VIŠJA STROKOVNA ŠOLA ACADEMIA

MARIBOR

RAZVOJ ZAPRTEGA FLUIDNEGA SISTEMA S KARTUŠO ZA ENKRATNO UPORABO ZA AVTOMATIZIRANO IZOLACIJO STROMALNE VASKULARNE FRAKCIJE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA

Kandidat: Jalen Arko

Vrsta študija: študent izrednega študija

Študijski program: Strojništvo

Mentor predavatelj: Dragan Gogić, mag. inž. metal. in mater.

Mentor v podjetju: dr. Lenart Girandon

Lektor: Marjeta Vozlič, prof. slov. jez.

Maribor, 2026

IZJAVA O AVTORSTVU DIPLOMSKEGA DELA

Podpisani Jalen Arko, sem avtor diplomskega dela z naslovom Razvoj zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo za avtomatizirano izolacijo stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva, ki sem ga napisal pod mentorstvom Dragan Gogić, mag. inž. metal. in mater.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo izključno rezultat mojega dela,
- sem poskrbel, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženi nalogi, navedena oz. citirana skladno s pravili Višje strokovne šole Academia Maribor,
- se zavedam, da je plagiatorstvo – predstavljanje tujih del oz. misli, kot moje lastne kaznivo po Zakonu o avtorski in sorodnih pravicah (Uradni list RS, št. 16/07 – uradno prečiščeno besedilo, 68/08, 110/13, 56/15 in 63/16 – ZKUASP); prekršek pa podleže tudi ukrepom Višje strokovne šole Academia Maribor skladno z njenimi pravili,
- skladno z 32.a členom ZASP dovoljujem Višji strokovni šoli Academia Maribor objavo diplomskega dela na spletnem portalu šole.

Ljubljana, oktober 2026 Podpis študenta:

ZAHVALA

Največja zahvala gre moji družini. Težko je v nekaj stavkih opisati, koliko mi je pomenila vaša podpora skozi vsa leta. Vedno ste verjeli vame, mi stali ob strani in mi omogočili, da sem lahko šel po svoji poti, tudi takrat, ko ta ni bila vedno najlažja ali najbolj običajna. Hvala za spoštovanje, s katerim ste sprejemali moje odločitve, za potrpežljivost, kadar sem bil zaradi dela in študija odsoten, ter za to, da ste mi vedno pustili dovolj prostora, da sem se lahko učil tudi iz lastnih napak.

Predvsem pa hvala za občutek miru, sreče in ljubezni, ki sem ga vedno našel doma. Ne glede na to, kako naporno, negotovo ali natrpano je bilo vse drugo, sem vedel, da obstaja prostor, kjer se lahko ustavim in kjer mi ni treba ničesar dokazovati. Take stvari je preprosto jemati za samoumevne, dokler se ne zaveš, kako veliko pomenijo. Danes vem, da je bila prav ta gotovost ena najpomembnejših stvari, ki ste mi jih dali.

Veliko tega, kar sem danes, izhaja prav iz vas, iz vrednot, ki ste mi jih privzgojili, odnosa do dela, vztrajnosti in prepričanja, da se je za stvari, ki ti nekaj pomenijo, vredno potruditi. Če sem danes prišel do točke, ko zaključujem še en študij in hkrati gradim svojo poklicno pot, je velik del tega tudi vaša zasluga. Za vse, kar ste naredili zame, vam verjetno nikoli ne bom mogel v celoti povrniti, lahko pa vam povem, da tega ne jemljem za samoumevno. Hvala.

Hvala tudi prijateljem, ki ste bili pomemben del moje poti. Za vse pogovore, izkušnje, nasvete, skupne trenutke in predvsem za to, da ste ostali ob meni tudi v obdobjih, ko je bilo zaradi dela in študija za vse drugo nekoliko manj časa. Marsikaj, kar danes vem in kako gledam na svet, je nastalo tudi skozi leta druženja z vami.

Iskreno se zahvaljujem mentorju Draganu Gogiću, mag. inž. metal. in mater., za strokovno pomoč, usmerjanje in čas, ki mi ga je namenil pri izdelavi diplomskega dela.

Posebna zahvala gre tudi mentorju v podjetju, dr. Lenartu Girandonu, za zaupanje, strokovno podporo in priložnost sodelovati pri razvojnem delu, iz katerega je nastala tudi ta diplomska naloga. Znanje in izkušnje, ki sem jih ob tem pridobil, bodo pomemben del moje nadaljnje poklicne poti.

Zahvaljujem se tudi vsem sedanjim in nekdanjim sodelavcem. Velik del praktičnega in strokovnega znanja, ki ga imam danes, sem pridobil prav pri delu z vami. Hvala za pomoč, izmenjavo znanja, odgovore na številna vprašanja in vse izkušnje, ki smo jih pridobili skupaj.

Na koncu se zahvaljujem še Višji strokovni šoli Academia Maribor, njenim predavateljem in zaposlenim. V štirih letih študija sem na Academii zaključil dva študijska programa, ob tem pa pridobil veliko več kot zgolj znanje, zapisano v učnih načrtih. Še posebej cenim razumevanje in prilagodljivost do študentov, ki študij usklajujemo z delom, ter odnos predavateljev, ki so bili vedno pripravljeni pomagati in svoje znanje povezovati s prakso.

Hvala vsem, ki ste bili del te poti.

