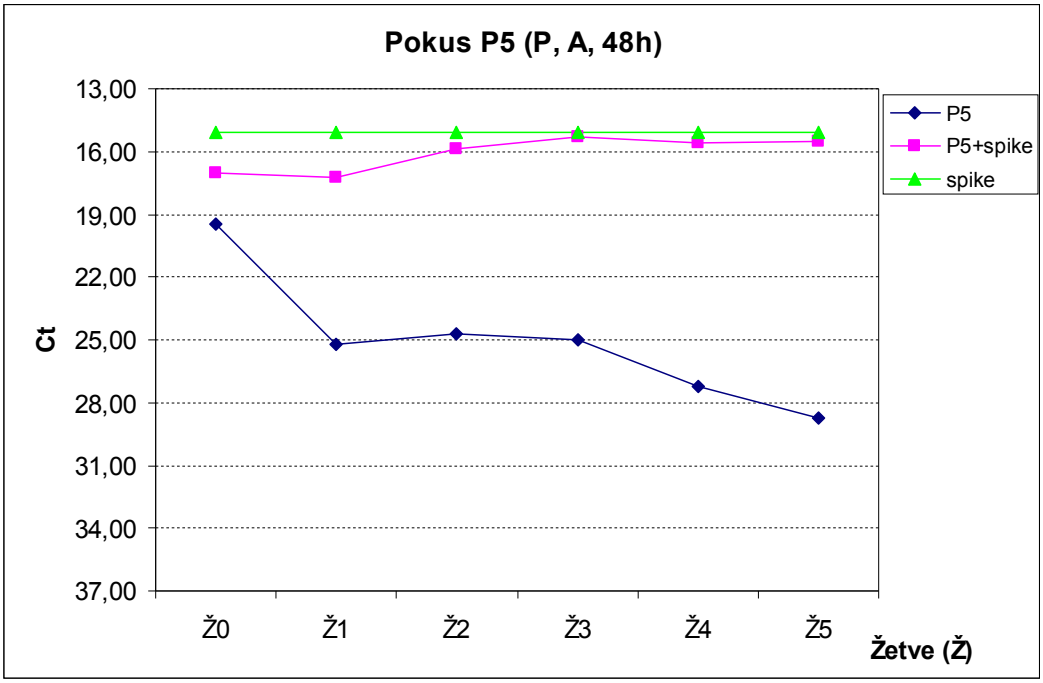
Slika 26. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P2 (K: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



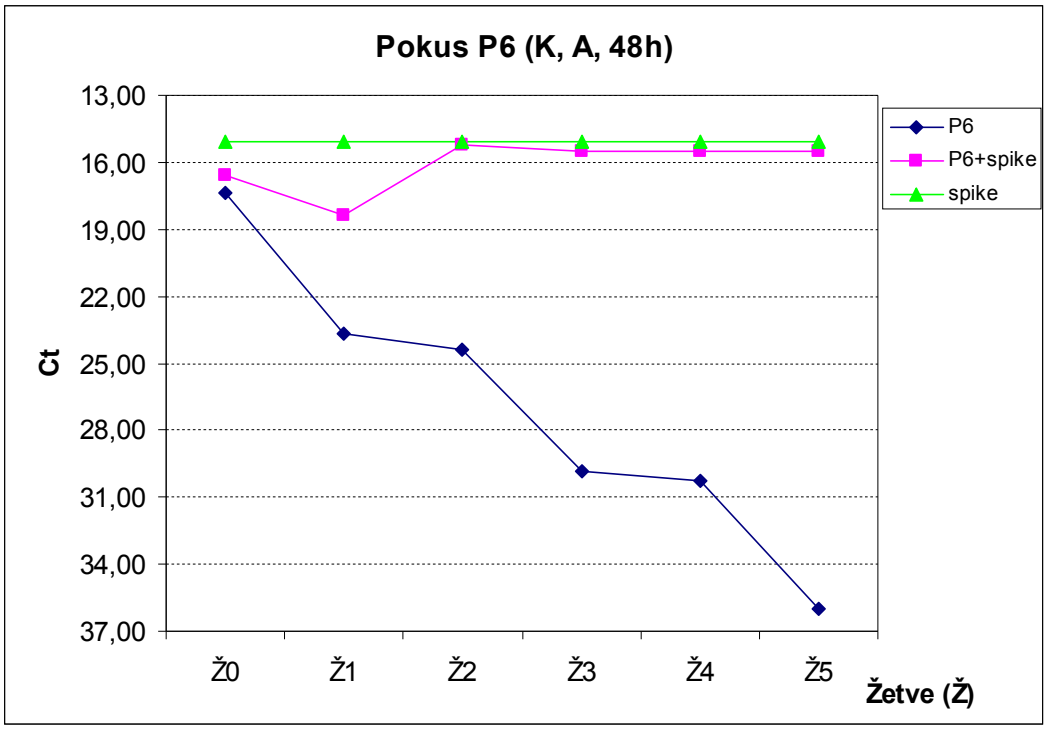
Slika 27. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P3 (P: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



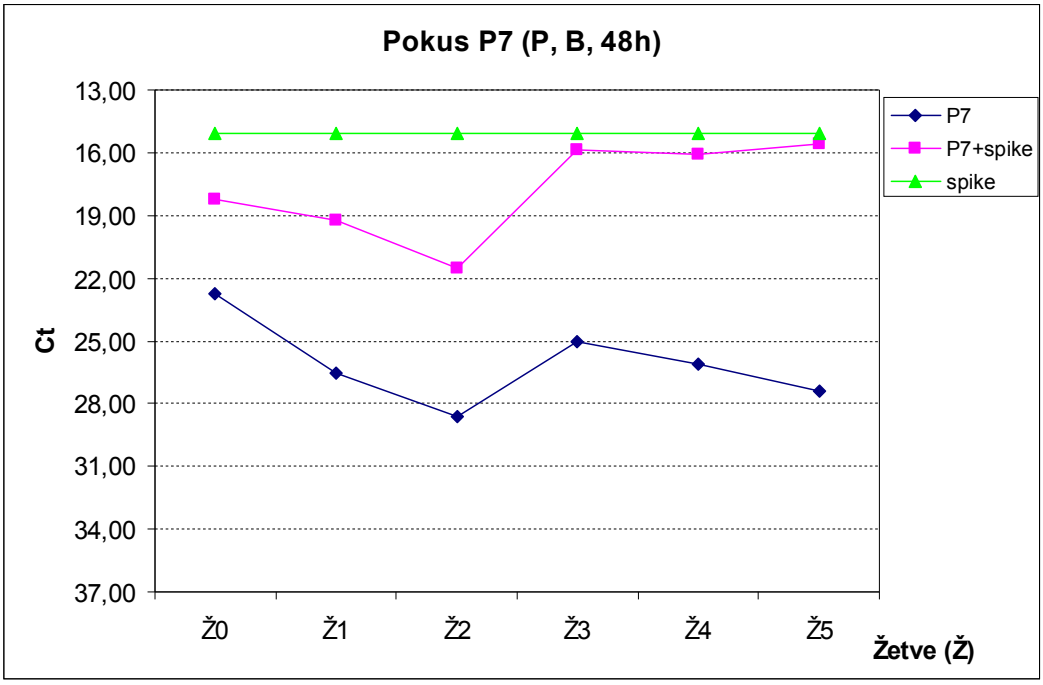
Slika 28. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P4 (K: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



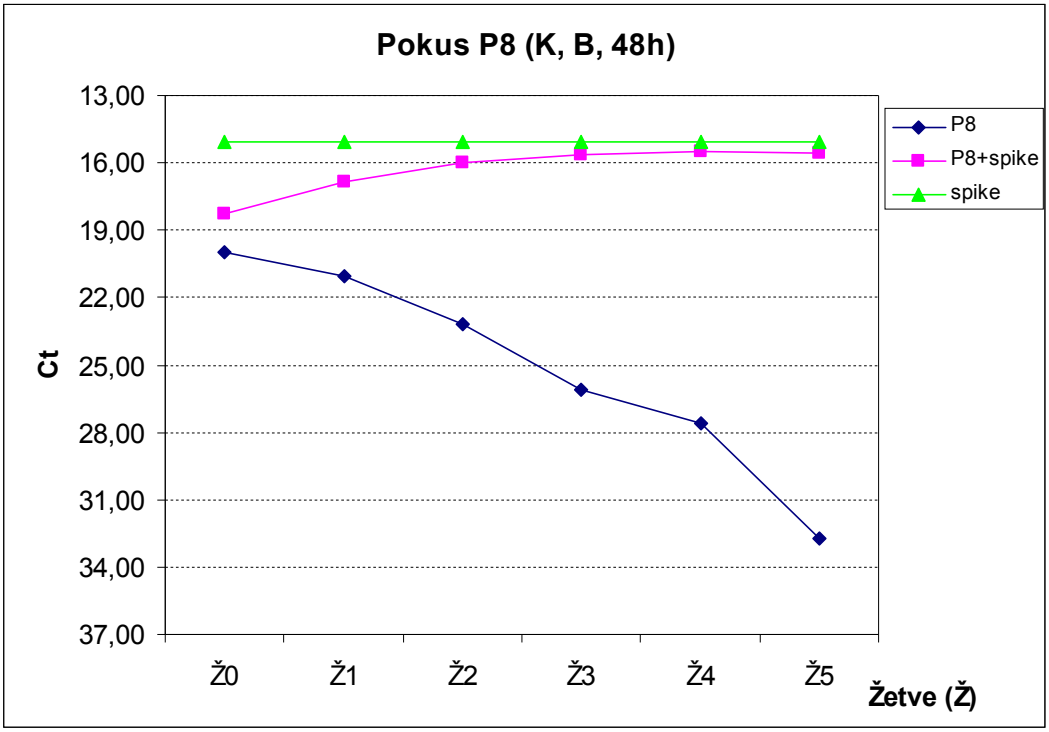
Slika 29. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P5 (P: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 30. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P6 (K: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 31. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P7 (P: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 32. Aktivnost RT kroz žetve u pokusu P8 (K: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).

Inhibicija aktivnosti RT opažena je u ranim žetvama (Ž0 do Ž2) pokusa P3 do P8. Inhibicija je najizraženija u P7 u žetvama Ž0 do Ž2. Jačina inhibicije nije povezana s načinom pripreme stanične kulture niti sa inokulacijom virusa.

4.2.4.3. Aktivnost RT u inficiranim staničnim kulturama – broj virusnih čestica

Ct vrijednosti preračunate su u broj endogenih retrovirusnih čestica kako bi se mogao izračunati prinos virusnih čestica po stanici, te tako razlučiti koji operativni faktor ima kakav utjecaj na lučenje virusnih čestica. Broj virusnih čestica izračunat je preko AMV-RT-standarda na temelju izmjerenih Ct vrijednosti za svaki uzorak žetve. Vrijednosti su okvirne i ne odgovaraju stvarnom broju endogenih retrovirusnih čestica koje mjerimo, budući da za njih nedostaju relevantni podaci kao specifična aktivnost mjerene RT, molekularna masa RT i broj molekula RT po virusnoj čestici. Unatoč tome, rezultati prikazani kao broj virusnih čestica slikoviti su i u omjerima odgovaraju stvarnom stanju, bez obzira na točan brojčani iznos.

Broj virusnih čestica naveden u Tablici 22. je broj nakon korekcije prema RT-standardu. Jasno je vidljivo kako je broj virusnih čestica daleko najveći u Ž0 i opada do Ž5.

Tablica 22. Aktivnost RT (broj virusnih čestica) u žetvama Ž0 do Ž5 u pokusima P1 do P8.

Pokus	Operativni faktori	Žetve	Broj virusnih čestica	
			uzorak	RT-standard
P1	P, A, 24 sata	Ž0	128 487	4 153 217
		Ž1	1281	4 153 217
		Ž2	184	4 153 217
		Ž3	67	4 153 217
		Ž4	60	4 153 217
		Ž5	56	4 153 217
P2	K, A, 24 sata	Ž0	893 934	4 153 217
		Ž1	308	4 153 217
		Ž2	291	4 153 217
		Ž3	211	4 153 217
		Ž4	23	4 153 217
		Ž5	16	4 153 217
P3	P, B, 24 sata	Ž0	212 032	5 324 925
		Ž1	16 540	5 324 925
		Ž2	1526	5 324 925
		Ž3	1472	5 324 925
		Ž4	1679	5 324 925
		Ž5	746	5 324 925
P4	K, B, 24 sata	Ž0	914 709	5 324 925
		Ž1	34 860	5 324 925
		Ž2	5062	5 324 925
		Ž3	1429	5 324 925
		Ž4	2015	5 324 925
		Ž5	158	5 324 925

nastavak Tablice 22.

Pokus	Operativni faktori	Žetve	Broj virusnih čestica	
			uzorak	RT-standard
P5	P, A, 48 sati	Ž0	968 713	5 943 689
		Ž1	15 373	5 943 689
		Ž2	8029	5 943 689
		Ž3	4194	5 943 689
		Ž4	1031	5 943 689
		Ž5	296	5 943 689
P6	K, A, 48 sati	Ž0	3 420 829	5 943 689
		Ž1	113 678	5 943 689
		Ž2	6276	5 943 689
		Ž3	133	5 943 689
		Ž4	98	5 943 689
		Ž5	1	5 943 689
P7	P, B, 48 sati	Ž0	147 349	4 992 087
		Ž1	15 951	4 992 087
		Ž2	19 248	4 992 087
		Ž3	3928	4 992 087
		Ž4	1867	4 992 087
		Ž5	471	4 992 087
P8	K, B, 48 sati	Ž0	1 350 536	4 992 087
		Ž1	184 902	4 992 087
		Ž2	18 365	4 992 087
		Ž3	1387	4 992 087
		Ž4	387	4 992 087
		Ž5	7	4 992 087

U Tablici 23. prikazan je za svaki pokus prinos retrovirusnih čestica po stanici kroz žetve. U Ž0 se nalazi FBS i ta se žetva u proizvodnji virusnog cjepiva inače odbacuje pa sam tu žetvu obradila odvojeno od žetvi Ž1 do Ž5. Vrijednosti za prinos za Ž0 navedene u Tablici 23. koristila sam direktno za računanje efekata faktora X1 do X3 na razinu aktivnosti RT (Tablica 25. i Slika 41.). Za Ž1 do Ž5 prvo sam izračunala kumulativni prinos i vrijednosti obradila grafički, a za računanje efekata faktora koristila sam nagib pravca u linearnom dijelu krivulje kumulativnog prinosa (Tablica 24. i 26; Slike 33.-40. i 42.).

Tablica 23. Prinos retrovirusnih čestica po stanici u pokusima P1 do P8.

Pokusi	Faktori			Prinos (broj retrovirusnih čestica po stanici)					
	X1	X2	X3	Ž0[6]	Ž1	Ž2	Ž3	Ž4	Ž5
P1	-	-	-	0,36614	0,00365	0,00418	0,00437	0,00454	0,00470
P2	+	-	-	2,71193	0,00093	0,00182	0,00246	0,00253	0,00258
P3	-	+	-	1,01776	0,07939	0,08672	0,09378	0,10184	0,10542
P4	+	+	-	4,39060	0,16733	0,19162	0,19848	0,20816	0,20892
P5	-	-	+	2,76045	0,04381	0,06669	0,07864	0,08158	0,08242
P6	+	-	+	10,37779	0,34487	0,36391	0,36431	0,36461	0,36461
P7	-	+	+	0,70727	0,07656	0,16895	0,18781	0,19677	0,19903
P8	+	+	+	6,48257	0,88753	0,97568	0,98234	0,98420	0,98423

Tablica 24. Nagib pravca kao odziv procesa za računanje kritičnih efekata za žetve iza Ž0.

Pokusi	Faktori			Nagib pravca[7]
	X1	X2	X3	
P1	-	-	-	$6{,}91\times10^{-6}$
P2	+	-	-	$2{,}51\times10^{-6}$
P3	-	+	-	$3{,}10\times10^{-4}$
P4	+	+	-	$2{,}57\times10^{-4}$
P5	-	-	+	$3{,}94\times10^{-5}$
P6	+	-	+	$7{,}31\times10^{-6}$
P7	-	+	+	$1{,}17\times10^{-4}$
P8	+	+	+	$5{,}73\times10^{-5}$

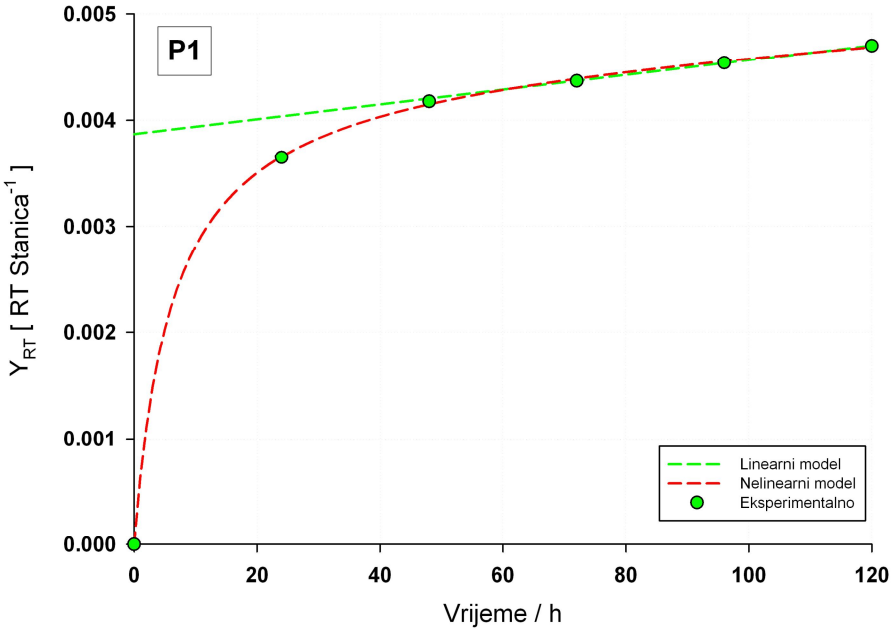
Tablica 25. Efekti faktora na prinos retrovirusnih čestica u Ž0.