POVZETEK

Izolacija stromalne vaskularne frakcije (SVF) iz maščobnega tkiva se običajno izvaja ročno z več ločenimi koraki, različnimi posodami in zaključnim centrifugiranjem. Postopek je zato časovno zahteven, odvisen od izvajalca in izpostavljen tveganju kontaminacije. Diplomsko delo obravnava razvoj zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo, ki ročni postopek pretvori v avtomatiziran proces in ga prilagodi omejitvam obstoječe naprave.

Predstavljen je prehod z zasnove z brizgami na sistem z vrečkami in peristaltičnimi črpalkami ter konstrukcijski razvoj kartuše. Utemeljene so izbire materialov, cevk, konektorjev, razdelilnih kolektorjev, črpalk, grelnega sklopa in modula z votlimi vlakni. Opisani so procesni koraki od predhodnega polnjenja in encimske obdelave do dekantiranja, koncentriranja in pridobitve končnega produkta.

Z orientacijsko oceno mehanike tekočin (Reynoldsovo in kavitacijsko število, padec tlaka in stenska strižna napetost) so bili ovrednoteni pretočni režim, strižne obremenitve celic, vpliv geometrije in tveganje zastojev. Teoretične ugotovitve so bile primerjane z rezultati 63 eksperimentov izvedenih med letoma 2023 in 2026, ki so obsegali testiranje črpalk, dimenzij cevk, mešanja, tesnjenja, koncentriranja in primerjavo s centrifugiranjem.

Analiza je pokazala laminaren tok in veliko varnostno rezervo glede kavitacije, ocenjene strižne obremenitve pa so ostale pod območjem, kjer bi bilo glede na literaturo pričakovati poslabšanje viabilnosti. Hitrost črpalke sama celicam ni škodovala niti pri najvišjih testiranih vrednostih, medtem ko je na izkoristek pomembno vplival način pretakanja; mešanje s premori je bilo učinkovitejše od neprekinjenega prečrpavanja. V primerjavi s centrifugiranjem je bila viabilnost primerljiva ali rahlo boljša, nižji izkoristek pa je bil povezan predvsem z dekantiranjem in filtracijo.

Končna zasnova podpira cikle za 40, 100 in 120 mL lipoaspirata, končni volumen produkta pa ostaja približno med 6 in 9,5 mL. Pri zrelejših različicah je viabilnost dosledno presegala 80 %. Večina sedmih hipotez je bila potrjena, ena posredno in ena delno. Glavna preostala omejitev je izkoristek koncentriranja, ki predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnji razvoj.

Ključne besede: *stromalna vaskularna frakcija, zaprt fluidni sistem, kartuša za enkratno uporabo, mehanika tekočin, modul z votlimi vlakni*

ABSTRACT

Development of a Closed Fluidic System with a Single-Use Cartridge for the Automated Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissue

The stromal vascular fraction (SVF) is commonly isolated from adipose tissue by a manual procedure with several separate steps, multiple containers and final centrifugation. The workflow is time-consuming, operator-dependent and exposed to contamination risk. This thesis presents the development of a closed fluidic system with a single-use cartridge that automates the procedure while fitting within the constraints of an existing device.

The work describes the transition from a syringe-based design to a system using bags and peristaltic pumps, followed by the structural development of the cartridge. The selection of materials, tubing, connectors, manifolds, pumps, the heating assembly and the hollow-fiber module is justified, together with the main process stages from priming and enzymatic treatment to concentration and final product retrieval.

Fluid mechanics was assessed with an orientation estimate of the Reynolds and cavitation numbers, pressure drop and wall shear stress. Flow regime, cellular shear stresses, geometry effects and obstruction risk were assessed and compared with 63 experiments conducted between 2023 and 2026, including pump, tubing, mixing, sealing, concentration and centrifugation tests.

The flow remained laminar with a large safety margin against cavitation, and estimated shear stresses were below literature-based levels associated with reduced viability. Pump speed alone did not damage cells; the pumping pattern was more important, with paused mixing outperforming continuous pumping. Viability was comparable or slightly better than after centrifugation, whereas the lower yield was mainly linked to decantation and filtration.

The final design supports cycles for 40, 100 and 120 mL of lipoaspirate and produces approximately 6 to 9.5 mL of final product. Mature versions consistently exceeded 80% cell viability. Most hypotheses were confirmed, while concentration yield remains the main limitation and a priority for further development.

Keywords: *stromal vascular fraction, closed fluidic system, single-use cartridge, fluid mechanics, hollow fiber module*