Faktori	Efekt	$(SE)_e$	*t*	p[8]
X1	4,778	1,859	2,5697	0,0501
X2	-0,905	1,859	-0,4865	0,6472

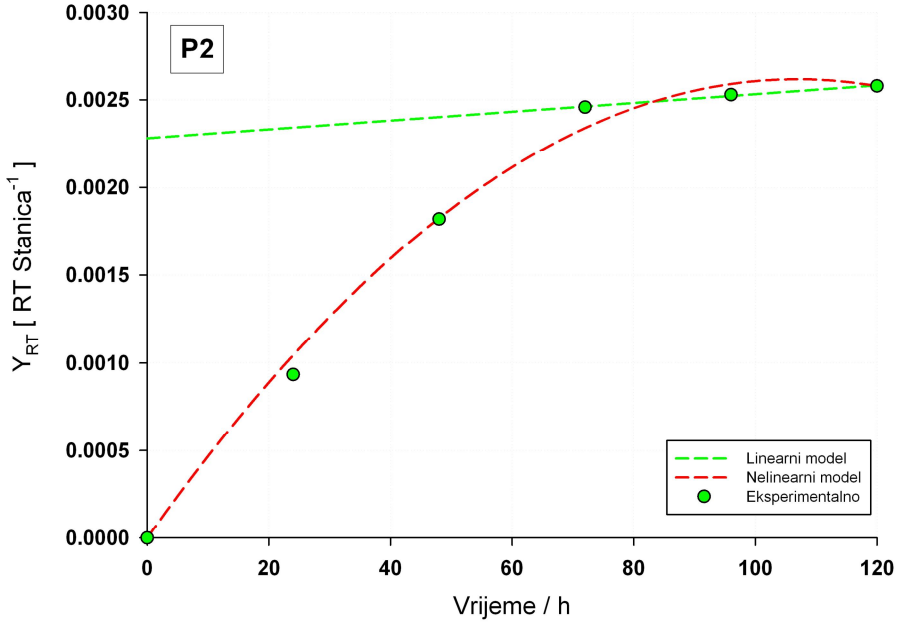
Tablica 26. Efekti faktora na prinos retrovirusnih čestica u Ž1 do Ž5.

Faktori	Efekt	$(SE)_e$	*t*	p[3]
X1	$-3{,}739\times10^{-5}$	$5{,}477\times10^{-5}$	-0,6827	0,5323
X2	$1{,}712\times10^{-4}$	$5{,}477\times10^{-5}$	3,1248	0,0354
X3	$-8{,}876\times10^{-5}$	$5{,}477\times10^{-5}$	-1,6204	0,1805

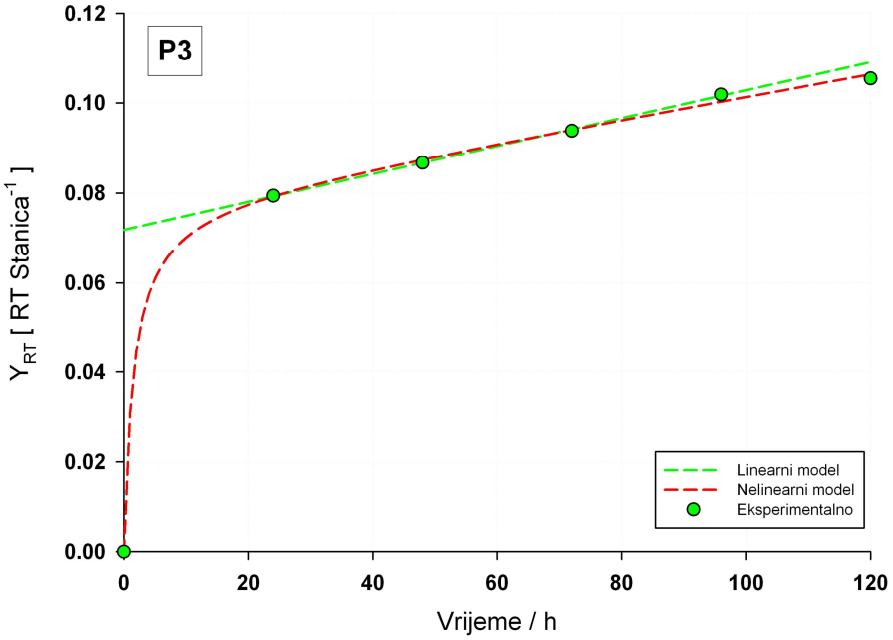
[6] U Ž0 kao odziv procesa za računanje kritičnih efekata operativnih faktora uzet je prinos.
[7] Iz linearnog uspona kumulativnog prinosa na zadnjim žetvama (Ž3 do Ž5, eventualno uključujući Ž2, ukoliko je u linearnom odnosu s Ž3 do Ž5).
[8] značajno ako je $p<0{,}05$



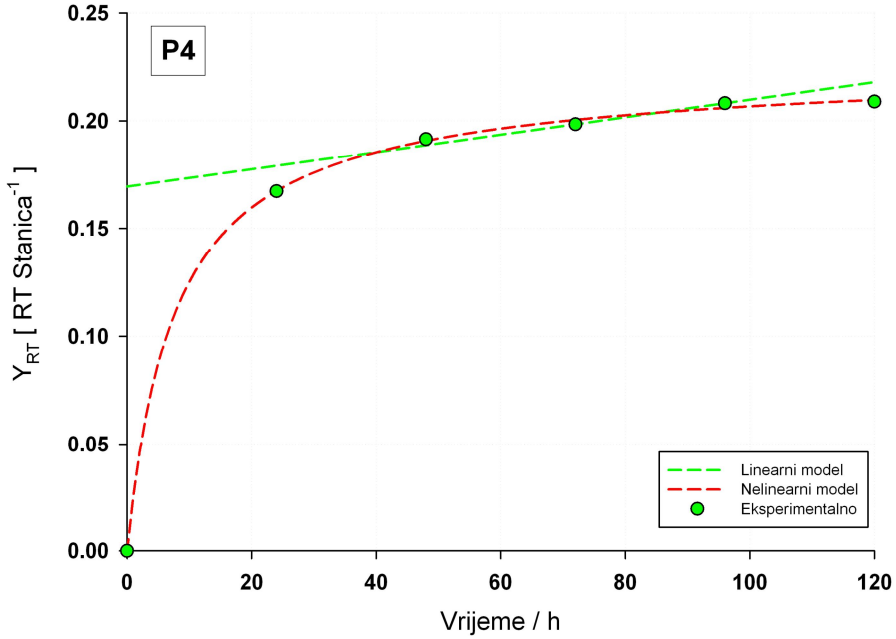
Slika 33. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P1 (P: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



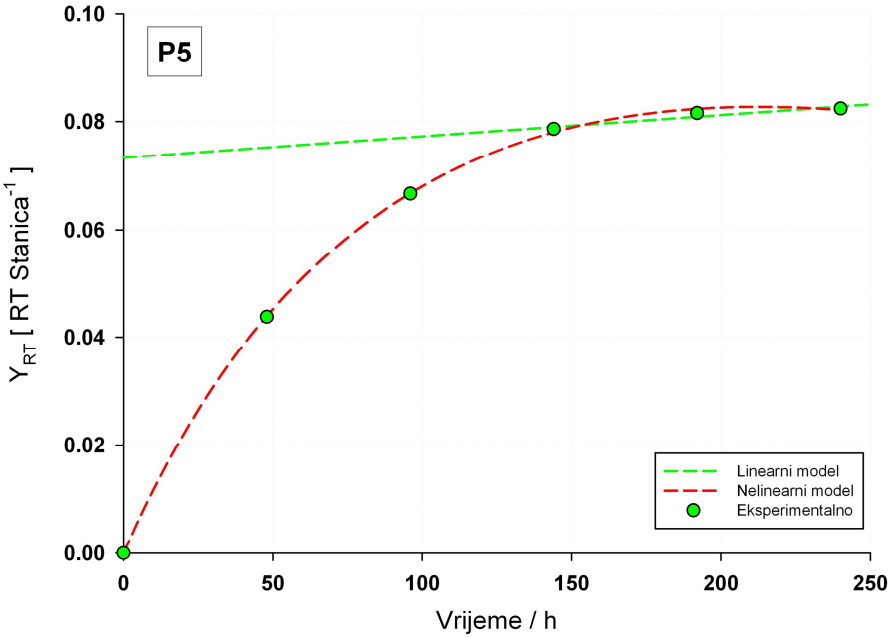
Slika 34. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P2 (K: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



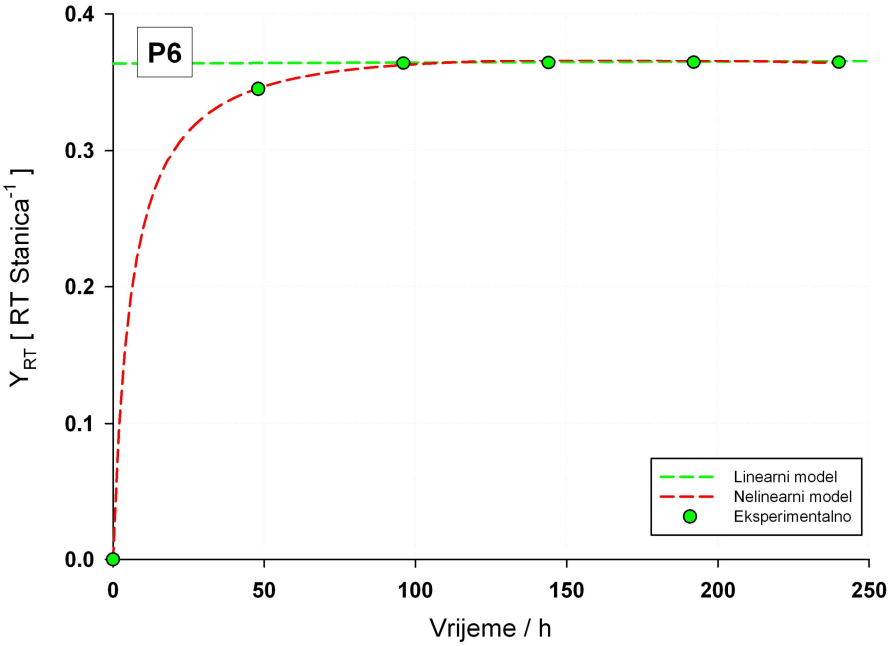
Slika 35. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P3 (P: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



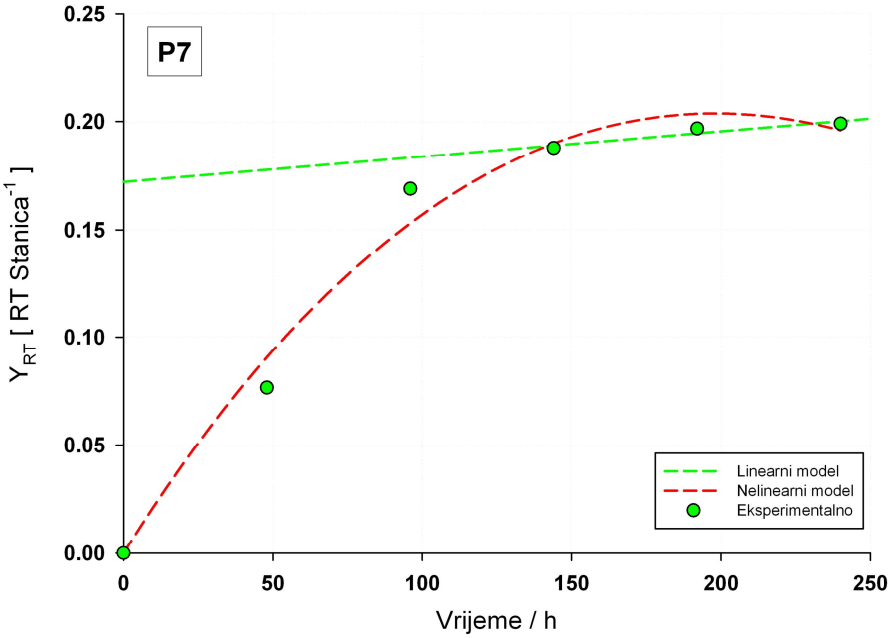
Slika 36. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P4 (K: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



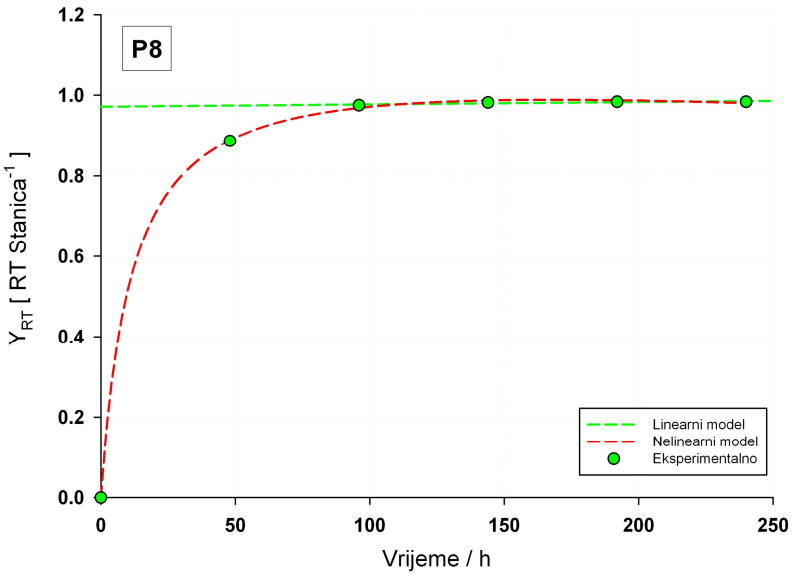
Slika 37. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P5 (P: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



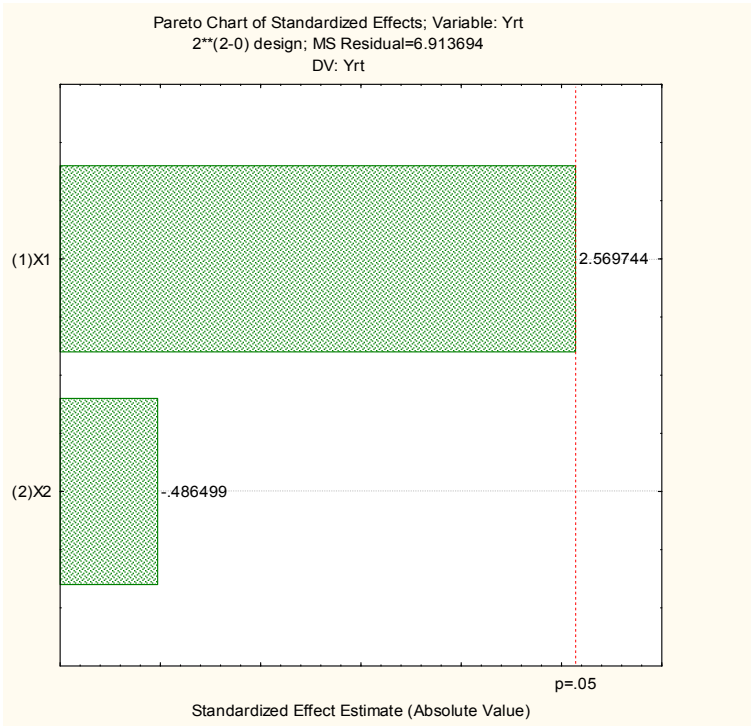
Slika 38. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P6 (K: način pripreme PF, A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



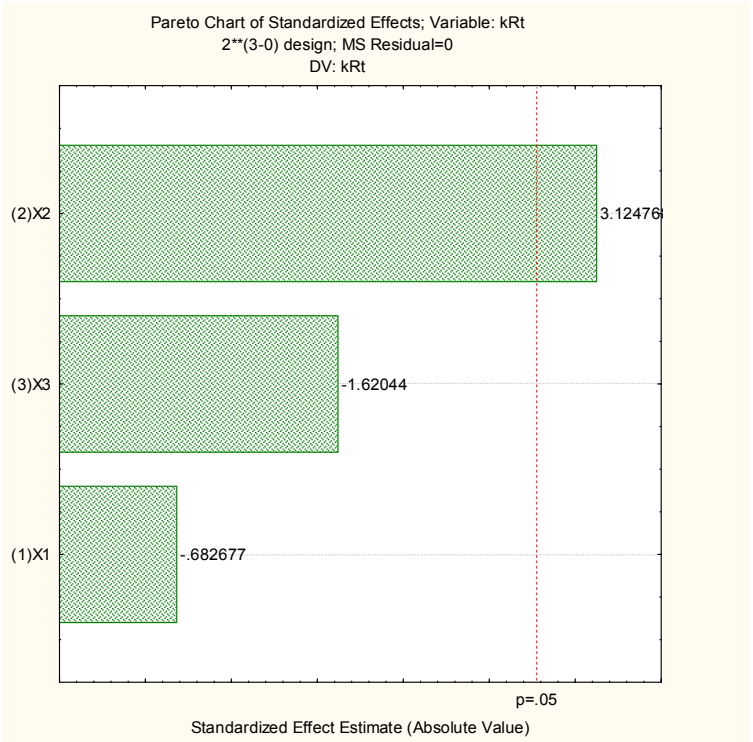
Slika 39. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P7 (P: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 40. Nelinearni i linearni model prinosa retrovirusnih čestica po stanici za pokus P8 (K: način pripreme PF, B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).



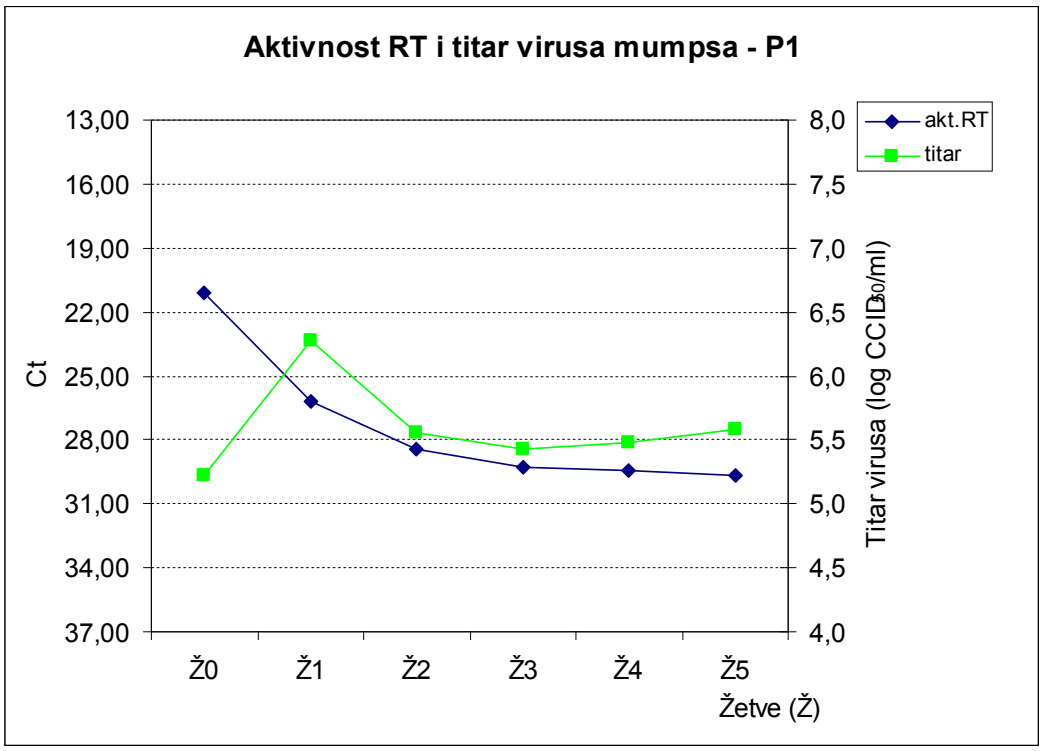
Slika 41. Pareto dijagram s apsolutnim vrijednostima standardiziranog efekta za svaki faktor za prinos retrovirusnih čestica po stanici u Ž0 (vodoravne kolone) i t_{krit} vrijednost za razinu značajnosti α=0,05 (crvena isprekidana linija).



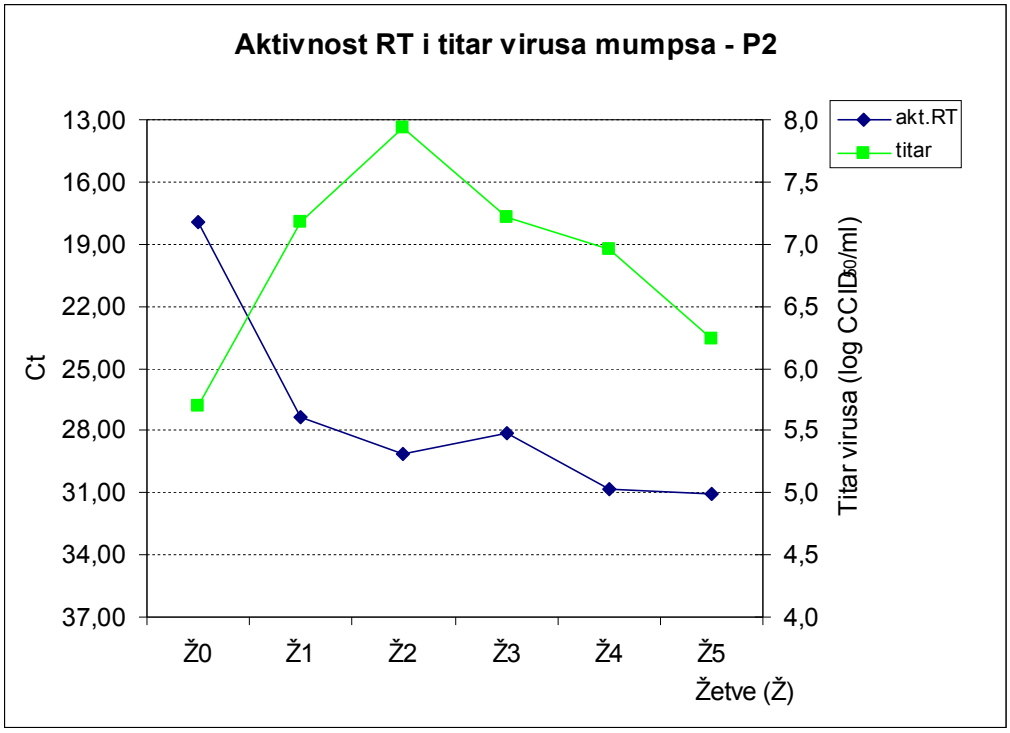
Slika 42. Pareto dijagram s apsolutnim vrijednostima standardiziranog efekta za svaki faktor za prinos retrovirusnih čestica po stanici u Ž1 do Ž5 (vodoravne kolone) i t_{krit} vrijednost za razinu značajnosti α=0,05 (crvena isprekidana linija).

4.2.4.4. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa

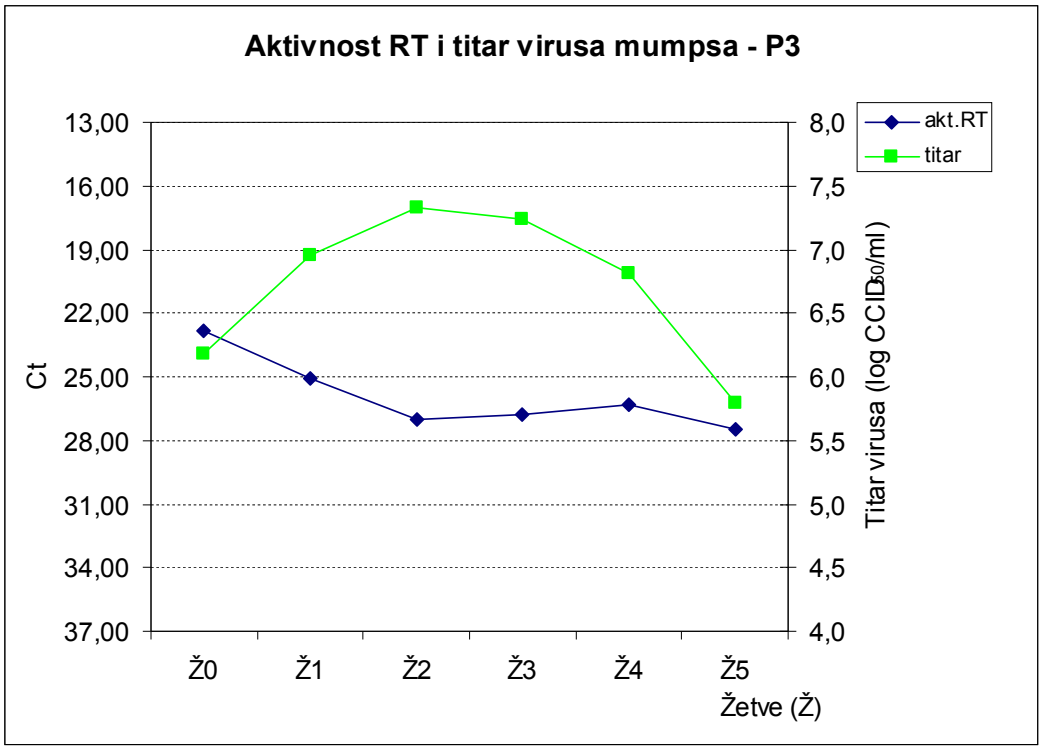
Usporedba titra virusa mumpsa i aktivnosti RT u uzorcima žetvi iz pokusa P1 do P8 pokazuju da titar virusa mumpsa raste od Ž0 do Ž1, odnosno Ž2, nakon čega počinje padati, dok aktivnost RT pada od Ž0 do Ž5. (Slike 43.-50). Razlika među uzorcima žetvi za mjerenje aktivnosti RT i uzorcima žetvi za mjerenje titra je dodatak stabilizatora u potonje.



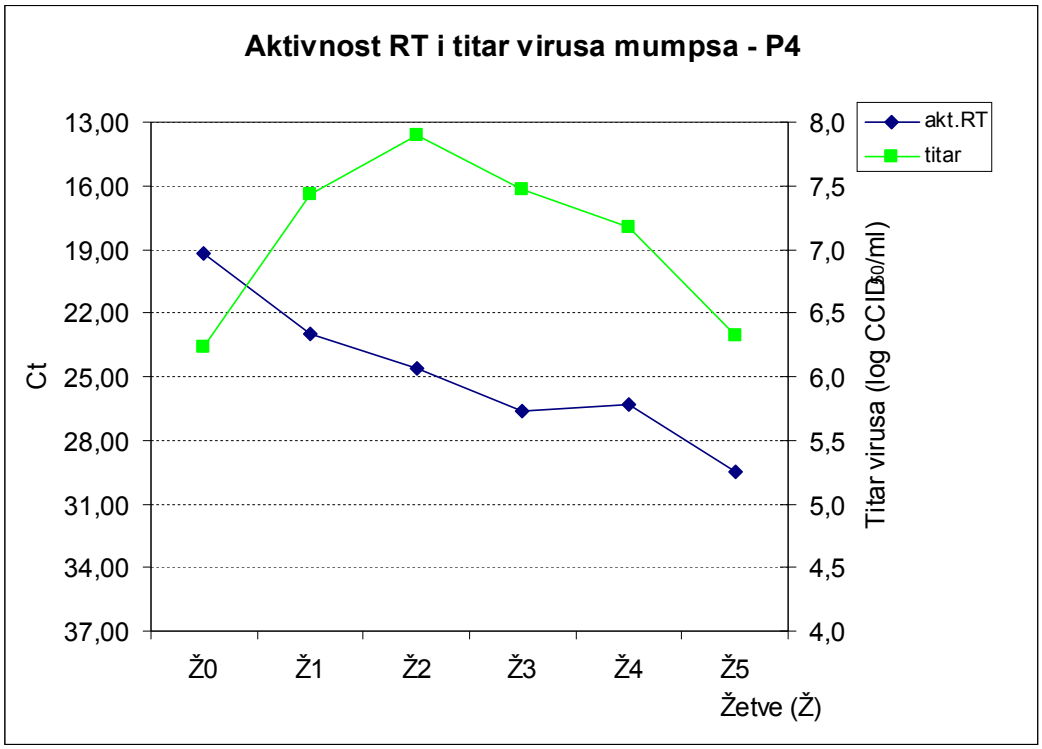
Slika 43. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P1 (P: način pripreme PF; A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



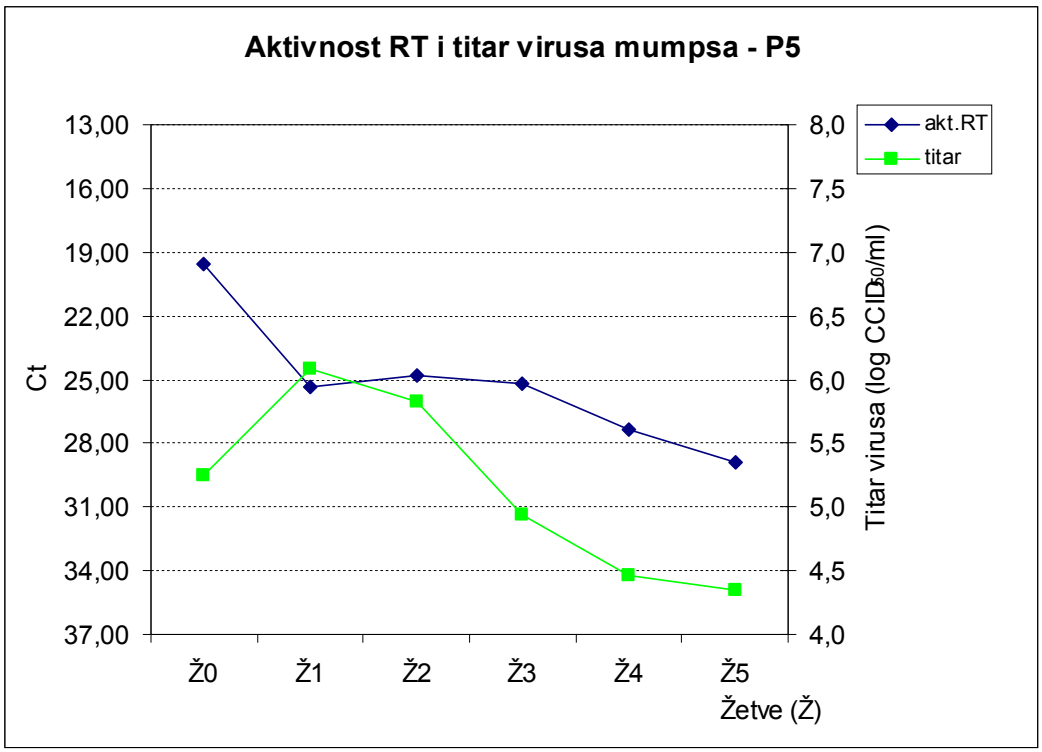
Slika 44. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P2 (K: način pripreme PF; A: inokulacija virusa na stanični sloj; 24h: žetve svaka 24 sata).



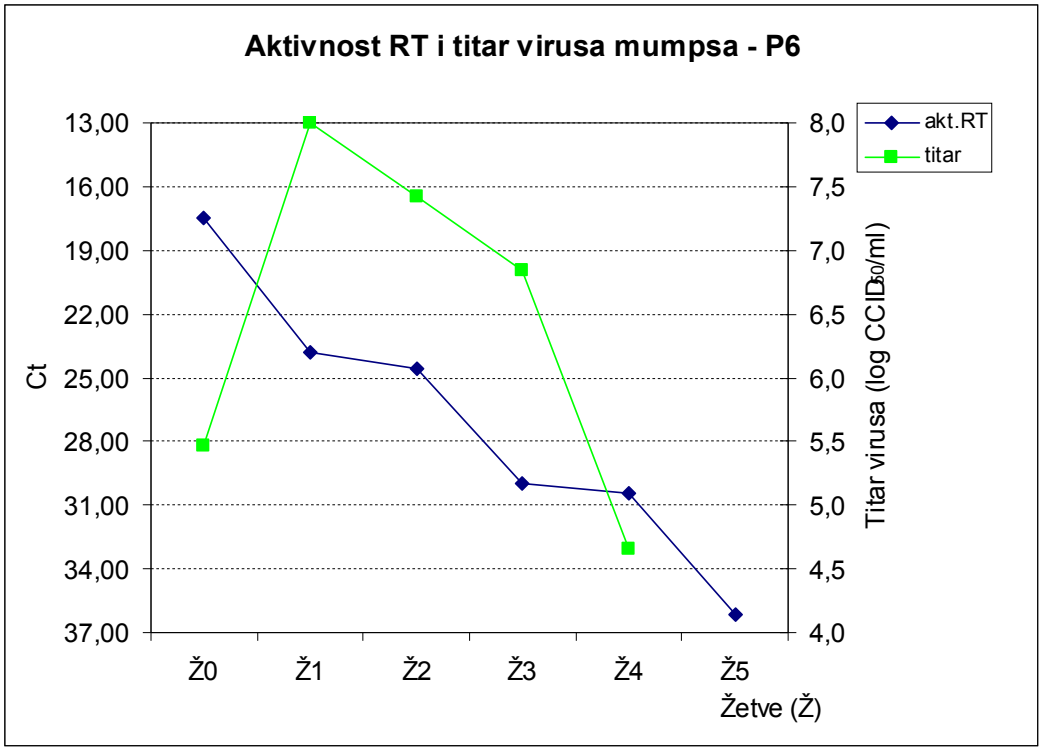
Slika 45. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P3 (P: način pripreme PF; B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



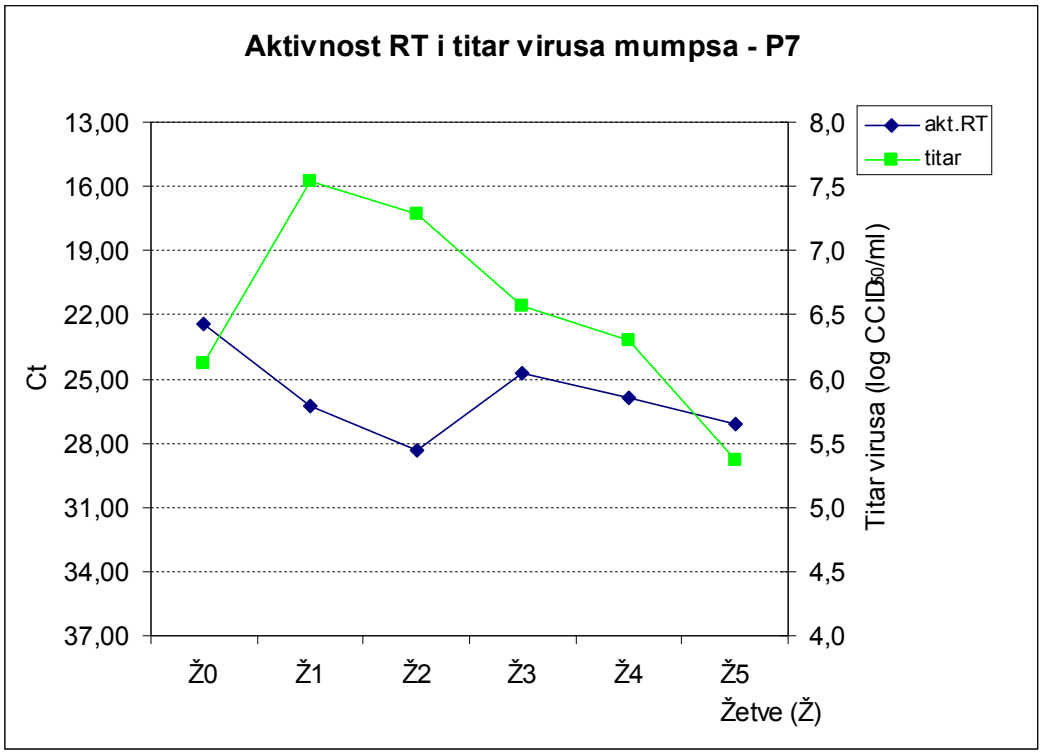
Slika 46. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P4 (K: način pripreme PF; B: inokulacija virusa u suspenziju; 24h: žetve svaka 24 sata).