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 16

1.1 Opis področja in opredelitev problema 16

1.2 Namen in cilji diplomskega dela 17

1.3 Raziskovalna vprašanja in hipoteze 18

1.4 Predpostavke in omejitve diplomskega dela 19

1.5 Uporabljene raziskovalne metode 20

2 STROMALNA VASKULARNA FRAKCIJA IN IZHODIŠČA IZOLACIJE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA 21

2.1 Opredelitev stromalne vaskularne frakcije 21

2.2 Maščobno tkivo kot izhodiščni vzorec 22

2.3 Postopek manualne izolacije stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva 22

2.4 Vloga encimske obdelave, spiranja in koncentriranja celic pri izolaciji SVF 23

2.5 Centrifugiranje kot kontrolni postopek za primerjavo rezultatov 24

2.6 Tehnični izzivi pri avtomatizaciji izolacije SVF 24

3 IZHODIŠČNA NAPRAVA IN RAZVOJNE ZAHTEVE ZA SISTEM 26

3.1 Namen in osnovni koncept naprave 26

3.2 Izhodiščna zasnova naprave za separacijske postopke 27

3.3 Omejitve začetne zasnove z brizgami in razdelilnimi kolektorji 28

3.4 Razlogi za prilagoditev sistema postopku izolacije SVF 30

3.5 Prehod iz sistema z brizgami na sistem s peristaltičnimi črpalkami 31

3.6 Zahteve za zaprt sistem, uporabnost, ponovljivost in zmanjšanje tveganja kontaminacije 31

3.7 Omejitve razvoja prve funkcionalne različice sistema 32

4 ZASNOVA ZAPRTEGA FLUIDNEGA SISTEMA 35

4.1 Splošna arhitektura fluidnega sistema 35

4.2 Potek tekočin skozi sistem 36

4.3 Vloga peristaltičnih črpalk v sistemu 38

4.4 Vloga vrečk, cevk, razdelilnih kolektorjev in priključnih mest 39

4.5 Zahteve za tesnjenje in preprečevanje vdora zraka v sistem 40

4.6 PREPREČEVANJE ZADRŽEVANJA TEKOČIN IN ZMANJŠANJE NEUGODNIH PRETOČNIH MEST 41
4.7 VARNOSTNI IN UPORABNIŠKI VIDIKI ZAPRTEGA SISTEMA ... 42
5 KONSTRUKCIJSKI RAZVOJ KARTUŠE ZA ENKRATNO UPORABO ... 43
5.1 FUNKCIJA KARTUŠE V AVTOMATIZIRANI NAPRAVI ... 43
5.2 MEHANSKA ZASNOVA PLASTIČNEGA OHIŠJA KARTUŠE ... 43
5.3 PRILAGODITEV OHIŠJA KARTUŠE ZA IZDELAVO Z BRIZGANJEM PLASTIKE IN MJF TISKANJEM ... 45
5.4 NAMESTITEV CEVK, VREČK, RAZDELILNIH KOLEKTORJEV, KAPALNE KOMORE IN MODULA Z VOTLIMI VLAKNI V KARTUŠO ... 48
5.5 VPETJE KARTUŠE V NAPRAVO IN POZICIONIRANJE POD KOTOM ... 49
5.6 MEHANSKA POVEZAVA KARTUŠE S POGONI TER KONSTRUKCIJSKE REŠITVE ZA NJENO VSTAVLJANJE IN ODSTRANITEV ... 49
5.7 CAD MODELIRANJE KARTUŠE IN PREVERJANJE KONSTRUKCIJSKIH REŠITEV ... 50
5.8 RAZVOJNE RAZLIČICE KARTUŠE IN SPREMEMBE NA PODLAGI TESTIRANJ ... 52
6 IZBIRA KOMPONENT IN MATERIALOV ... 56
6.1 MERILA ZA IZBIRO MATERIALOV ZA KARTUŠO IN FLUIDNE POVEZAVE ... 56
6.2 IZBIRA CEVK GLEDE NA DIMENZIJE, PRETOK, FLEKSIBILNOST IN ZDRUŽLJIVOST S PERISTALTIČNIMI ČRPALKAMI ... 62
6.3 PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH DIMENZIJ CEVK NA DELOVANJE SISTEMA ... 63
6.4 PREGLED KONEKTORJEV, UPORABLJENIH V SISTEMU ... 64
6.5 IZBIRA PERISTALTIČNIH ČRPALK S KORAČNIMI MOTORJI ... 66
6.5.1 Delovanje peristaltične črpalke ... 66
6.5.2 Pomen debeline stene cevi ... 67
6.5.3 Koračni motor kot pogon črpalke ... 67
6.5.4 Primerjava z brizgalno in centrifugalno črpalko ... 68
6.6 VLOGA RAZDELILNIH KOLEKTORJEV PRI PREKLAPLJANJU TEKOČINSKIH POTI ... 69
6.7 IZBIRA IN VKLJUČITEV SILIKONSKIH GRELNIH ELEMENTOV ... 70
6.8 VLOGA KAPALNE KOMORE IN MREŽICE PRI ZADRŽEVANJU VEČJIH DELCEV MAŠČOBNEGA TKIVA ... 73
6.9 IZBIRA MODULA Z VOTLIMI VLAKNI ZA KONCENTRIRANJE CELIC IN ODSTRANJEVANJE ENCIMA ... 74
6.9.1 Delovanje modula z votlimi vlakni ... 74
6.9.2 Izbrani modul in njegove specifikacije ... 75

7 PROCESNI SKLOPI IZOLACIJE SVF V ZAPRTEM SISTEMU 76
7.1 Priprava sistema in predhodno izpiranje kartuše z Ringerjevo raztopino 76
7.2 Vnos maščobnega tkiva in encima v vrečko 79
7.3 Ogrevanje vzorca na 37 °C med encimsko obdelavo 80
7.4 Mešanje maščobnega tkiva med dvema vrečkama 83
7.5 Dodajanje Ringerjeve raztopine in dekantiranje celične frakcije 84
7.6 Zaščita sistema pred večjimi delci maščobe in ostanki tkiva 85
7.7 Koncentriranje celic z modulom z votlimi vlakni in pridobitev končnega produkta 86
8 MEHANIKA TEKOČIN IN VPLIV PRETOČNIH POGOJEV 89
8.1 Ocena pretočnih razmer 89
8.2 Ugotovitve za konstrukcijo sistema 90
9 EKSPERIMENTALNO TESTIRANJE PROTOTIPOV IN REZULTATI 92
9.1 Namen in potek eksperimentalnega testiranja 92
9.2 Rezultati testiranja pretoka in delovanja peristaltičnih črpalk 93
9.3 Rezultati testiranja različnih dimenzij cevk 95
9.4 Rezultati testiranja mešanja med vrečkama 95
9.5 Rezultati testiranja tesnjenja in povezovalnih mest 96
9.6 Rezultati testiranja koncentriranja celic brez senzorja nivoja 97
9.7 Primerjava rezultatov s kontrolnim postopkom centrifugiranja 98
9.8 Zbirni pregled rezultatov po ciklih 100
9.9 Iterativne spremembe sistema na podlagi eksperimentalnih opažanj 101
10 UPORABA UMETNE INTELIGENCE KOT PODPORNEGA ORODJA PRI RAZVOJU SISTEMA 103
10.1 Vloga umetne inteligence pri raziskovanju strokovnih virov 103
10.2 Uporaba umetne inteligence pri tehničnih izračunih in razumevanju fluidnih pojavov 103
10.3 Uporaba umetne inteligence pri iskanju konstrukcijskih rešitev in komponent 104
10.4 Uporaba umetne inteligence pri primerjavi razvojnih možnosti 105
10.5 Uporaba umetne inteligence pri urejanju razvojnih opažanj in interpretaciji rezultatov 105
10.6 Omejitve uporabe umetne inteligence pri tehničnem razvoju 106
11 RAZPRAVA IN OVREDNOTENJE HIPOTEZ 107