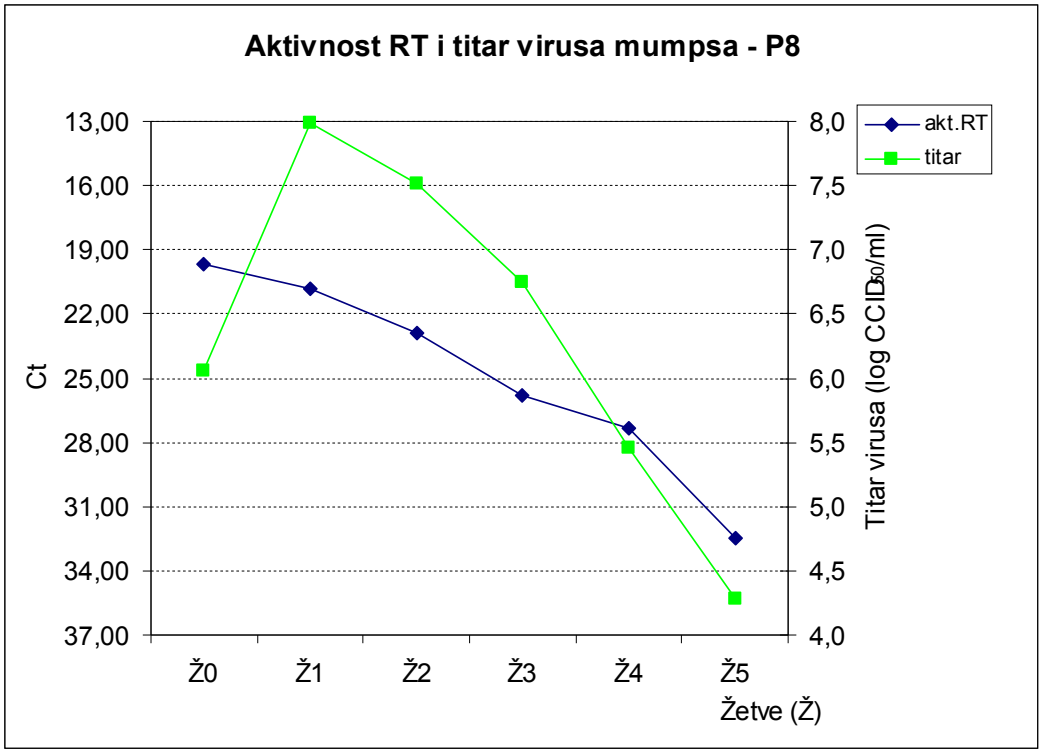
Slika 47. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P5 (P: način pripreme PF; A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 48. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P6 (K: način pripreme PF; A: inokulacija virusa na stanični sloj; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 49. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P7 (P: način pripreme PF; B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).



Slika 50. Usporedba aktivnosti RT i titra virusa mumpsa u pokusu P8 (K: način pripreme PF; B: inokulacija virusa u suspenziju; 48h: žetve svakih 48 sati).

4.3. Infektivnost retrovirusnih čestica porijeklom iz staničnih kultura

4.3.1. Testiranje na indikatorskim staničnim kulturama

Kako bih otkrila potječe li aktivnost RT od infektivnih endogenih retrovirusnih čestica, istražila sam infektivnost na indikatorskim staničnim kulturama MRC-5 i Vero u koje sam dodala supernatant primarne kulture pilećih fibroblasta koji je bio pozitivan u PERT-testu. Indikatorske stanične kulture sam zatim kultivirala 14 dana tijekom kojih sam skupljala uzorke za PERT-test (Tablica 27.). U Tablicama 28. do 31. nalaze se podaci iz Tablice 27. rasčlanjeni prema vrsti uzorka.

Tablica 27. Vrijednost Ct uzoraka za PERT-test, skupljenih tijekom istraživanja infektivnosti endogenih retrovirusnih čestica na indikatorskim staničnim kulturama.

Uzorak broj	Opis uzorka	Ct			
		uzorak	RT-standard	uzorak+RT-standard	uzorak korigiran prema RT-standardu
1	MEM-H(N)+5% FBS	34,51	16,47	16,12	34,51
2	supernatant PF, 24 sata	18,25	16,47	16,55	18,17
3	supernatant PF, 72 sata	21,95	16,57	20,50	18,02
4	MEM-H(N)+2% FBS	38,81	16,57	18,76	36,62
5	supernatant PF, 14 dana	22,41	16,57	18,75	20,23
		23,00	15,32	21,39	16,93
6	MEM-H(N)+10% FBS	33,53	16,47	16,33	33,53
7	supernatant MRC-5, 72 sata; prije infekcije	42,23	16,47	15,87	42,23
8	supernatant Vero, 72 sata; prije infekcije	42,66	16,47	15,66	42,66
9	supernatant MRC-5, 1. dan nakon infekcije	20,54	16,47	16,05	20,54
10	supernatant Vero, 1. dan nakon infekcije	20,21	16,47	15,94	20,21
11	supernatant MRC-5, 4. dan nakon infekcije	n.t.*	n.t.*	n.t.*	n.t.*
12	supernatant Vero, 4. dan nakon infekcije	n.t.*	n.t.*	n.t.*	n.t.*
13	supernatant MRC-5, 7. dan nakon infekcije	21,73	16,47	16,29	21,73
14	supernatant Vero, 7. dan nakon infekcije	23,52	16,47	16,20	23,52
15	supernatant MRC-5, 12. dan nakon infekcije	n.t.*	n.t.*	n.t.*	n.t.*
16	supernatant Vero, 12. dan nakon infekcije	n.t.*	n.t.*	n.t.*	n.t.*
17	supernatant MRC-5, 14. dan nakon infekcije	22,54	16,47	16,42	22,54
18	supernatant Vero, 14. dan nakon infekcije	27,76	16,47	18,43	25,80
19	supernatant MRC-5, 14. dan, kontrola stanica	39,91	16,47	16,28	39,91
20	supernatant Vero, 14. dan, kontrola stanica	40,96	16,30	17,25	40,01

* Uzorci 4. i 12. dana nakon infekcije nisu testirani. Služili su kao uzorci koji bi dali dodatnu informaciju o infektivnosti endogenih retrovirusnih čestica za slučaj da nema dovoljno informacija nakon testiranja uzoraka 1., 7. i 14. dana.

U Tablici 28. navedeni su rezultati aktivnosti RT u mediju za rast i održavanje stanica kao matriksu uzoraka supernatanata staničnih kultura. Neočekivano je u tim uzorcima otkrivena aktivnost RT koja je padala s padom volumnog udjela FBS-a pa tako medij s 10% FBS-a sadrži 27 435 molekula RT po rekaciji, s 5% FBS-a 15 651 molekula RT po reakciji, a medij s 2% FBS-a 430 molekula RT po reakciji. U Tablici 29. prikazani su rezultati za uzorke supernatanata kulture PF, kao izvora endogenih retrovirusnih čestica čija se infektivnost istraživala. Vidi se pad aktivnosti RT sa starenjem stanične kulture PF s oko 180×10^6 na oko 125×10^6 molekula RT po reakciji. U Tablicama 30. i 31. prikazani su rezultati za uzorke indikatorskih kultura stanica MRC-5 i Vero na kojima se istraživala infektivnost endogenih retrovirusnih čestica iz kulture PF. U tim kulturama se također vidi pad aktivnosti RT s oko

46×10^6 na 14×10^6 molekula RT po reakciji za stanice MRC-5 i pad s oko 56×10^6 na 2×10^6 molekula RT po reakciji za stanice Vero.

Tablica 28. Korigirana vrijednost Ct i broj molekula RT u mediju za rast i održavanje stanica.

Uzorak broj	Materijal uzorka	Rezultati	
		uzorak korigiran prema RT-standardu (Ct)	broj molekula RT po reakciji
uzorak 4	MEM-H(N)+2% FBS	36,62	430
uzorak 1	MEM-H(N)+5% FBS	34,51	15 651
uzorak 6	MEM-H(N)+10% FBS	33,53	27 435

Tablica 29. Korigirana vrijednost Ct i broj molekula RT u supernatantu kulture pilećih fibroblasta.

Uzorak broj	Materijal uzorka	Rezultati	
		uzorak korigiran prema RT-standardu (Ct)	broj molekula RT po reakciji
uzorak 2	supernatant PF, 24 sata	18,17	181 515 284
uzorak 3	supernatant PF, 72 sata	18,02	142 341 652
uzorak 5	supernatant PF, 14 dana	17,98[9]	125 410 927

Tablica 30. Korigirana vrijednost Ct i broj molekula RT u indikatorskoj staničnoj kulturi MRC-5.

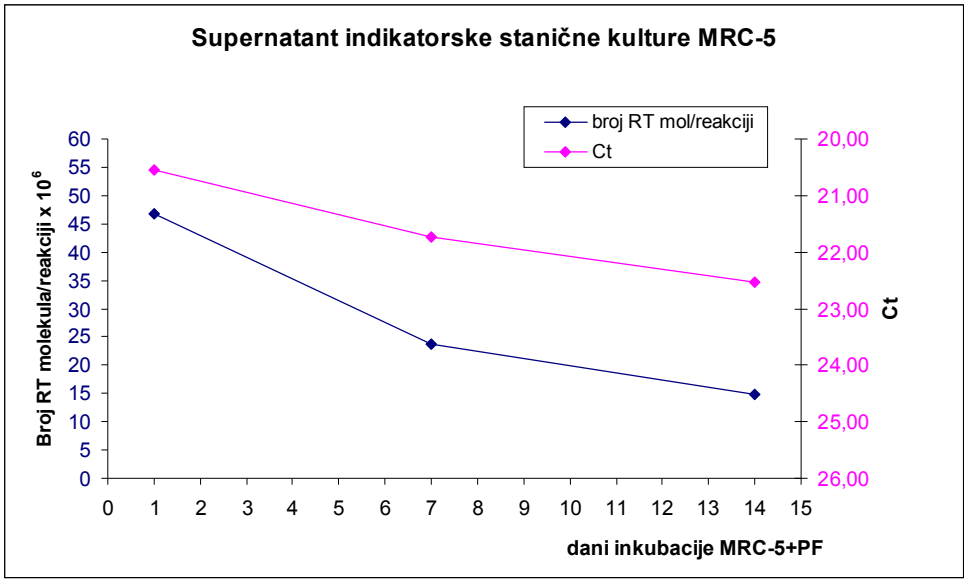
Uzorak broj	Materijal uzorka	Rezultati	
		uzorak korigiran prema RT-standardu (Ct)	broj molekula RT po reakciji
uzorak 7	supernatant MRC-5, 72 sata; prije infekcije	42,23	188
uzorak 9	supernatant MRC-5, 1. dan nakon infekcije	20,54	46 709 471
uzorak 13	supernatant MRC-5, 7. dan nakon infekcije	21,73	23 626 922
uzorak 17	supernatant MRC-5, 14. dan nakon infekcije	22,54	14 856 949
uzorak 19	supernatant MRC-5, 14. dan, kontrola stanica	39,91	710

Tablica 31. Korigirana vrijednost Ct i broj molekula RT u indikatorskoj staničnoj kulturi Vero.

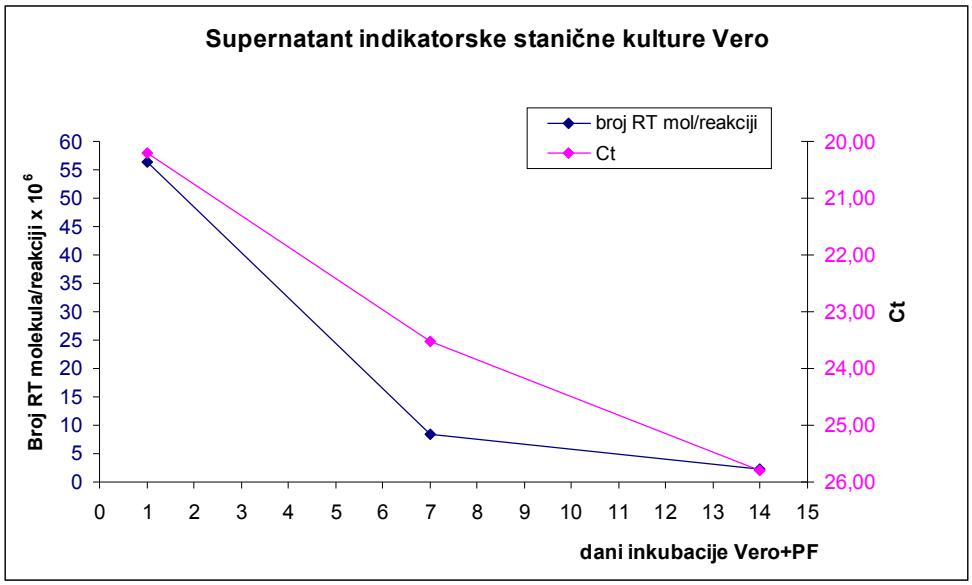
Uzorak broj	Materijal uzorka	Rezultati	
		uzorak korigiran prema RT-standardu (Ct)	broj molekula RT po reakciji
uzorak 8	supernatant Vero, 72 sata; prije infekcije	42,66	147
uzorak 10	supernatant Vero, 1. dan nakon infekcije	20,21	56 427 184
uzorak 14	supernatant Vero, 7. dan nakon infekcije	23,52	8 475 527
uzorak 18	supernatant Vero, 14. dan nakon infekcije	25,80	2 296 386
uzorak 20	supernatant Vero, 14. dan, kontrola stanica	40,01	91

[9] Rezultat izračunat preko srednje vrijednosti dobivenog broja RT molekula iz dva PERT-testa.

Kako vrijednost Ct, odnosno broj molekula RT pada tijekom kultivacije indikatorskih staničnih kultura kroz 14 dana, zaključila sam da endogene retrovirusne čestice porijeklom iz pilećih fibroblasta nisu infektivne (Slika 51. i Slika 52.).



Slika 51. Broj molekula RT i Ct u supernatantu indikatorske stanične kulture MRC-5 kroz inkubacijski period.



Slika 52. Broj molekula RT i Ct u supernatantu indikatorske stanične kulture Vero kroz inkubacijski period.

4.3.2. Istraživanje na životinjama

Istražila sam opću neškodljivost supernatanta kulture pilećih fibroblasta u miševima i zamorčadi.

Tablica 32. Opća neškodljivosti supernatanta kulture pilećih fibroblasta.

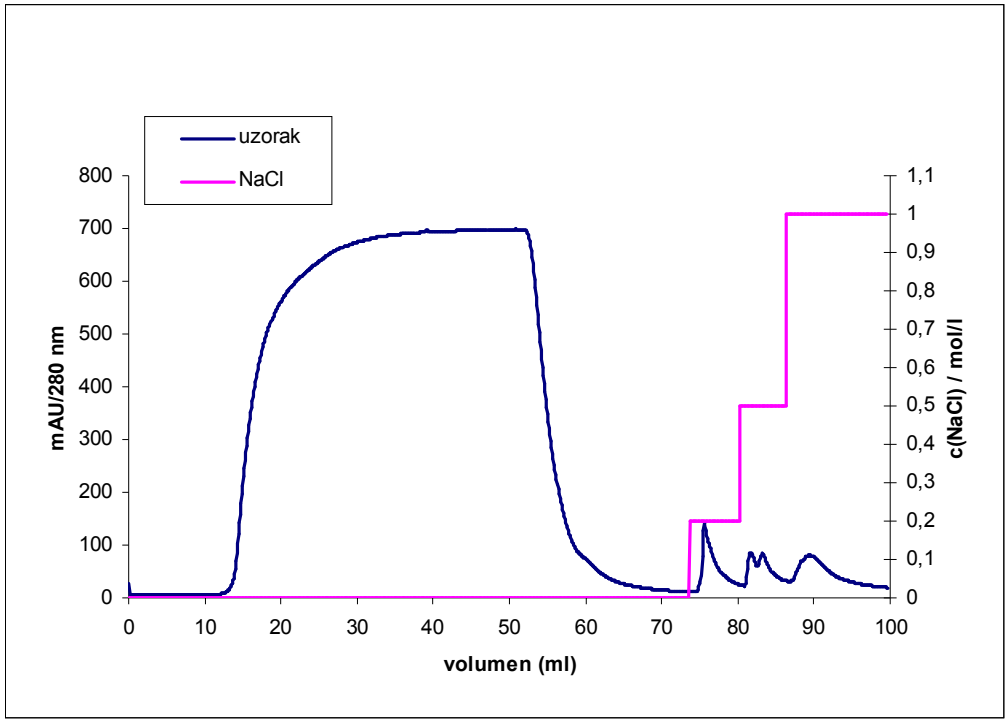
Oznaka miševa	Masa miševa (g)		Kontrola zdravstvenog stanja životinja 1. do 7. dan
	prije iniciranja	7. dan	
1.	18,3	20,8	bez obilježja
2.	19,2	20,2	bez obilježja
3.	19,8	21,0	bez obilježja
4.	18,6	20,2	bez obilježja
5.	18,4	19,5	bez obilježja
	Masa zamorčadi (g)		Kontrola zdravstvenog stanja životinja 1. do 7. dan
Oznaka zamorčića	prije iniciranja	7. dan	
1.	301	388	bez obilježja
2.	316	381	bez obilježja

Rezultati testa opće neškodljivosti na miševima i zamorčadi pokazuju da je zdravstveno stanje svih životinja kroz sedam dana nakon iniciranja supernatanta PF bez obilježja i da su sve životinje dobile na težini (Tablica 32.). Zaključujem da endogene retrovirusne čestice prisutne u supernatantu PF nisu infektivne i ne utječu nepovoljno na zdravlje miševa i zamorčadi.