11.1 OVREDNOTENJE ZASNOVE ZAPRTEGA FLUIDNEGA SISTEMA 107
11.2 OVREDNOTENJE IZBIRE MATERIALOV, CEVK, KONEKTORJEV, VENTILOV, ČRPALK IN GRELNIH ELEMENTOV 107
11.3 OVREDNOTENJE UPORABE CAD MODELIRANJA PRI RAZVOJU KARTUŠE 108
11.4 OVREDNOTENJE VPLIVA PRETOKA, GEOMETRIJE IN NAČINA PRETAKANJA NA CELICE .. 108
11.5 OVREDNOTENJE ITERATIVNEGA RAZVOJA IN IZVEDENIH IZBOLJŠAV 109
11.6 OVREDNOTENJE UPORABE UMETNE INTELIGENCE KOT PODPORNEGA ORODJA 109
11.7 POTRDITEV OZIROMA ZAVRNITEV HIPOTEZ 110
11.8 OMEJITVE RAZVITE REŠITVE 110
11.9 MOŽNOSTI NADALJNJEGA RAZVOJA SISTEMA 111
12 SKLEP 112
13 VIRI, LITERATURA 114

KAZALO SLIK

Slika 1: Naprava za avtomatizirano izolacijo SVF: (a) z zaprtim pokrovom; (b) z odprtim pokrovom in vstavljeno kartušo 26
Slika 2: Izhodiščna zasnova sistema: (a) kartuša z brizgami in razdelilnima kolektorjema; (b) naprava s pogoni za premikanje batov brizg 27
Slika 3: Primer odstopanja gumijastega bata od plastičnega dela brizge med ponavljajočim se gibanjem 28
Slika 4: Pogoni batov brizg z aluminijastimi vreteni in koračnimi motorji v izhodiščni zasnovi naprave 29
Slika 5: Preizkusna rešitev ogrevanja vzorca pri zasnovi z brizgami 30
Slika 6: Zgodnja preizkusna postavitev sistema po prehodu na peristaltično črpanje 34
Slika 7: Fizična postavitev zaprtega fluidnega sistema z grelnim sklopom, peristaltičnimi črpalkami, razdelilnima kolektorjema, vrečkami in modulom z votlimi vlakni 36
Slika 8: Tehnična risba ohišja kartuše z glavnimi merami (mere v mm) 45
Slika 9: CAD model ohišja kartuše v programu Fusion 360: (a) pogled na stran z ležiščema razdelilnih kolektorjev; (b) izometrični pogled 45
Slika 10: CAD-prikaz prostorskega ujemanja kartuše z napravo: (a) notranjost naprave brez kartuše; (b) naprava z vstavljeno kartušo 51
Slika 11: CAD-sestav kartuše v programu Fusion 360 z vrečkami, cevmi in komponentami: (a) izometrični pogled; (b) pogled na stran z razdelilnima kolektorjema 52
Slika 12: Zgodnja razvojna različica fluidnega sklopa s prosto speljanimi cevkami pred uvedbo integriranega nosilnega ohišja 53
Slika 13: Prva zasnova z integriranim nosilnim ohišjem in določenimi mesti vodenja cevk .. 54
Slika 14: Nadaljnji razvoj integriranega nosilnega ohišja: (a) CAD-model črne različice kartuše; (b) fizično izdelana različica iste zasnove 54
Slika 15: Sedanja različica kartuše z integriranim nosilnim ohišjem v delovnem položaju znotraj naprave 55
Slika 16: Prikaz notranjosti grelnega sklopa z odprtimi vratci 70
Slika 17: CAD-model grelnega sklopa z vratci in zapiralom 72
Slika 18: Blok shema zgodnje izvedbe ogrevanja z dvopoložajno regulacijo in ločenim merjenjem temperature vzorca 72

Slika 19: Zaporedje namestitve kartuše: (a) nastavki servo motorjev za ventile brez kartuše; (b) zapah v odprtem položaju; (c) zapah v zaprtem položaju na ohišju kartuše; (d) nastavki servo motorjev, ki primejo ročice ventilov 77
Slika 20: Primer merjenja temperature med preizkusom sistema 82
Slika 21: Termovizijski posnetek grelnega sklopa med segrevanjem 83
Slika 22: Primer razslojevanja vsebine procesne vrečke pred odvzemom tekočinske frakcije 85
Slika 23: Preizkusna postavitev pri testiranju zanesljivosti peristaltične črpalke pri 300, 400 in 500 vrtljajih na minuto 94

KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava izdelovalnih postopkov ohišja kartuše 47
Tabela 2: Kosovnica kartuše za enkratno uporabo 57
Tabela 3: Primerjava lastnosti materialov, uporabljenih v kartuši 59
Tabela 4: Utemeljitev izbire materialov po mestu uporabe 60
Tabela 5: Zbirni prikaz ocenjenih pretočnih parametrov po stanjih procesa pri 400 vrt/min .. 89
Tabela 6: Zbirni rezultati testiranja po ciklih izolacije 100
Tabela 7: Povzetek potrditve oziroma zavrnitve zastavljenih hipotez..... 110

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1: Reynoldsovo število v odvisnosti od hitrosti črpalke na začetku mešanja med vrečkama A in B 90
Grafikon 2: Absolutno število TNC in CFU po različnih načinih razgradnje ter naknadni obdelavi s centrifugiranjem 99

SEZNAM KRATIC

ABS akrilonitril butadien stiren

ASC stromalne oziroma matične celice iz maščobnega tkiva (adipose-derived stromal/stem cells)

ATMP zdravilo za napredno zdravljenje (Advanced Therapy Medicinal Product)

BLDC brezkrtačni enosmerni motor (Brushless Direct Current motor)

BOPET biaksialno orientiran polietilen tereftalat

BPA bisfenol A

CAD računalniško podprto načrtovanje (Computer-Aided Design)

CFU kolonije tvoreče enote (Colony Forming Units)

DEHP di(2-etilheksil) ftalat

DOP dioktil ftalat

EtO etilenoksid

EVA etilen-vinil acetat

FDM modeliranje s taljenim nanašanjem materiala (Fused Deposition Modeling)

GMP dobra proizvodna praksa (Good Manufacturing Practice)

HDT temperatura upogiba pod obremenitvijo (Heat Deflection Temperature)

ISO Mednarodna organizacija za standardizacijo (International Organization for Standardization)

LDPE polietilen nizke gostote (Low-Density Polyethylene)

MJF Multi Jet Fusion

NP notranji premer

PA12 poliamid 12

PBMC mononuklearne celice periferne krvi (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PC polikarbonat

PES polietersulfon

PID proporcionalno-integralno-derivativna regulacija

PP polipropilen

PVC polivinilklorid

SMS netkana tekstilija v sestavi spunbond-meltblown-spunbond

SVF stromalna vaskularna frakcija

TFF tangencialna pretočna filtracija (Tangential Flow Filtration)

TNC skupno število jedrnih celic (Total Nucleated Cells)

TPE	termoplastični elastomer
USP	Farmakopeja Združenih držav Amerike (United States Pharmacopeia)
ZP	zunanji premer

1 UVOD

Sodobna biotehnologija in medicina vse pogosteje stremita k avtomatizaciji postopkov, ki so bili tradicionalno vezani na ročno delo laboratorijskega osebja. Prehod od ročnih k avtomatiziranim in zaprtim sistemom prinaša večjo ponovljivost postopkov, zmanjšano tveganje kontaminacije ter manjšo odvisnost od spretnosti in izkušenosti posameznega izvajalca. Tovrsten razvoj je še posebej pomemben na področjih, kjer se obravnavajo biološki vzorci, saj vsak ročni poseg predstavlja potencialno tveganje za sterilnost in kakovost končnega produkta.

Eno izmed takih področij je tudi izolacija stromalne vaskularne frakcije (SVF) iz maščobnega tkiva, ki se v regenerativni medicini uporablja zaradi vsebnosti heterogene populacije celic s terapevtskim potencialom. Klasični postopki izolacije so pogosto ročni, časovno zahtevni in vključujejo več ločenih korakov ter komponent, kar povečuje možnost napak in zmanjšuje ponovljivost rezultatov. Razvoj zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo predstavlja enega izmed pristopov k reševanju teh izzivov, saj združuje posamezne procesne korake v nadzorovano in avtomatizirano celoto ter zmanjšuje potrebo po ročnih posegih uporabnika.

Razvoj tovrstnega sistema je zahteven, saj mora hkrati zagotavljati ustrezno mehansko zasnovo, tesnjenje, biokompatibilnost materialov, nadzorovan pretok tekočin in enostavno uporabo v praksi. Konstrukcijske rešitve pri tem niso nastajale ločeno od eksperimentalnega dela, temveč so se oblikovale vzporedno s testiranjem in prilagajanjem na podlagi sprotnih opažanj, kar je narekovalo iterativen pristop k razvoju.

Diplomsko delo se osredotoča na strojniški, konstrukcijski, materialni in fluidni vidik razvoja takega sistema, torej na zasnovo kartuše za enkratno uporabo, izbiro komponent ter mehaniko tekočin znotraj zaprtega sistema. V nadaljevanju so predstavljeni strokovno področje in opredelitev raziskovalnega problema, namen in cilji diplomskega dela, raziskovalna vprašanja in hipoteze ter predpostavke, omejitve in uporabljene raziskovalne metode.

1.1 Opis področja in opredelitev problema

Izolacija stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva se v praksi običajno izvaja ročno, s pomočjo encimske obdelave, spiranja in centrifugiranja vzorca. Tak postopek je dobro uveljavljen in obvladljiv, vendar zahteva vrsto ločenih ročnih korakov, uporabo več različnih

posod in orodij ter neposreden stik izvajalca z vzorcem, kar povečuje možnost kontaminacije in zmanjšuje ponovljivost med posameznimi izvedbami (Oberbauer in drugi, 2015).

Raziskovalni problem diplomskega dela izhaja iz potrebe po pretvorbi tega uveljavljenega ročnega postopka v avtomatiziran proces, ki bi potekal znotraj zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo. Pri tem zasnova ni izhajala iz povsem prazne osnove, temveč je bilo treba rešitev prilagoditi in vgraditi v že obstoječo avtomatizirano napravo, ki je bila prvotno zasnovana za sorodne, a drugačne separacijske postopke. Izhodiščna zasnova naprave, ki je temeljila na brizgah in razdelilnih kolektorjih, ni v celoti ustrezala zahtevam postopka izolacije SVF, zato je bil potreben prehod na sistem s peristaltičnimi črpalkami ter prilagoditev kartuše tem novim pogojem delovanja.

Osrednji izziv je torej dvojen: na eni strani zasnovati fluidni sistem in kartušo, ki bosta omogočila nadzorovano, ponovljivo in uporabniku prijazno izvedbo izolacije SVF, na drugi strani pa to zasnovo uskladiti z mehanskimi in prostorskimi omejitvami že obstoječe naprave, v katero mora biti vgrajen sistem.

1.2 Namen in cilji diplomskega dela

Namen diplomskega dela je predstaviti razvoj in tehnično ovrednotenje zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo, namenjenega avtomatizirani izolaciji stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva, s poudarkom na povezavi med konstrukcijskimi rešitvami in eksperimentalnimi ugotovitvami. Elektronski sklopi, krmilna plošča in zunanji plastični deli naprave pri tem niso predmet podrobne obravnave, temveč so obravnavani le kot podporni elementi celotnega sistema.

Cilj diplomskega dela je pripraviti tehnično utemeljeno zasnovo zaprtega fluidnega sistema, predstaviti razvoj kartuše za enkratno uporabo in pripadajočih komponent ter utemeljiti izbiro materialov, cevk, konektorjev, črpalk, ventilov in grelnih elementov. Cilj je tudi opisati postopek izdelave in uporabe modelov, izdelanih z računalniško podprtim načrtovanjem (CAD), pri razvoju kartuše ter preveriti, kako posamezne konstrukcijske in procesne odločitve vplivajo na delovanje, tesnjenje in uporabnost sistema. Poseben poudarek je namenjen mehaniki tekočin znotraj sistema, saj hitrost pretoka, geometrija kartuše in način pretakanja maščobnega tkiva neposredno vplivajo na obremenitev celic in posledično na učinkovitost izolacije. Dodaten cilj je zato ovrednotiti te vplive v primerjavi s kontrolnim postopkom

centrifugiranja ter ugotoviti, ali razvita zasnova omogoča bolj nadzorovan, ponovljiv in uporabniku prijaznejši potek dela.

1.3 Raziskovalna vprašanja in hipoteze

Na podlagi opredeljenega raziskovalnega problema in zastavljenih ciljev so bila oblikovana naslednja raziskovalna vprašanja:

1. Kako zasnovati zaprt fluidni sistem s kartušo za enkratno uporabo, ki omogoča nadzorovan potek izolacije stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva?
2. Kako izbira materialov, cevk, konektorjev, ventilov, črpalk in grelnih elementov vpliva na delovanje, tesnjenje in uporabnost sistema?
3. Kako je CAD-modeliranje pripomoglo k razvoju in optimizaciji konstrukcijske zasnove kartuše za zaprt fluidni sistem?
4. Kako iterativni razvoj in uporaba umetne inteligence kot podpornega orodja pri analizi razvojnih opažanj vplivata na optimizacijo sistema in končne rezultate postopka?
5. Kako hitrost pretoka, geometrija kartuše in način pretakanja maščobnega tkiva vplivajo na obremenitev celic ter učinkovitost izolacije stromalne vaskularne frakcije v primerjavi s centrifugiranjem?

Na osnovi raziskovalnih vprašanj so bile postavljene naslednje hipoteze:

H1: Zasnova zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo omogoča nadzorovan potek izolacije stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva z manj ročnimi posegi v primerjavi s klasičnim ročnim postopkom.

H2: Ustrezna izbira materialov, cevk, konektorjev, ventilov in tesnilnih mest vpliva na zanesljivo delovanje sistema, saj zmanjšuje možnost puščanja, nepravilnega pretoka in težav pri uporabi kartuše.

H3: Izbira črpalk in nastavitev pretočnih parametrov pomembno vplivata na enakomerno pretakanje vzorca skozi sistem ter na ponovljivost posameznih procesnih korakov.

H4: Uporaba CAD-modeliranja omogoča hitrejši razvoj in optimizacijo konstrukcijske zasnove kartuše, saj omogoča preverjanje geometrije, postavitve komponent, povezovalnih mest in možnosti sestavljanja že pred izdelavo prototipa.

H5: Geometrija kartuše, hitrost pretoka in način pretakanja maščobnega tkiva vplivajo na obremenitev celic ter rezultate izolacije stromalne vaskularne frakcije.

H6: Iterativni razvoj, pri katerem se konstrukcijske in procesne rešitve prilagajajo na podlagi eksperimentalnih opažanj, omogoča izboljšanje delovanja sistema v primerjavi z nespremenjeno začetno zasnovo.

H7 – dodatna hipoteza: Uporaba umetne inteligence kot podpornega orodja pri analizi razvojnih opažanj, primerjavi konstrukcijskih rešitev in interpretaciji rezultatov lahko prispeva k hitrejši optimizaciji zaprtega fluidnega sistema.