4.4. Priprema uzoraka za PERT-test na monolitnim nosačima

4.4.1. Rezultati kromatografije

Ionskom kromatografijom na CIM-QA-disku (jaki anionski izmjenjivač) i CIM-SO_3-disku (jaki kationski izmjenjivač) koncentrirala sam endogene retrovirusne čestice i njihove RT prisutne u supernatantu primarne kulture pilećih fibroblasta i mediju MEM-H(N)+2% FBS. Čestice, odnosno RT molekule koje su se vezale na diskove eluirala sam u tri stupnja s NaCl-om (0,2 M, 0,5 M i 1 M).



Slika 53: Tipičan kromatogram, primjer uzorka 1cQA.

U Tablici 33. prikazani su rezultati od uzoraka supernatanata primarne kulture pilećih fibroblasta i medija nakon kromatografije na QA-disku. Ovisno o pokusu (1a, 1b i 1c), koncentrirane su molekule RT ili retrovirusne čestice. U Tablici 34. prikazani su rezultati od uzoraka supernatanata primarne kulture pilećih fibroblasta nakon kromatografije na SO_3-disku, također su koncentrirane molekule RT ili retrovirusne čestice.

Kako bi se uspješnost koncentriranja kromatografijom mogla usporediti s ultracentrifugiranjem, u Tablici 35. navela sam broj molekula RT preračunat na početni volumen uzorka od 5 ml, koliki je volumen uzorka pri ultracentrifugiranju. Razlučila sam broj molekula RT koje su vezane na disk i one koje su prošle kroz disk bez vezanja (FT).

Tablica 33. Vrijednosti Ct u uzorcima supernatanata primarne kulture pilećih fibroblasta i medija nakon kromatografije na QA-disku. Legenda: 1a – rezultati za slobodnu RT prisutnu u uzorku i koncentriranu na disku; 1b – rezultati za RT iz virusnih čestica koncentriranih na disku; 1c – rezultati za ukupnu RT koncentriranu na disku: slobodnu RT prisutnu u uzorku, plus RT oslobođenu iz endogenih retrovirusnih čestica prisutnih u uzorku; 0,2; 0,5: 1,0 – koncentracija NaCl-a u puferu za eluciju; FT – flowthrough; UF – uzorak koncentriran membranskom ultrafiltracijom (Vivaspin™ 500).

Uzorak	**Rezultati (Ct)**			
	uzorak	**RT-standard**	**uzorak+RT-standard**	**korigirano prema RT-standardu i/ili razrjeđenju**
1aQAFT	38,46	14,87	18,03	35,30
1aQAFT UF	29,46	14,87	15,57	28,76
1aQA0,2 nerazrijeđen	nedetektirano	14,87	23,60	/
1aQA0,2 1/100	34,76	14,87	14,93	28,59
1aQA0,2 1/1000	38,49	14,87	14,73	29,32
1aQA0,2 UF	31,55	14,87	18,15	28,27
1aQA0,5 1/100	33,34	14,87	14,77	27,23
1aQA0,5 1/1000	37,77	14,87	14,77	28,60
1aQA0,5 UF	32,12	14,87	17,51	29,49
1aQA1,0 1/100	33,24	14,87	14,96	27,04
1aQA1,0 1/1000	37,03	14,87	14,79	27,86
1aQA1,0 UF	27,99	14,87	17,14	25,72
1bQAFT 1/10	32,14	14,73	14,63	29,20
1bQA0,2 1/100	35,17	14,73	14,73	29,30
1bQA0,5 1/100	31,69	14,73	14,56	25,82
1bQA1,0 1/100	30,22	14,73	14,53	24,35
1cQAFT 1/10	27,27	14,73	14,69	24,33
1cQA0,2 1/100	28,42	14,73	14,75	22,53
1cQA0,5 1/100	29,54	14,73	14,69	23,67
1cQA1,0 1/100	33,14	14,73	14,59	27,27
MEM 1aQAFT 1/10	nedetektirano	16,27	15,64	nedetektirano
MEM 1aQA0,2 1/100	nedetektirano	16,27	16,02	nedetektirano
MEM 1aQA0,5 1/100	nedetektirano	16,27	16,11	nedetektirano
MEM 1aQA1,0 1/100	nedetektirano	16,27	15,53	nedetektirano
MEM 1bQAFT	nedetektirano	15,32	15,99	nedetektirano
MEM 1bQA0,2	nedetektirano	15,32	16,62	nedetektirano
MEM 1bQA0,5	nedetektirano	15,32	29,65	nedetektirano
MEM 1bQA1,0	nedetektirano	15,32	nedetektirano	nedetektirano

Tablica 34. Vrijednosti Ct u uzorcima supernatanata primarne kulture pilećih fibroblasta i medija nakon kromatografije na SO_3-disku. Legenda: 1a – rezultati za slobodnu RT prisutnu u uzorku i koncentriranu na disku; 1b – rezultati za RT iz virusnih čestica koncentriranih na disku; 1c – rezultati za ukupnu RT koncentriranu na disku: slobodnu RT prisutnu u uzorku, plus RT oslobođenu iz endogenih retrovirusnih čestica prisutnih u uzorku; 0,2; 0,5: 1,0 – koncentracija NaCl-a u puferu za eluciju; FT – flowthrough; UF – uzorak koncentriran membranskom ultrafiltracijom (Vivaspin™ 500).

Uzorak	**Rezultati (Ct)**			
	uzorak	**RT-standard**	**uzorak+RT-standard**	**korigirano prema RT-standardu i/ili razrjeđenju**
1aSO_3FT 1/10	nedetektirano	14,73	14,52	/
1a$SO_3$0,2 1/100	37,48	14,73	14,79	31,55
1a$SO_3$0,5 1/100	37,75	14,73	14,83	31,78
1a$SO_3$1,0 1/100	38,44	14,73	14,67	32,57
1bSO_3FT 1/10	41,42	16,27	14,99	37,82
1b$SO_3$0,2 1/100	36,69	16,27	15,88	29,48
1b$SO_3$0,5 1/100	35,58	16,27	15,59	28,37
1b$SO_3$1,0 1/100	41,21	16,27	15,09	34,00
1cSO_3FT 1/10	29,32	16,27	15,36	25,72
1c$SO_3$0,2 1/100	39,28	16,27	15,56	32,07
1c$SO_3$0,5 1/100	37,57	16,27	15,40	30,36
1c$SO_3$1,0 1/100	38,70	16,27	15,32	31,49

Najbolji je uzorak eluata za PERT-test bio onaj razrijeđen 1/100 jer više nije inhibirao PERT-test, za razliku od nerazrijeđenog uzorka u kojem se zbog inhibicije nije mogao očitati rezultat. Uzorak 1/1000 također nije inhibirao PERT-test, no budući da je uzorak 1/100 već pokazao dobre rezultate nije bilo potrebe za dodatnim razrjeđivanjem. Koncentrirani uzorak je, kao i nerazrijeđeni uzorak inhibirao PERT-test, ali u manjoj mjeri. Budući da koncentriranje (odsoljavanje) uzorka membranskom filtracijom nije dalo željene rezultate, nisam ga dalje koristila. Zaključila sam također da uzorak FT treba razrijediti 1/10 kako bi se uklonila inhibicija.

Tablica 35. Korigirane vrijednosti Ct i broj molekula RT koncentriranih kromatografijom.

Uzorak PF	Ct (korig.)	Broj mol. RT	Ukupan broj mol. RT eluiranih s diska od 10 ml uzorka (disk)	Ukupan broj mol. RT od 10 ml uzorka (disk+FT)	Broj mol.RT koji odgovara 5 ml početnog uzorka a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT
1aQAFT	35,30	170 319	19 139 202	19 309 521	a) 9 569 601 b) 9 654 761
1aQA0,2	28,96	3 033 623			
1aQA0,5	27,92	6 641 647			
1aQA1,0	27,45	9 463 932			
1bQAFT	29,20	20 830 118	188 190 994	209 021 112	a) 94 095 497 b) 104 510 556
1bQA0,2	29,30	2 903 167			
1bQA0,5	25,82	44 466 923			
1bQA1,0	24,35	140 820 903			
1cQAFT	24,33	948 946 226	420 545 806	1 369 492 032	a) 210 272 903 b) 684 746 016
1cQA0,2	22,53	293 403 172			
1cQA0,5	23,67	120 011 012			
1cQA1,0	27,27	7 131 622			
1aSO_3FT	/	/	567 984	567 984	a) 283 992 b) 283 992
1a$SO_3$0,2	31,55	248 640			
1a$SO_3$0,5	31,78	207 607			
1a$SO_3$1,0	32,57	111 737			
1bSO_3FT	37,82	1 642 830	156 434 419	158 077 249	a) 78 217 209 b) 79 038 625
1b$SO_3$0,2	29,48	50 651 017			
1b$SO_3$0,5	28,37	102 965 190			
1b$SO_3$1,0	34,00	2 818 211			
1cSO_3FT	25,72	3 751 326 522	26 277 666	3 777 604 188	a) 13 138 833 b) 1 888 802 094
1c$SO_3$0,2	32,07	4 837 856			
1c$SO_3$0,5	30,36	14 431 017			
1c$SO_3$1,0	31,49	7 008 794			

4.4.2. Usporedba učinkovitosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica

U Tablici 36. prikazani su rezultati za uzorak neobrađenog supernatanta pilećih fibroblasta ($PF_{n.s.}$) koji sam testirala u PERT-testu. Isti uzorak testirala sam razrijeđen 1:1 i 1:10 (v/v) s puferom za lizu (PZL). Svrha testiranja bila je odrediti ukupnu količinu molekula RT /virusnih čestica koje se nalaze u uzorku $PF_{n.s.}$ koji se ultracentrifugira ili koncentrira kromatografijom. Uz navedeni uzorak, testirala sam i neobrađeni supernatant MRC-5 stanica ($MRC\text{-}5_{n.s.}$), nerazrijeđen i razrijeđen 1:1 (v/v) s PZL.

Tablica 36. Rezultati PERT-testa za neobrađeni uzorak supernatanta PF i MRC-5.

Uzorak	Rezultati (Ct)			
	uzorak	**RT-standard**	**uzorak+RT-standard**	**korigirano prema RT-standardu i/ili razrjeđenju**
$PF_{n.s.}$	38,61	16,30	27,16	27,75
$PF_{n.s.}$:PZL=1:1	24,87	16,30	20,64	19,47
$PF_{n.s.}$:PZL=1:10	22,83	16,30	15,82	19,30
MRC-$5_{n.s.}$	nedetektirano	15,32	14,82	/
MRC-$5_{n.s.}$:PZL=1:1	nedetektirano	15,32	19,14	/

U Tablici 37. prikazana je usporedba učinkovitosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica kromatografijom i ultracentrifugiranjem u odnosu na broj molekula RT/virusnih čestica prisutan u neobrađenom uzorku supernatanta kulture PF ($PF_{n.s.}$).

Tablica 37. Usporedba učinkovitosti koncentriranja molekula RT/virusnih čestica.

Uzorak		**Rezultat (Ct korigirani)**	**Broj mol. RT koji odgovara 5 ml početnog uzorka**
$PF_{n.s.}$ (neobrađeni supernatant)		27,75	134 205 871
$PF_{n.s.}$:PZL=1:1		19,47	29 714 547 536
PF $PF_{n.s.}$PZL=1:10		19,30	33 170 345 720
PF UC*		17,98	1 128 698 346
PF supernatant nakon UC		27,53	88 898 688
PF supernatant nakon UC:PZL=1:1		26,39	191 427 651
1aQA	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 9 569 601 b) 9 654 761
1bQA	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 94 095 497 b) 104 510 556
1cQA	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 210 272 903 b) 684 746 016
1aSO_3	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 283 992 b) 283 992
1bSO_3	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 78 217 209 b) 79 038 625
1cSO_3	a) eluirano s diska b) eluirano s diska+FT	nije primjenjivo	a) 13 138 833 b) 1 888 802 094

*UC = ultracentrifugiranje; rezultat od uzorka 5 iz 4.3.1.

U kromatografskim uzorcima 1a očekuje se prisutnost koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka. U uzorcima 1b očekuje se prisutnost koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka i još molekula RT iz koncentriranih retrovirusnih čestica. U uzorcima 1c očekuje se prisutnost koncentriranih slobodnih molekula RT iz početnog uzorka i još koncentriranih molekula RT oslobođenih iz retrovirusnih čestica.

Budući da su rezultati za uzorke 1b i 1c veći nego rezultati za uzorke 1a (npr. 1cQA oko 684×10^6 molekula RT, a 1aQA oko 9×10^6 molekula RT), zaključujem da se više molekula RT nalazi unutar virusnih čestica nego slobodnih u supernatantu, što je očekivano. To se također vidi iz rezultata za $PF_{n.s.}$, budući da dodatkom pufera za lizu, koji omogućuje oslobađanje molekula RT iz virusnih čestica, za oko 200 puta raste broj očitanih molekula RT. Ovaj rezultat za $PF_{n.s.}$ ukazuje na to da očitana aktivnost RT nije nespecifična (zbog eventualne prisutnosti drugih molekula u neobrađenom supernatantu koje bi imale aktivnost sličnu RT), već je vezana uz aktivnost koja proizlazi iz čestice.

U početnom uzorku $PF_{n.s.}$ ima više virusnih čestica nego ih se može očitati nakon obrade bilo ultracentrifugiranjem ili kromatografijom na disku.

Nakon ultracentrifugiranja, u supernatantu ostaje još dio retrovirusnih čestica koji se nije istaložio. Udio neistaloženih retrovirusnih čestica iznosi oko 10%.

Veći broj molekula RT se očita u uzorku pripremljenom ultracentrifugiranjem nego što ih se može očitati nakon elucije s diska. Ako usporedim broj molekula RT dobiven ultracentrifugiranjem 5 ml supernatanta PF (1 128 698 346) i broj molekula RT koji se dobije od 5 ml uzorka u opcijama 1bQA ili $1bSO_3$ (sva tri stupnja elucije zajedno), zaključujem da se ultracentrifugiranjem može koncentrirati 12-15 puta više retrovirusnih čestica. Povećanjem ionske jakosti su se u opciji 1bQA s diska bolje eluirale virusne čestice (preračunato na molekule RT s 0,2 M NaCl eluira se oko 3×10^6 molekula RT, a s 1,0 M NaCl oko 140×10^6 molekula RT) te pretpostavljam da je na disku ostalo vezanih čestica koje bi se možda eluirale da se još povećala ionska jakost.

Ako usporedim broj molekula RT dobiven ultracentrifugiranjem 5 ml supernatanta PF (oko $1,1\times10^9$) i broj molekula RT koji se dobije od 5 ml uzorka u opciji 1cQA (oko $0,7\times10^9$), zaključujem da se ultracentrifugiranjem može u konačnici očitati veći broj molekula RT. U opciji 1cQA otprilike dva puta više molekula RT prođe kroz kolonu bez vezanja nego ih se eluira s kolone. Ova pojava je posebno naglašena u opciji $1cSO_3$, u kojoj čak oko 150 puta više molekula RT prođe kroz kolonu bez vezanja nego ih se eluira s kolone.

U ovim uvjetima kromatografije, QA-disk bolje koncentrira molekule RT nego virusne čestice, odnosno molekule RT bolje se eluiraju s diska nego virusne čestice.

Za koncentriranje molekula RT QA-disk je bolji od SO_3-diska. Virusne čestice se podjednako dobro eluiraju s oba diska.

5. DISKUSIJA

PERT-test je farmakopejski test, propisan za otkrivanje retrovirusa kao neželjenih stranih agenasa u uzorcima staničnih kultura koje služe kao supstrat u proizvodnji lijekova za ljudsku upotrebu (Ph. Eur., 01/2011:50203). Glavni problem PERT-testa je što ne postoji internacionalni standard prema kojem bi rezultati PERT-testa, čiji je postupak izvođenja prepušten samim izvođačima, bili u svijetu međusobno usporedivi, a i koji bi omogućio da se pojedini izvedeni PERT-test označi kao valjan ili nevaljan. Bez ovih osnovnih preduvjeta koji omogućuju standardizaciju PERT-testa, teško je govoriti o stvarnoj sigurnosti staničnih kultura po pitanju odsustva neželjenih retrovirusa. Iz tih sam razloga testirala tri komercijalno dostupne reverzne transkriptaze (RT) porijeklom iz različitih retrovirusa (AMV-RT, HIV-RT i MLV-RT) kako bih definirala ključne karakteristike testa i odredila standard za daljnja istraživanja uzoraka staničnih kultura i ostalog biološkog materijala.

Uspostavila sam PERT-test primjenjujući lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time* PCR). Tijekom istraživanja validacijskih parametara test se pokazao kao precizan, linearan u testiranom rasponu, otporan i osjetljiv. Rezultate aktivnosti RT koje sam dobila pri uvođenju metode (4.1.1.1.-4.1.1.3.) odgovaraju rezultatima iz literature (Ma i sur., 2009). Odabrala sam AMV-RT kao standard jer se pokazala vrlo dobra, lako je dostupna i nema razlike u aktivnosti AMV-RT nabavljenoj od dva različita proizvođača.