1.4 Predpostavke in omejitve diplomskega dela

Pri izdelavi diplomskega dela izhajamo iz naslednjih predpostavk. Predpostavlja se, da predstavlja testiranje na realnem lipoaspiratu ustrezno osnovo za ovrednotenje delovanja sistema, saj gre za dejanski vzorec, kakršen se uporablja tudi v praktični uporabi naprave. Prav tako se predpostavlja, da kontrolni postopek centrifugiranja, izveden vzporedno iz istega vzorca lipoaspirata v enakem časovnem okviru kot testiranje zaprtega sistema, omogoča metodološko ustrezno in neposredno primerjavo rezultatov obeh postopkov. Ogrodje naprave, zunanji plastični deli in električni del pri tem predstavljajo dani konstrukcijski okvir, saj so bili v pretežni meri razviti zunaj obravnavanega diplomskega dela. Krmilna programska oprema in logika delovanja naprave sta bili prav tako prvotno oddani v zunanjo izdelavo, a sta se v nadaljevanju razvoja v veliki meri spremenili; v diplomskem delu se kljub temu obravnavata le kot podporni element in nista predmet lastne tehnične obravnave.

Diplomsko delo ima tudi nekatere omejitve. Ker je lipoaspirat biološki material, se njegova sestava in lastnosti lahko razlikujejo med posameznimi vzorci, kar lahko vpliva na ponovljivost rezultatov med različnimi testiranji in omejuje splošno posplošljivost ugotovitev na vse mogoče vzorce tkiva. Nadaljnja omejitev izhaja iz zahteve, da mora biti razvita kartuša skladna z mehanskimi in prostorskimi zahtevami že obstoječe avtomatizirane naprave, v katero je vgrajena, kar je omejevalo nabor možnih konstrukcijskih rešitev. Rezultati eksperimentalnega testiranja se poleg tega nanašajo na uporabljene komponente, materiale in procesne parametre, zato niso nujno neposredno prenosljivi na sisteme z drugačnimi tehničnimi specifikacijami.

1.5 Uporabljene raziskovalne metode

Delo je potekalo po korakih, pri čemer so bili rezultati posamezne faze podlaga za naslednjo, po potrebi pa so bile predhodne odločitve tudi znova preverjene in dopolnjene glede na sprotne ugotovitve.

Na začetku je bil izveden pregled strokovne literature s področja izolacije stromalne vaskularne frakcije, zaprtih fluidnih sistemov, mehanike tekočin ter materialov, primernih za stik z biološkimi vzorci. Na podlagi pregleda literature in zahtev postopka je bila pripravljena analiza procesa izolacije, s katero so bili opredeljeni posamezni koraki postopka, zahtevane poti tekočin ter zahteve za tesnjenje, ogrevanje in enostavno uporabo sistema.

V razvojni fazi je bila uporabljena metoda konstrukcijskega načrtovanja in CAD-modeliranja, s katero so bili izdelani modeli kartuše in posameznih mehanskih delov ter preverjene geometrija, postavitev priključkov in možnost montaže še pred izdelavo fizičnega prototipa. Za izbiro komponent (cevi, konektorji, ventili, črpalke, grelni elementi) je bila uporabljena primerjalna tehnična analiza, pri kateri so bile možne rešitve ovrednotene glede na zahteve procesa, dimenzije, pretok, temperaturo, biokompatibilnost in možnost izdelave prototipa.

Delovanje sistema je bilo nato preverjeno z eksperimentalnim testiranjem na realnem lipoaspiratu, pri čemer so bili spremljani pretok tekočin, morebitno puščanje, zastajanje tekočin v kartuši ter splošna uporabnost sistema. Rezultati testiranja so bili primerjani s kontrolnim postopkom centrifugiranja, izvedenim vzporedno iz istega vzorca. Pri urejanju in interpretaciji razvojnih opažanj ter primerjavi konstrukcijskih rešitev je bila kot podporno orodje uporabljena tudi umetna inteligenca.

2 STROMALNA VASKULARNA FRAKCIJA IN IZHODIŠČA IZOLACIJE IZ MAŠČOBNEGA TKIVA

2.1 Opredelitev stromalne vaskularne frakcije

Stromalna vaskularna frakcija (SVF) je heterogena populacija celic, ki jo pridobimo iz maščobnega tkiva po odstranitvi zrelih adipocitov. Vsebuje mešanico različnih celičnih tipov: mezenhimske stromalne oziroma matične celice iz maščobnega tkiva (ASC), endotelijske celice in njihove predniki, pericite ter celice imunskega sistema, kot so makrofagi in limfociti (Bourin in drugi, 2013). ASC znotraj te mešanice dejansko predstavljajo matične celice, saj so multipotentne in se lahko diferencirajo v različne celične linije, kar jim daje osrednjo vlogo pri regenerativnem potencialu SVF (Zinger in drugi, 2024).

V naravnem stanju so celice, ki sestavljajo SVF, ujete znotraj kolagenske in druge zunajcelične matrice maščobnega tkiva, ki jih mehansko povezuje v strukturo tkiva. Da bi celice lahko izolirali, jih je treba iz te matrice sprostiti, kar se v ustaljenem postopku doseže z encimsko razgradnjo tkiva, sledita pa še spiranje in koncentriranje sproščenih celic (Oberbauer in drugi, 2015).