Europska farmakopeja (Ph. Eur.) propisuje testiranje matičnih banki proizvodnih diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura na prisutnost, među ostalim, retrovirusa koristeći upravo PERT-test, uz transmisijsku elektronsku mikroskopiju (TEM). Za razliku od toga, Ph. Eur. ne propisuje provođenje PERT-testa na primarnoj kulturi pilećih fibroblasta koja se koristi za proizvodnja virusnih cjepiva, a za koju je poznato već oko 15 godina da sadrži endogene retrovirusne čestice ptičje leukoze (ALV) i endogene retrovirusne čestice (EAV), te da daje pozitivan rezultat u PERT-testu (Böni i sur., 1996; Weissmahr i sur., 1997; Robertson i sur., 1997; Maudru i sur., 1998; Khan i sur., 1998; Tsang i sur., 1999; André i sur., 2000; Johnson i sur., 2001 i 2003; Shahabuddin i sur., 2001; Hussain i sur., 2001 i 2003; Victoria i sur., 2010).

Ne samo da nema zahtjeva za primarne stanične kulture, već je i zahtjev za diploidne i kontinuirane stanične kulture nejasan. Prema Ph. Eur., u slučaju pozitivnog nalaza PERT- ili TEM-testa potrebno je istražiti infektivnost na ljudskim stanicama. Za PERT-test još navodi kako je vrlo osjetljiv, ali da pozitivan nalaz može biti dvosmislen (eng. *equivocal*) te da se

odluka o prihvatljivosti matične banke proizvodne stanične kulture mora donijeti na temelju svih raspoloživih podataka.

Uz ove nejasne zahtjeve, te uz činjenicu da ne postoji standard za PERT-test, ostavlja se prostor za subjektivne interpretacije rezultata, čime se dovodi u pitanje smisao provođenja PERT-testa.

S druge strane, smjernice za procjenu virusne neškodljivosti biotehnoloških proizvoda dobivenih iz staničnih kultura ljudskog ili životinjskog porijekla (ICH Q5A(R1), 1997 i FDA Q5A, 1998), koje ne obuhvaćaju biološke proizvode kao što su inaktivirana ili živa atenuirana cjepiva, daju vrlo striktne naputke o detekciji i eliminaciji detektiranih stranih virusa. Poznate retrovirusne kontaminante, kao što su retrovirus-slične endogene čestice u staničnoj kulturi CHO koja se koristi za proizvodnju lijekova, vrlo su opširno istražene i pokazano je da stvaraju neinfektivne čestice (de Wit i sur., 2000; Brorson i sur., 2002). Čak i takve dobro karakterizirane retrovirusne čestice moraju se eliminirati iz proizvoda i njihova eliminacija se mora moći dokazati.

Ph. Eur. propisuje da se pileći fibroblasti moraju pripremiti od jaja dobivenih iz SPF-jata kokoši, koje su testirane na prisutnost čitavog niza neželjenih patogena, uključujući i razne egzogene retroviruse. Pretpostavljam da se zbog toga smatra da su jaja dobivena iz SPF-jata dovoljno siguran supstrat za proizvodnju lijekova i da se poslije, tijekom upotrebe, ne moraju više testirati.

Za razliku od retrovirusnih čestica u kulturi CHO, o retrovirusnim česticama porijeklom iz pilećih stanica ima vrlo malo objavljenih podataka. Stoga sam odlučila istražiti pojavnost retrovirusne aktivnosti prvenstveno u embrioniranim pilećim jajima i primarnim kulturama pilećih fibroblasta, ali i u raznim drugim staničnim supstratima. Istražila sam po prvi puta pojavnost retrovirusne aktivnosti tijekom proizvodnje živog virusnog cjepiva na primarnoj kulturi pilećih fibroblasta. Također, istražila sam inhibiciju PERT-testa uzorcima staničnih kultura, što je vrlo slabo opisano u literaturi. Postavljajući metodu, otkrila sam manjkavosti pripreme uzoraka za PERT-test te sam pokušala unaprijediti pripremu uzoraka na nov i originalan način.

Kako bih kvalitetno interpretirala rezultate uzoraka staničnih kultura, napravila sam prvo procjenu matriksa tih uzoraka. Uzorak za testiranje u PERT-testu bio je potrošeni medij

(supernatant) sa staničnih kultura, s dodatkom FBS-a ili bez njega. Podatke o testiranju matriksa uzoraka staničnih kultura PERT-testom nisam pronašla u literaturi.

U čistom mediju bez FBS-a nisam uočila aktivnost RT. Istraživanjem medija s različitim volumnim udjelom FBS-a uočila sam prvenstveno da ovi mediji inhibiraju PERT-test, posebno medij s 10% FBS-a. Navedeno je u skladu s literaturnim podatkom koji navodi kako u serumu postoje inhibitori RT-PCR-a, što je posebno značajno za uzorke s niskom koncentracijom RNA (Konet i sur., 2000). U jedinom pokusu na medijima s FBS-om u kojem nije bilo inhibicije PERT-testa, neočekivano sam detektirala nisku aktivnost RT koja je padala s padom udjela FBS-a u mediju (Tablica 13.). Moguće je da i u drugim serijama medija postoji aktivnost RT, no ona se zbog inhibicije nije mogla očitati. Upravo zbog izostanka inhibicije, smatram da se ovdje ne radi o kontaminaciji medija. Testirala sam i čisti FBS, iste serije kao i FBS u pozitivnom mediju, samo iz različite pošiljke, očekujući visoku razinu aktivnosti RT. No, čisti FBS se pokazao negativan u PERT-testu (Tablica 13.).

Prema ovom nalazu čini se da aktivnost RT ne potječe niti od FBS-a (osim ako se pošiljke razlikuju) niti od sastojaka medija budući da (1) medij bez FBS-a ne pokazuje aktivnost RT, niti inhibira PERT-test i (2) medij za razrjeđivanje i medij s FBS-om su istog sastava: jedina razlika između inhibitornih i neinhibitornih uzoraka medija je postotak FBS-a.

Svježi medij s FBS-om nije pravi matriks uzoraka staničnih kultura i ne može služiti kao negativna kontrola u PERT-testu, budući da stanice tijekom proliferacije koriste sastojke medija za svoj rast i razvoj i time mu mijenjaju sastav. Osim u sastavu nutrijenata i ostalih supstanci u mediju, svježi medij i potrošeni medij sa staničnih kultura razlikuju se i u aktivnosti RT. Pokazala sam da je niža aktivnost RT u potrošenom mediju nego u svježem mediju iste serije (Tablica 27.). Tijekom kultivacije stanične kulture retrovirusne čestice su se vjerojatno inaktivirale ili raspale.

Budući da je FBS važna komponenta u proizvodnji i kontroli kvalitete bioloških proizvoda, smatram ovaj pozitivan nalaz u PERT-testu vrlo značajnim. Fetalni goveđi serum dobiva se iz krvi fetusa goveda. Ako se može povući analogija s ljudskim fetusom, odnosno ljudskom posteljicom u kojoj je aktivnost endogenih retrovirusa iznimno velika i ima značajnu ulogu (Mi i sur., 2000; Blond i sur., 2000; Griffiths, 2001; Blaise i sur., 2003; Frendo i sur., 2003; Dunn i sur., 2003; de Parseval i sur., 2005), nije nemoguće očekivati prisutnost endogenih retrovirusa i u goveđoj posteljici, no o tomu zasad nema objavljenih podataka. Svakako je u budućnosti potrebno testirati veći broj uzoraka FBS-a različitih serija i iz različitih pošiljki.

Otkrivanje aktivnosti RT u mediju s FBS-om postavilo je važno pitanje – što ako izvor retrovirusnih čestica uopće nije pileći supstrat, već one potječu iz medija i sposobne su umnažati se na PF? Iz tog razloga bilo je nužno istražiti aktivnost RT u embrioniranim jajima i pokazati da ona tamo postoji. Istražila sam alantoisnu tekućinu i albumen embrioniranih SPF-jaja, potvrdila aktivnost RT i time pokazala da je pileći embrij uistinu izvor retrovirusnih čestica (Tablica 18.) (Robertson i sur., 1997; Maudru i sur., 1998). Broj detektiranih endogenih retrovirusnih čestica bio je 300 000× veći u alantoisnoj tekućini, što je i očekivano s obzirom na njegovu funkciju u jajetu. Alantoisna šupljina služi za izmjenu plinova preko ljuske i u njoj se skupljaju otpadne tekućine embrija, a albumen služi prvenstveno za zaštitu embrija i kao dodatni izvor hranjivih tvari.

Nakon testiranja matriksa i dokaza porijekla aktivnosti RT, pristupila sam istraživanju staničnih kultura. U svim primarnim staničnim kulturama pilećih fibroblasta (PF), bilo iz komercijalnih jaja ili iz SPF-jaja, pokazala sam aktivnost RT (Tablica 17., Slike 22. i 23.). Navedeni rezultati u skladu su s literaturnim podacima koji navode da primarna kultura pilećih fibroblasta sadrži neinfektivne endogene retrovirusne čestice koje su izvor aktivnosti RT (Böni i sur., 1996; Weissmahr i sur., 1997; Robertson i sur., 1997; Maudru i sur., 1998; Khan i sur., 1998; Tsang i sur., 1999; André i sur., 2000; Johnson i sur., 2001 i 2003; Shahabuddin i sur., 2001; Hussain i sur., 2001 i 2003; Victoria i sur., 2010). Razina aktivnosti RT porijeklom od endogenih retrovirusnih čestica u testiranim uzorcima odgovara koncentraciji AMV-RT-standarda u rasponu od 10^8 do 10^{10} pJ po reakciji, što odgovara količini od oko 10^6 do 10^8 molekula RT po reakciji, odnosno broju virusnih čestica ptičje mijeloblastoze od oko 10^4 do 10^6 (Ma i sur., 2009).

Zbog načina uzgoja, očekivala sam višu aktivnosti RT u kulturi dobivenoj od komercijalnih jaja nego od SPF-jaja, te sam pri uspostavi metode prvo istražila supernatante primarne kulture PF dobivene iz oplođenih komercijalnih jaja (Slika 23.). Pratila sam staničnu kulturu kroz 16 dana i pokazala kako je aktivnost RT u njoj konstantna od 4. do 11. dana, a 24 sata nakon uspostave kulture i 16. dan je niža. Stanice nakon 24 sata još nisu formirale konfluentan stanični sloj, odnosno manji ih je broj te je zbog toga vjerojatno i očitana manja razina aktivnosti RT. Vijabilnost stanične kulture 16. dan je smanjena te pretpostavljam da je zbog propadanja kulture očitana manja razina aktivnosti RT. Uočila sam inhibiciju PERT-testa kroz sve dane kultivacije. Inhibicija je uvijek bila na istoj razini, bez obzira na starost kulture. Tijekom kultivacije stanica mijenjao se (povećavao) kroz prve dane broj stanica, a

također se mijenjao volumni postotak FBS-a u mediju za rast stanica (5% kroz prva 24 sata, nakon toga 2,5%), stoga je teško povezati konstantnu razinu inhibicije s nekim od ova dva faktora.

Kako bih istražila razlike u inhibiciji PERT-testa u odnosu na sadržaj FBS-a u mediju, u jednoj boci sa stanicama sam 13. dan izbacila medij s 2,5% FBS-a i dodala medij bez FBS-a i inkubirala do 16. dana. U paraleli sam testirala uzorak supernatanta 16. dan bez promjene medija. U oba slučaja PERT-test je bio inhibiran, s time da je inhibicija bila izraženija u kulturi s FBS-om (Tablica 14.). Uklanjanje FBS-a nije dovelo po potpune eliminacije inhibicije, što ukazuje na to da FBS nije jedini faktor koji inhibira PERT-test.

Zanimljivost koju sam pritom otkrila bila je da je aktivnost RT bila samo neznatno viša u kulturi s FBS-om. Trinaesti dan sam iz gore navedene boce sa stanicama izbacila medij s FBS-om, a s njime i sve retrovirusne čestice izlučene od uspostave kulture do tada. Očekivala sam nisku aktivnosti RT 16. dan, no dodavanje svježeg medija i kultivacija kroz sljedeća tri dana očito je omogućila ponovno stvaranje i otpuštanje retrovirusnih čestica iz stanica, i to do otprilike iste razine koja je očitana tijekom kultivacije bez promjene medija.

Nakon što sam uspostavila metodu na komercijalnim jajima, istražila sam supernatant ukupno sedam serija kulture PF porijeklom iz SPF-jaja, kroz prvih 96 sati i/ili nakon 14 dana (Slika 22.). Za razliku od kulture PF porijeklom iz komercijalnih jaja koju sam pripremila isključivo za potrebe ove doktorske disertacije, uzorke kultura porijeklom iz SPF-jaja dobivala sam iz drugih laboratorija pa sam ih testirala samo u pojedinom trenutku nakon uspostave, a ne kroz čitav period kultivacije.

U uzorcima supernatanta kultura SPF-jaja postoji faktor koji inhibira PERT-test. Pokazala sam da je inhibicija neovisna o starosti kulture, pa tako neke kulture stare 24 sata jače inhibiraju PERT-test u odnosu na kasnije, dok je kod drugih to obratno. Navedene kulture pripremljene su u istom laboratoriju i prema istom protokolu u kratkom vremenskom razdoblju, no od različitih pošiljki jaja i s različitim serijama podloge za rast stanica. Inhibicija je pak konstantna ili je čak uopće nema u drugim kulturama, pripremljenima u drugom laboratoriju. Zaključujem da razlika među staničnim kulturama vjerojatno potječe od početnog biološkog uzorka, odnosno pilećeg embrija, te od osobitosti pripreme primarne kulture stanica kao takve.

Bez obzira na uočenu veliku raspršenost rezultata aktivnosti RT, u svim testiranim staničnim kulturama, bilo porijeklom iz SPF ili komercijalnih jaja, aktivnost RT nakon kultivacije 14, odnosno 16 dana jednaka je ili manja od aktivnosti RT neposredno nakon uspostave kulture. To potvrđuje tezu da aktivnost RT potječe od neinfektivnih endogenih retrovirusnih čestica koje se luče iz stanica tijekom kultivacije, no nisu se sposobne umnažati.

Istražila sam također supernatante diploidne stanične kulture MRC-5, te kontinuiranih staničnih kultura A549, SH-SY5Y, Vero i Vero WHO (Tablica 19.). U literaturi sam pronašla samo jedan podatak o aktivnosti RT na stanicama koje nisu pilećeg porijekla, u cjepivu protiv bjesnoće s Vero stanica, u kojem su autori pokazali kako se radi o originalnoj aktivnosti RT potekloj od retrovirusnih čestica, a čije porijeklo nisu mogli objasniti (André i sur. 2000). S obzirom na dostupne literaturne podatke, nisam očekivala aktivnost RT u svim uzorcima staničnih kultura, no upravo je to bio rezultat koji sam dobila. Iznimka je bio jedino supernatant Vero WHO stanica, no on je jedini inhibirao PERT-test, što ne znači da taj supernatant nije pozitivan, već se aktivnost RT zbog inhibicije ne može očitati.
Ostali supernatanti nisu inhibirali PERT-test. Sve stanične kulture inkubirane su u mediju s 10% FBS-a, što dodatno pokazuje kako inhibicija u staničnim kulturama ne potječe jedino od FBS-a, bez obzira na to što čisti medij s 10% FBS-a jako inhibira PERT-test.

Očitana aktivnost RT u ovim diploidnim i kontinuiranim staničnim kulturama vrlo je niska i dobivene vrijednosti Ct nalaze se na samom rubu detekcije metode. Kako je u jednoj seriji medija s 10% FBS-a uočena aktivnost RT, ostaje otvorena mogućnost da se ovdje uočena aktivnost u staničnim kulturama zadržala upravo od medija za rast i održavanje stanica. Nije vjerojatno da bi uočena aktivnost bila nespecifična i potjecala od na primjer RNA-ovisnih staničnih DNA polimeraza jer su labilne (Böni i sur., 1996) i nije vjerojatno da bi bile jednako prisutne u svim istraženim staničnim kulturama porijeklom iz čovjeka i iz majmuna. Također nije riječ o lažno pozitivnom rezultatu poteklom od upotrijebljenih reagencija (na primjer od inhibitora RNaze koji ima RT-sličnu aktivnost, (Pyra i sur., 1994) jer su negativne kontrole u testu bile negativne.

Nigdje u literaturi nije opisano kakva je dinamika lučenja endogenih retrovirusnih čestica u kulturi PF tijekom proizvodnje nekog virusnog cjepiva i koliko ovisi o operativnim faktorima poput uvjeta pripreme PF (faktor X1), načinu infekcije PF (faktor X2) ili vremenu ubiranja virusnih žetvi (faktor X3). Dinamiku lučenja endogenih retrovirusnih čestica u odnosu na

navedene faktore istražila sam u studiji u kojoj se testirao utjecaj istih faktora na replikaciju virusa mumpsa, soj L-Zagreb. Inače se za stabilizaciju virusa mumpsa koristi stabilizator koji sadrži želatinu i sorbitol, no budući da sam pokazala kako stabilizator inhibira PERT-test (Tablica 20.), uzorke sam pohranjivala bez stabilizatora.

Istraživanje navedenih operativnih faktora provela sam po modelu dizajna eksperimenata (DoE), u kojem se sustavno testira efekt više parametara (faktora) na istraživani postupak (Kutle i sur., 2010; Markusic i sur., 2012). DoE se pokazao kao odličan model jer se u malom broju pokusa dalo jasno razlučiti koji faktor utječe na lučenje retrovirusa, a koji ne. Istraživanje sam provela kroz osam pokusa, a u svakom pokusu skupila sam šest uzoraka žetvi označenih kao Ž0 do Ž5. Žetvu Ž0 skupila sam tri dana nakon infekcije virusom mumpsa (Ž0 sadrži FBS iz medija), a ostale žetve skupljala sam kroz sljedećih pet, odnosno deset dana, ovisno o razmaku među žetvama. Rezultati pokazuju da je u svim uvjetima studije aktivnost RT najviša u žetvi nula (Ž0) te da pada u svakoj sljedećoj žetvi i najniža je u žetvi pet (Ž5) (Slika 24.). Navedeni pad je očekivan, budući da endogene retrovirusne čestice od kojih potječe aktivnost RT nisu infektivne. Najveći broj endogenih retrovirusnih čestica izlučio se iz stanica na početku infekcije virusom mumpsa i to u Ž0. Vrijeme inkubacije prije žetve Ž0 je bilo najduže (72 h) te je navedeni rezultat u skladu s očekivanjem.

Kako bih vidjela koji operativni faktor ima kakav utjecaj na proizvodnju endogenih retrovirusa, izračunala sam prinos endogenih retrovirusa po stanici u svakoj žetvi. Žetvu Ž0 sam posebno obradila jer se u toj žetvi još uvijek nalazi FBS i jer se ta žetva inače odbacuje u proizvodnji virusnih cjepiva. Budući da se vrijeme među žetvama (X3) ne odnosi na Ž0, pratila sam samo utjecaj metode pripreme stanične kulture (X1) i utjecaj metode infekcije (X2). Rezultati pokazuju da faktor X2 nema utjecaja na prinos endogenih retrovirusa u Ž0 (Tablica 25.). Niti faktor X1 nije se pokazao statistički značajan, no dobiveni rezultati su na samom rubu značajnosti (nije značajno ako je $p<0,05$, a dobiven rezultat je $p=0,0501$). Očito je da uvjeti pripreme homogenije primarne stanične kulture doprinose povećanju broja endogenih retrovirusnih čestica. Smatram da se, unatoč statističkoj neznačajnosti, svakako treba obratiti pažnju na rezultat za X1 jer očito ima utjecaja na prinos endogenih retrovirusa koji je oko pet puta veći od utjecaja metode infekcije (X2).

U kasnijim žetvama, od Ž2 ili Ž3 do Ž5, statistički značajan utjecaj na stvaranje endogenih retrovirusnih čestica ima metoda infekcije (X2) (Tablica 26.). Infekcija virusa u staničnu

suspenziju doprinosi porastu broja endogenih retrovirusnih čestica u zadnjim žetvama. Metoda pripreme stanične kulture (X1) i vrijeme među žetvama (X3) nemaju utjecaj na lučenje endogenih retrovirusnih čestica, s time da najmanji utjecaj ima faktor X1.
Zanimljivo je da uvjeti koji odgovaraju replikaciji virusa mumpsa (priprema homogenije stanične kulture i infekcija u suspenziju), odgovaraju i replikaciji endogenih retrovirusa (Slike 43.-50.). Infekcija virusa mumpsa u suspenziju homogenije stanične kulture povećava produktivnost za 50-70 puta (Markusic i sur., 2012). Dok s jedne strane dobivamo visok prinos virusa mumpsa, s druge strane dobivamo visok prinos neželjenih stranih retrovirusnih agenasa.

Usporedbom broja endogenih retrovirusnih čestica detektiranih u neinficiranoj staničnoj kulturi primarnih fibroblasta porijeklom iz SPF-jaja i u staničnoj kulturi inficiranoj virusom mumpsa, utvrdila sam da nema velike razlike u jačini lučenja, premda oba virusa pupaju sa stanične membrane i u tom smislu su konkurencija. Zaključujem da stanice pilećih fibroblasta imaju određeni kapacitet stvaranja endogenih retrovirusnih čestica koji pada sa starenjem stanične kulture i neovisan je o prisutnosti drugog virusa u kulturi.

Ima li dakle smisla raditi na povećanju prinosa željenih cjepnih virusa kad to za sobom povlači i opasnost po neškodljivost staničnih supstrata? Smatram da svakako ima. Istražila sam infektivnost retrovirusnih čestica iz staničnih kultura na indikatorskim stanicama MRC-5 i Vero i pokazala da te čestice nisu infektivne (Tablice 27.-31. i Slike 51. i 52.), što je i u skladu s rezultatima iz literature (Robertson i sur., 1997; Khan i sur., 1998). Također, istražila sam infektivnost endogenih retrovirusnih čestica u farmakopejskom testu opće neškodljivosti na miševima i zamorčadi (Tablica 32.), o čemu nisam našla podatke u literaturi. Zdravstveno stanje životinja tijekom sedam dana od intraperitonealnog iniciranja supernatanta kulture pilećih fibroblasta bilo je u redu i sve su životinje dobile na težini. Prema tome zaključujem da endogene retrovirusne čestice nisu infektivne i ne utječu nepovoljno na zdravlje miševa i zamorčadi.

U svim vrstama uzoraka prisutna je inhibicija PERT-testa i potrebno ju je komentirati. Inhibiciju je teško povezati bilo s izvorom uzorka (stanična kultura ili embrionirano jaje) ili razinom aktivnosti RT, ili pak sastavom medija. Neke stanične kulture s visokom razinom aktivnosti RT jako inhibiraju PERT-test, neke samo malo, a neke uopće ne. Enzim RT, osim

što vrši reverznu transkripciju i ima RNaznu aktivnost (RNaza H), ima još neka svojstva koja mogu objasniti povezanost visoke razine aktivnosti RT i inhibicije PERT-testa. Tako se enzim RT može vezati na komplekse početnica/kalup (eng. *primer/template*) kao što su RNA:DNA, DNA:DNA ili RNA:RNA, može imati i DNA-ovisnu DNA polimeraznu aktivnost, te može dodavati nukleotide na terminalni dio molekule nevezano uz kalup (eng. *terminal non-template directed nucleotide addition*) (Suslov i sur., 2005). Reverzne transkriptaze osjetljive su na visoku temperaturu te ih povećanje temperature na kraju RT reakcije u RT-PCR-u u stvarnom vremenu na 95 ºC, kojom se aktivira TaqMan®-DNA-polimeraza i deaktivira inhibitor RNaze, uništava. No, pokazano je da su AMV-RT i MLV-RT stabilnije na povišenoj temperaturi ukoliko su vezane na kompleks početnica/kalup (Yasukawa i sur., 2008). Moguće je da dio molekula RT ostane vezano na komplekse nukleinskih kiselina i nakon povišenja temperature na kraju reakcije RT, zbog čega te nukleinske kiseline ostaju neupotrebljive za umnažanje u PCR-koraku i tako daju lažno snižen rezultat. Veza između RT i nukleinskih kiselina može se zadržati kroz čak 10 ciklusa PCR-a (Suslov i sur., 2005). Također, zbog svoje DNA-ovisne DNA-polimerazne aktivnosti, RT se može vezati na vezna mjesta TaqMan®-DNA-polimeraze i tako smanjiti broj kalupa dostupnih DNA-polimerazi. Ovo se može dogoditi u kratkom periodu nakon RT koraka, a prije povišenja temperature koja aktivira TaqMan®-DNA-polimerazu. Inhibicija ovisi o omjeru RT i DNA-polimeraze i pada s padom koncentracije RT (Sellner i sur., 1992; Suslov i sur., 2005). Pokazano je i kako RT potiče stvaranje dimera početnica (eng. *primer-dimer*) tako što dodaje nukleotide na 3' kraj početnica (Chumakov, 1994; Suslov i sur., 2005). Takve početnice postaju neupotrebljive, što smanjuje broj umnoženih nukleinskih kiselina i daje lažno snižen rezultat.

U sklopu disertacije svaki sam uzorak testirala samostalno i uz dodatak RT-standarda (eng. *spike*). Koncentracija RT-standarda za *spike* je visoka, odnosno, u uzorak se dodaje velik broj molekula RT. Ukoliko i u testiranom uzorku ima velik broj molekula RT, moguće je da ta visoka koncentracija enzima potiče njegovo neželjeno vezanje na komplekse nukleinskih kiselina i na stvaranje dimera početnica. Time se smanjuje kapacitet slobodnih molekula nukleinskih kiselina koji sudjeluju u RT- i PCR-koracima reakcije u stvarnom vremenu i dobivaju se lažno niži, odnosno, inhibirani rezultati. Dakle, sama prisutnost velikog broja molekula RT uzrokuje inhibiciju PERT-testa. Dodavanje dodatnih nehomolognih kalupa RNA u RT-PCR reakciju moglo bi ukloniti inhibiciju jer bi, kao alternativni supstrat za vezanje, okupiralo RT i tako uklonilo inhibiciju (Sellner i sur., 1992).

Povezanost inhibicije PERT-testa i koncentracije FBS-a u uzorku nije moguće dokazati, tim više što se pročišćeni albumin iz seruma goveda, koji je glavni sastojak FBS-a, inače koristi

za stabilizaciju PCR reakcije. No, FBS sadrži neke supstancije koje inhibiraju RT-PCR, što je uočeno kod uzoraka s niskom koncentracijom virusne RNA (Konet i sur., 2000). U svakoj PERT-test reakciji koristila sam istu koncentraciju RNA-kalupa, no pretpostavljam da su očitane razlike u inhibiciji PERT-testa potekle od različite koncentracije inhibitora u testiranim uzorcima.

Prisutnost ili odsutnost inhibicije uočene tijekom prvih dana kultivacije primarne stanične kulture pilećih fibroblasta, neovisne o visini aktivnosti RT, ne mogu sa sigurnošću objasniti. Pretpostavljam da je uzrok ovom fenomenu specifičnost svake pojedine pripreme primarne stanične kulture od embrioniranih jaja. Budući da se radi o pripremi stanične kulture od živih embrija koji nisu svi jednaki, moguće je da endogene retrovirusne čestice koje se stvaraju tijekom prvih dana kulture imaju različito sposobne molekule RT koje iskazuju različita svojstva.

Tijekom uvođenja i korištenja PERT-testa uočila sam određene slabosti metode te sam odlučila unaprijediti metodu pripreme uzoraka za PERT-test. Prema literaturnim podacima, endogene retrovirusne čestice koncentriraju se ultracentrifugiranjem, uz prethodno centrifugiranje, kojim se uklanja stanični debris, i sterilnu filtraciju. Nedostaci ultracentrifugiranja bili su u tome što sam primijetila da se velik dio retrovirusnih čestica ne istaloži. Naime, u neobrađenom uzorku supernatanta kulture PF bilo je znatno više aktivnosti RT nego u ultracentrifugiranom uzorku. Uočena aktivnost RT u neobrađenom uzorku vezana je uz česticu i zbog toga autentična. Također, nakon ultracentrifugiranja u supernatantu ostaje oko 10% aktivnosti RT, dakle, ne istalože se sve retrovirusne čestice, što je u skladu literaturom (Böni i sur., 1996). Sam postupak dobivanja uzorka iz taloga nakon centrifugiranja teško je standardizirati jer je talog nevidljiv pa operater nikad nije siguran je li pokupio sav talog. Uz to, i uz najveću pažnju može nakon odbacivanja supernatanta na stijenkama epruvete zaostati kapljica. Kapljica može skliznuti na talog i tako promijeniti koncentraciju retrovirusnih čestica po jedinici volumena, a i unijeti u uzorak tvari koje bi inače ostale u supernatantu, a koje imaju potencijalni negativni učinak na sam PERT-test (inhibicija).

Kao cilj rada, vezano uz pripremu uzoraka za PERT-test, navela sam da želim poboljšati osjetljivost testa primjenom kromatografije na kratkim monolitnim nosačima i istražiti omogućuju li navedeni nosači izolaciju i retrovirusnih čestica i enzima reverzne transkriptaze. Cilj je postignut utoliko što sam pokazala da je moguće izolirati, odnosno koncentrirati oboje

– i endogene retrovirusne čestice i sami enzim reverznu transkriptazu (Tablice 34. i 35.). U primijenjenim uvjetima kromatografije ova metoda pripreme uzoraka nije se pokazala boljom od ultracentrifugiranja i nije učinila test osjetljivijim. Unatoč tome, smatram da ima mjesta za poboljšanje pripreme uzoraka kromatografijom i to ponajprije na QA-disku u opciji u kojoj se koncentriraju molekule RT. Promjenom pufera za vezanje mogli bi se namjestiti uvjeti u kojima bi se sva RT iz uzorka vezala za kolonu, a zatim i eluirala s nje. Uvjete elucije trebalo bi vršiti u više stupnjeva koncentracije soli.

Svrha PERT-testa u kontroli kvalitete staničnih supstrata za proizvodnju cjepiva za ljudsku upotrebu je kvalitativno pokazati ima li ili nema aktivnosti RT u supernatantu. Kromatografskom metodom mogu se, unatoč slabijoj moći koncentriranja, otkriti velike količine molekula RT u uzorku (stotine milijuna), a rezultati na granici detekcije PERT-testa kreću se oko reda veličine stotinjak molekula RT. U tom smislu, priprema uzoraka za PERT-test kromatografijom za potrebe kontrole kvalitete može biti zadovoljavajuća za uzorke s visokom razinom aktivnosti RT, no dok se ne poboljšaju kromatografski uvjeti ne možemo biti sigurni da nećemo dobiti lažno negativan rezultat ukoliko se u uzorku nalazi jako mali broj endogenih retrovirusnih čestica.

Zaključno, PERT-test je vrlo osjetljiv test kojim se mogu detektirati vrlo niske koncentracije RT u uzorku. Kako bi test bio internacionalno prihvatljiv, potrebno je uvesti standard kao što je AMV-RT, koja se pokazala kao kvalitetan standard u izradi ove disertacije.

Svi uzorci potekli s pilećeg supstrata sadrže aktivnost RT, odnosno retrovirusne čestice. Aktivnost RT otkrila sam i u uzorcima diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura, te u mediju za rast i održavanje stanica s FBS-om. Prisutnost aktivnosti RT u mediju s FBS-om svakako je potrebno dalje istražiti zbog eventualnog značajnog utjecaja na kvalitetu krajnjeg proizvoda. Detektirana aktivnost RT ne potječe od infektivnih retrovirusnih čestica, budući da nema porasta aktivnosti RT u indikatorskim staničnim kulturama niti negativno utječe na miševe i zamorčad u testu opće neškodljivosti.

Istražila sam utjecaj različitih uvjeta proizvodnje cjepiva na pojavnost endogenih retrovirusa u proizvodnoj staničnoj kulturi. Uvjeti koji su optimalni za uzgoj cjepnog virusa odgovaraju i endogenim retrovirusnim česticama, no kako sam pokazala da su one neinfektivne, ne predstavljaju opasnost po pitanju neškodljivosti cjepiva.

Kromatografijom na monolitnim nosačima moguće je koncentrirati i endogene retrovirusne čestice i molekule RT, no potrebno je dodatno namjestiti kromatografske uvjete kako bi se priprema uzoraka za PERT-test poboljšala.

6. ZAKLJUČCI

1. Reverzna transkriptaza porijeklom iz virusa ptičje mijeloblastoze (AMV-RT) dobar je standard za testiranje aktivnosti RT porijeklom iz biološkog materijala u PERT-testu i trebao bi postati internacionalni standard dostupan svim proizvođačima lijekova na staničnim kulturama.

2. Aktivnost reverzne transkriptaze (RT) prisutna je u svim uzorcima poteklima s pilećeg supstrata (embrionirana jaja i primarne kulture pilećih fibroblasta), neovisno o porijeklu embrioniranih jaja, te u većini istraženih diploidnih i kontinuiranih staničnih kultura. Aktivnost RT potječe od neinfektivnih retrovirusnih čestica.

3. Fetalni goveđi serum (FBS), kao sastojak medija za rast stanica u staničnim kulturama, potencijalno sadrži endogene retrovirusne čestice, čiju je pojavnost potrebno istražiti.

4. Tijekom proizvodnje cjepiva protiv virusa mumpsa, priprema homogene primarne kulture pilećih fibroblasta (za razliku od manje homogene) i infekcija virusom mumpsa u staničnu suspenziju (za razliku od na stanični sloj) uzrokuju veće lučenje virusa mumpsa, ali i endogenih retrovirusnih čestica.

5. Kromatografijom na CIM-QA-disku i CIM-SO_3-disku koncentrira se, uz endogene retrovirusne čestice, i enzim reverzna transkriptaza, čime se povećava osjetljivost PERT-testa. U testiranim uvjetima CIM-QA-disk je učinkovitiji u koncentriranju enzima reverzne transkriptaze. Potrebno je dodatno istražiti uvjete kromatografije jer se pripremom uzoraka ultracentrifugiranjem detektira veći broj endogenih retrovirusnih čestica.

6. Neki uzorci inhibiraju PERT-test. Inhibicija može potjecati od samog enzima reverzne transkriptaze u uzorcima s visokom koncentracijom enzima. Izvor inhibicije u uzorcima s niskom koncentracijom enzima trebao bi se dodatno istražiti.

7. CITIRANA LITERATURA

1. André M, Morgeaux S, Fuchs F (2000) Quantitative detection of RT activity by PERT assay: Feasibility and limits to a standardized screening assay for human vaccines. Biologicals 28: 67-80

2. Araujo P (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. J Chromatogr B, 877: 2224–2234

3. Barut M, Podgornik A, Brne P, Strancar A (2005) Convective interaction media short monolithic columns: enabling chromatographic supports for the separation and purification of large biomolecules. J Sep Sci 25(15): 1876-1892

4. Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Zalbot G, Pačes J, Burt A, Tristem M (2004) Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. PNAS 101(14): 4894-4899

5. Black SG, Arnaud F, Palmarini M, Spencer TE (2010) Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. AJRI 64: 255-264

6. Blaise S, de Parseval N, Bénit L, Heidmann T (2003) Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. PNAS 100: 13013-13018

7. Blond J-L, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset F-L (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. J Virol 74: 3321-3329

8. Böni J, Pyra H, Schüpbach J (1996) Sensitive detection and quantification of particle-associated reverse transcriptase in plasma of HIV-1 infected individuals by the product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay. J Med Virol 49: 23-28

9. Branovic K, Forcic D, Ivancic J, Strancar A, Barut M, Kosutic Gulija T, Zgorelec R, Mazuran R (2003) J Virol Methods 110: 163-171

10. Brodziak A, Zoilko E, Muc-Wierzgon M, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Klakla K (2012) The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases. Med Sci Monit 18(6): 80-88

11. Brorson K, de Wit C, Hamilton E, Mustafa M, Swann PE, Kiss R, Taticek R, Polastri G, Stein KE, Xu Y (2002) Impact of cell culture process changes on endogenous retrovirus expression. Biotech Bioeng 80(3): 257-267

12. Brorson K, Xu Y, Swann PG, Hamilton E, Mustafa M, de Wit C, Norling LA, Stein KE (2002) Evaluation of a quantitative product-enhanced reverse transcriptase assay to monitor retrovirus in mAb cell-culture. Biologicals 30: 15-26

13. Buzdin A (2007) Human-specific endogenous retroviruses. The Scientific World Journal 7:1848-1868

14. Carter J, Saunders V (2007) Virology Principles and Applications. John Wiley & Sons, Ltd

15. Chumakov KM (1994) Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation. PCR Methods and Applications 4: 62-64

16. Conference report (2007): WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland, 7-8 April 2005. Biologicals 35: 63-71

17. de Parseval N, Heidmann T (2005) Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. Cytogenet Genome Res 110(1-4): 318-32

18. de Wit C, Fautz C, Xu Y (2000) Real-time quantitative PCR for retrovirus-like particle quantification in CHO cell culture. Biologicals 28: 137-148

19. Dewannieux M, Ribet D, Heidmann T (2010) Risks linked to endogenous retroviruses for vaccine production. Biologicals 38: 366-370

20. Dunn CA, Medstrand P, Mager DL (2003) An endogenous retroviral long terminal repeat is the dominant promoter for human β1,3-galactosiltransferase 5 in the colon. PNAS 100(22):12841-12846

21. Dupressoir A, Lavialle C, Heidmann T (2012) From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytin in placentration. Placenta 33(9): 669-71

22. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström S, Wold S (2000) Design of Experiments, Principles and Applications. Umetrics, Sweden

23. European Directorate for Quality of Medicines. 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines (07/2010:50202). In: European Pharmacopoeia. 7th ed.

24. European Directorate for Quality of Medicines. 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use (01/2011:50203). In: European Pharmacopoeia. 7th ed.

25. Fan X-Y, Lü G-Z, Wu L-N, Chen J-H, Xu W-Q, Zhao C-N, Guo S-Q (2006) A modified single-tube one-step product-enhanced reverse transcriptase (mSTOS-PERT) assay with heparin as DNA polimerase inhibitor for specific detection of RTase activity. J Clin Virol 37: 305-312

26. FDA, Guidance for Industry Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin, September 1998

27. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (2001) Fields virology. 4th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

28. Forčić D, Brgles M, Ivančić Jelečki J, Šantak M, Halassy B, Barut M, Jug R, Markušić M, Štrancar A (2011) Concentration and purification of rubella virus using monolithic chromatographic support. J Chromatogr B 879: 981-986

29. Frendo J-L, Olivier D, Cheynet V, Blond J-L, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F (2003) Direct involvement of HERV-W env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. Mol Cell Biol 23: 3566-3574

30. Gifford R, Tristem M (2003) The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. Virus Genes 26(3): 291-315

31. Griffiths DJ (2001) Endogenous retroviruses in the human genome sequence. Genome Biology 2: 1017.1-1017.5

32. Hussain AI, Johnson JA, Freire MdS, Heneine W (2003) Identification and characterization of avian retroviruses in chicken embryo-derived yellow fever vaccines: Investigation of transmission to vaccine recipients. J Virol 77: 1105-1111

33. Hussain AI, Shanmugam V, Switzer WM, Tsang SX, Fadly A, Thea D, Helfand R, Bellini WJ, Folks TM, Heneine W (2001) Lack of evidence of endogenous avian leukosis virus and endogenous avian retrovirus transmission to measles mumps rubella vaccine recipients. Emerg Infect Dis 7: 66-72

34. ICH harmonised tripartite guideline, Pharmaceutical development Q8(R2), Current Step 4 version dated August 2009

35. ICH harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), Current step 4 version, Parent guideline dated 27 October 1994 (complementary guideline on methodology dated 6 November 1996, incorporated in November 2005)

36. ICH harmonised tripartite guideline, Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A(R1), Current step 4 version, dated September 1999

37. Johnson JA, Heneine W (2001) Characterization of endogenous avian leukosis viruses in chicken embryonic fibroblast substrates used in production of measles and mumps vaccines. J Virol 75: 3605-3612

38. Johnson JA, Hussain A, Heneine W (2003) Expression of a recombinant gag protein from endogenous avian virus and its use in screening for antibody reactivity in recipients of chick-derived vaccines. Vaccine 21: 3738-3745

39. Johnson WE, Coffin JM (1999) Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. Proc Natl Acad Sci USA 96: 10254-10260

40. Jones MD, Foulkes NS (1989) Reverse transcription of mRNA by Thermus aquaticus DNA poymerase. Nucleic Acid Research 17(20): 8387-8388

41. Jungbauer A, Hahn R (2008) Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. J Chromatogr A 1184: 62-79

42. Khan AS, Maudru T, Thompson A, Muller J, Sears JF, Peden KWC (1998) The reverse transcriptase activity in cell-free medium of chicken embryo fibroblast cultures is not associated with a replication-competent retrovirus. J Clin Virol 11: 7-18

43. Khan AS, Muller J, Sears JF (2001) Early detection of endogenous retroviruses in chemically induced mouse cells. Virus Res 79: 39-45

44. Konet DS, Mezencio JMS, Babcock G, Brown F (2000) Inhibitors of RT-PCR in serum. J Virol Methods 84: 95-98

45. Kothapalli R, Danyluck GM, Bailey RD, Loughran TP, Jr. (2003) Problems associated with product enhancement reverse transcriptase assay using bacteriophage MS2-RNA as a template. J Virol Methods 109:203-207

46. Krajačić M, Ivancic-Jelecki J, Forcic D, Vrdoljak A, Škorić D (2007) Purification of plant viral and satellite double-stranded RNAs on DEAE monoliths. J Cromatography A 1114: 111-119

47. Kramberger P, Peterka M, Boben J, Ravnikar M, Štrancar A (2007) Short monolithic columns – A breakthrough in purification and fast quantification of tomato mosaic virus. J Cromatography A 1114: 143-149

48. Kramberger P, Petrovič N, Štrancar A, Ravnikar M (2004) Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. J Virol Methods 120: 51-57

49. Kruh, J (1981) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. Molecular and Cellular Biochemistry 42(2): 65-82

50. Kurth R, Bannert N (2010) Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. Int J Cancer 126: 306-314

51. Kutle L, Pavlovic N, Dorotic M, Zadro I, Kapistic M, Halassy B (2010) Robustness testing of live attenuated rubella vaccine potency assay using fractional factiroal design of experiments. Vaccine 28(33): 5497-502

52. Lovatt A, Black J, Galbraith D, Doherty i, Moran MW, Shepherd AJ, Griffen A, bailey A, Wilson N, Smith KT (1999) High throughput detection of retrovirus-associated reverse transcriptase using an improved fluorescent product enhanced reverse transcriptase assay and its comparison to conventional detection methods. J Virol Med 82: 185-200

53. Ma YK, Khan AS (2009) Evaluation of different RT enzyme standards for quantification of retroviruses using the single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay. J Virol Methods, 157(2): 133-140

54. Mang R (2001) Endogenous retroviruses and xenotransplantation. Veterinary Sciences Tomorrow 4: 1-23

55. Markusic M, Pavlovic N, Santak M, Maric G, Kotarski L, Forcic D (2013) Critical factors for the replication of mumps virus in primary chicken embryo fibriblasts defined by the use of design of experiments (DoE). Appl Microbiol Biotechnol 97(4): 1533-41

56. Mattiuzzo G, Ivol S, Takeuchi Y (2009) Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. J Virol 84(5): 2618-2622

57. Maudru T, Peden K (1997) Elimination of background signals in a modified polymerase chain reaction-based reverse transcriptase assay. J Virol Methods 66: 247-261

58. Maudru T, Peden KW (1998) Adaptation of the fluorogenic 5'-nuclease chemistry to a PCR-based reverse transcriptase assay. BioTechniques 25: 972-975

59. Maudru T, Peden KWC (1998) Analysis of a coded panel of licenced vaccines by polymerase chain reaction-based reverse transcriptase assays: A collaborative study. J Clin Virol 11: 19-28

60. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, La Vallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Ketih JC Jr, McCoy JM (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403(6771): 785-9

61. Miyazawa T (2010) Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines. Biologicals 38: 371-376

62. Miyazawa T, Yoshikawa R, Golder M, Okada M, Stewart H, Palmarini M (2010) Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets. J Virol 84(7): 3690-3694

63. Nelson PN, Carnegie PR, Martin J, Davari Ejtehadi H, Hooley P, Roden D, Rowland-Jones S, Warren P, Astley J, Murray PG (2003) Demystified…Human endogenous retroviruses. J Clin Pathol: Mol Pathol 56:11-18

64. Nelson PN, Hooley P, Roden D, Davari Ejtehadi H, Rylance P, Warren P, Martin J, Murray PG (2004) Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? Clin Exp Immunol 138:1-9

65. Perl A (2003) Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. Rheum Dis Clin N Am 29: 123-143

66. Podgornik A, Yamamoto S, Peterka M, Krajnc NL (2013) Fast separation of large biomolecules using short monolithic columns. J Chromatogr B 927: 80-89

67. Pyra H, Böni J, Schüpbach J (1994) Ultra sensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. Proc Natl Acad Sci USA 91: 1544-1548

68. Robertson JS, Nicolson C, Riley AM, Bentley M, Dunn G, Corcoran T, Schild GC, Minor P (1997) Assesing the significance of reverse transcriptase activity in chick cell-derived vaccines. Biologicals 25: 403-414

69. Ryan FP (2004) Human endogenous retroviruses in health and disease: a symbiotic perspective. J R Soc Med 97: 560-565

70. Sears JF, Khan AS (2003) Single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay with Ampliwax^{TM} (STF-PERT) for retrovirus quantification. J Virol Methods 108: 139-142

71. Sellner LN, Coelen RJ, Mackenzie JS (1992) Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. Nucl Acid Res 20(7): 1487-1490

72. Shahabuddin M, Sears JF, Khan AS (2001) No evidence of infectious retroviruses in measles virus vaccines produced in chicken embryo cell cultures. J Clin Microbiol 39: 675-684

73. Strancar A, Podgornik A, Barut M, Necina R (2002) Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. Adv Biochem Eng Biotechnol 76: 49-85

74. Stryer L (1996) Biochemistry. 4th edn. W. H. Freeman and Company, New York

75. Suslov O, Steindler DA (2005) PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. Nucleic Acids Research 33(20): e181, doi:10.1093/nar/gni176

76. Tarlington R, Meers J, Young P (2008) Biology and evolution of the endogenous koala retrovirus. Cell Mol Life Sci 65(21): 3413-21

77. Tennikova TB, Švec F (2003) Theoretical aspects of separation using short monolithic beds. U: Švec F, Tennikova TB, Deyl Z (ur.) Monolithic materials: Preparation, Properties and applications (J Chromatogr Library, Vol 67). Elsevier Sciences BV, Oxford, 351-371

78. Tsang SX, Switzer WM, Shanmugam V, Johnson JA, Goldsmith C, Wright A Fadly A, Thea D, Jaffe H, Folks TN, Heneine W (1999) Evidence of avian virus subgroup E and endogenous avian virus in measles and mumps vaccines derived from chicken cells: Investigation of transmission to vaccine recipients. J Virol 73(7): 5843-5851

79. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL (2010) Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. J Virol 84(12): 6033-6040

80. Voisset C, Tönjes RR, Breyton P, Mandrand B, Paranhos-Baccalà (2001) Specific detection of RT activity in culture supernatants of retrovirus-producing cells, using synthetic DNA as competitor in polymerase enhanced reverse transcriptase assay. J Virol Methods 94: 187-193

81. Weiss RA (2001) Adventitious viral genomes in vaccines but not in vaccines. Emerg Infect Dis 7(1)

82. Weiss RA (2006) The discovery of endogenous retroviruses. Retrovirology 3: 67

83. Weissmahr RN, Schüpbach J, Böni J (1997) Reverse transcriptase activity in chicken embryo fibroblast culture supernatants is associated with particles containing endogenous avian retrovirus EAV-0 RNA. J Virol 71(4): 3005-3012

84. WHO/VSQ/97.02 A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation

85. Yasukawa K, Nemoto D, Inouye K (2008) Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and moloney murine leukaemia virus. J Biochem 143(2): 261-268

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: **Leonida Kutle** (r. Repalust)
Datum i mjesto rođenja: 05.02.1978., Zagreb
Adresa: Učkina 52, Zagreb
Telefon: 098/674 014
e-mail: leonida.kutle@gmail.com

OBRAZOVANJE

1992–1996	Klasična gimnazija u Zagrebu
1996–2002	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, smjer Molekularna biologija
2010–	Odobrena tema doktorske disertacije u sklopu poslijediplomskog studija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna i stanična biologija

RADNO ISKUSTVO

2002 - 2013 **Imunološki zavod d.d.**

Odjel za kontrolu kvalitete

2002-	Mlađi asistent
2003-	Stručni suradnik u Uredu voditelja
2007-	Odgovorna osoba za stabilitetne studije
2012-	Zamjenica voditelja

2013 - **Genera d.d.**

Razvoj proizvoda, Poslovna jedinica Biologija

ZNANSTVENI ČLANCI

Ivančić, J., Forčić; D.; Košutić Gulija, T.; Zgorelec, R.; **Repalust, L.**; Baričević, M.; Meško Prejac, M.; Mažuran, R. Genetic characterization of mumps virus isolate during passaging in the amniotic cavity of embryonated chicken eggs. Virus Res; 2004; 99(2):121-129

Kutle, L; Pavlović, N; Dorotić, M; Zadro, I; Kapustić, M; Halassy, B. Robustness Testing of Live Attenuated Rubella Vaccine Potency Assay using Fractional Factorial Design of Experiments. Vaccine; 2010; 28:5497-5502

USAVRŠAVANJA

Health Insurance in Transition, Fifth International Conference – **Writing a Research Paper** in Public Health and Biotechnology, Zagreb, 26-28 September 2002

Stability Testing for Biologics (Informa Life Sciences), 13-14 November 2007, Prag, Republika Češka
Pre-conference Workshop – Analytical Methods and Design and Implementation of Forced Degradation Protocols, November 12, 2007

Post-conference Workshop – Establishing Appropriate Specifications: Estimating Shelf Life, November 15, 2007

Stability Evaluation of Vaccines (IABS), 27-29 October 2008, Genève, Švicarska

Stability Testing for Biologics (Informa Life Sciences), 11-12 November 2008, München, Njemačka
Post-conference Workshop – Establishing Appropriate Specifications: Estimating Shelf Life, November 13, 2008

Statistika u validaciji analitičkih metoda, predavač dr.sc. Miljenko Košiček, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 17.ožujak 2009.

PRISUSTVOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Trakošćan, September 22 – 24, 2002.

XII International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June 14 – 19, 2003
Sudjelovanje s posterom (1): *Ivančić J, Forčić D, Košutić Gulija T, Zgorelec R,* ***Repalust L,*** *Meško Prejac M, Mažuran R Genetic characterization of mumps virus isolate during passaging in the allantoic cavity of embryonated chicken eggs.*

The Third European-American School in Forensic Genetics and Mayo Clinic Course in Advanced Molecular and Cellular Medicine, Zagreb, September 1-5, 2003 ***Sudjelovanje s posterom (1)***

Annual Meeting of the Croatian Immunological Society, Brijuni, Croatia, October 17-19, 2003
Sudjelovanje s posterom (1) i Sudjelovanje s posterom (2): Repalust L, *Forčić D, Jug R, Mažuran R Quantitative detection of RT activity by colorimetric reverse trancriptase assay and product enhanced reverse transcriptase (PERT) assay; Comparison of the two assays*

BEBPA's Annual Bioassay Conference, Pre-Conference Workshop on Assay Design and Assay Monitoring, 30 September-02 October 2009, Rome, Italy
Sudjelovanje s posterom (3) i usmena prezentacija: Kutle L*, Zadro I, Božić T, Kapustić M, Pavlović N. Application of Fractional Factorial Design of Experiments to Live Attenuated Measles Vaccine Potency Assay Robustness Testing*

Sudjelovanje s posterom (4): *Pavlović N, Dorotić M, Zadro I, Kapustić M,* ***Kutle L****, Halassy B. Application of Fractional Factorial Design of Experiments to Live Attenuated Rubella Vaccine Potency Assay Robustness Testing*

POZVANO PREDAVANJE

Mažuran R, **Repalust L.** Imunost na cjepiva, Poslijediplomski tečaj obnove znanja "Aktualnosti u epidemiologiji" (voditelji tečaja Vorko-Jović A, Aleraj B). Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 20-21. veljače 2003.

Kutle L. Validacija bioloških testova – Studija robustnosti testa titracije virusa rubele, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, 11.05.2011.

NAGRADE

Nagrada za najbolji poster i sponzorirano prisustvovanje kongresu BEBPA's Annual Bioassay Conference, Pre-Conference Workshop on Assay Design and Assay Monitoring.

PROJEKTI

Istraživač/suradnik na projektu

2007-2009 Test neurovirulentnosti virusnih cjepiva: primjena i validacija, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (TP-05/0021-02) (glavni istraživač: prof.dr.sc. Renata Mažuran)

2004-2007 Genetic analysis of mumps and measles wild type viruses in Republic of Croatia, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (0021999) (glavni istraživač: dr.sc. Dubravko Forčić)

2001-2003 Razvoj novog cjepvog soja virusa mumpsa, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH (TP 01/0021-01) (glavni istraživač: prof.dr.sc. Renata Mažuran)