Čeprav je pri terapevtski uporabi v ospredju predvsem populacija ASC, se v praksi vedno izolira celotna SVF, saj ločevanje ASC od preostalih celičnih tipov ni potrebno niti ni smiselno pred nadaljnjo uporabo. Prisotnost drugih celic, kot so endotelijske celice in pericite, namreč ni izkazana kot negativen dejavnik, temveč lahko k regenerativnemu učinku prispeva tudi posredno, na primer s spodbujanjem angiogeneze (Dykstra in drugi, 2017). Tako izolirana SVF ostaja uporaben produkt kot celota, ne glede na to, da je osrednji cilj izolacije predvsem pridobitev ASC (Zinger in drugi, 2024).

SVF se zaradi svoje dostopnosti in enostavne pridobitve iz maščobnega tkiva vse pogosteje uporablja v regenerativni medicini, kjer se celice iz SVF uporabljajo pri zdravljenju različnih degenerativnih in poškodovanih tkiv, na primer pri regeneraciji kosti pri osteonekrozi kolka ter hrustanca pri osteoartritisu kolena (Pak, 2011).

2.2 Maščobno tkivo kot izhodiščni vzorec

Izhodiščni vzorec za izolacijo stromalne vaskularne frakcije predstavlja maščobno tkivo, pridobljeno z liposukcijo. Tako pridobljen lipoaspirat ni čisto maščobno tkivo, temveč zmes maščobnih delcev, krvi, tekočine in olja, ki nastane zaradi razpada dela adipocitov med samim postopkom odvzema (Zalazar in drugi, 2025). Del te tekočine se od maščobnega tkiva loči že med samo liposukcijo z dekantiranjem, tako da se za nadaljnjo obdelavo uporabi le tisti del vzorca, ki je za postopek izolacije dejansko potreben.

Sestava in količina pridobljenega vzorca se med posameznimi odvzemi razlikujeta, saj na izkoristek in lastnosti celic v maščobnem tkivu vplivajo dejavniki, kot so starost, spol, indeks telesne mase ter mesto odvzema tkiva (Hahn in drugi, 2026). Ta variabilnost predstavlja enega od razlogov, da je treba zaprt fluidni sistem zasnovati tako, da zanesljivo deluje kljub razlikam med posameznimi vzorci lipoaspirata.

2.3 Postopek manualne izolacije stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva

V laboratoriju se manualni (ročni) postopek izolacije SVF izvaja kot kontrolni postopek, vzporedno z avtomatiziranim postopkom v zaprtem sistemu. Vzorec lipoaspirata se pred začetkom obeh postopkov premeša in razdeli v dve enaki količini, tako da se avtomatizirani in manualni postopek izvajata iz istega izhodiščnega vzorca in v enakem časovnem okviru, kar omogoča neposredno primerjavo rezultatov.

Manualni postopek izolacije poteka po naslednjih korakih:

1. Za manualni del vzorca se lipoaspirat najprej redči oziroma spere z Ringerjevo raztopino, s čimer se odstranijo ostanki tumescentne tekočine in krvi.
2. Pripravljenemu vzorcu se doda raztopina kolagenaze, ki encimsko razgradi zunajcelično matrico maščobnega tkiva in sprosti celice, ujete znotraj nje.
3. Mešanica se inkubira pri temperaturi 37 °C, kar predstavlja temperaturni optimum za delovanje kolagenaze in je skladno tudi s splošno uveljavljenimi protokoli izolacije SVF, pri katerih encimska obdelava običajno traja od 30 minut do dveh ur (Aronowitz in drugi, 2015).

4. Po končani encimski obdelavi se doda dodatna količina Ringerjeve raztopine, ki zaustavi delovanje encima in razredči mešanico pred centrifugiranjem.
5. Vzorec se nato centrifugira v več zaporednih ciklih izmenjujočega se centrifugiranja in spiranja, s čimer se odstranijo ostanki olja, encima in netopnih delcev tkiva ter koncentrira celična frakcija (Zinger in drugi, 2024).
6. Po zadnjem ciklu centrifugiranja se supernatant odstrani, preostali celični pelet pa se resuspendira, s čimer se pridobi končni produkt manualne izolacije, torej SVF, ki služi kot kontrolni vzorec za primerjavo z rezultati avtomatiziranega postopka.

Celoten manualni postopek, vključno s pripravo vzorca, encimsko obdelavo in centrifugiranjem, je razmeroma dolgotrajen, kar je ena od pogosto izpostavljenih pomanjkljivosti ročne izolacije SVF v primerjavi z avtomatiziranimi sistemi (Cremona in drugi, 2025).

2.4 Vloga encimske obdelave, spiranja in koncentriranja celic pri izolaciji SVF

Celice, ki sestavljajo SVF, so v maščobnem tkivu ujete znotraj kolagenske in druge zunajcelične matrice, zato jih je treba iz te matrice sprostiti. Najpogosteje uporabljena metoda za to je encimska obdelava s kolagenazo, ki razgradi vezivne beljakovine zunajcelične matrice, s čimer sprosti celice, ne da bi pri tem poškodovala njihovo celično membrano (Cremona in drugi, 2025).

Po končani encimski obdelavi je nujen korak spiranja vzorca, ki ima dve pomembni vlogi. Prva je odstranitev preostalega encima iz končnega produkta, saj lahko ostanki kolagenaze v celični suspenziji predstavljajo tveganje za citotoksičnost oziroma neželen imunski odziv, če se izolirane celice kasneje uporabijo terapevtsko (Zinger in drugi, 2024). Druga vloga spiranja je odstranitev olja, ostankov razpadlih adipocitov in drugih nečistoč, ki nastanejo med encimsko razgradnjo tkiva in bi lahko ovirale nadaljnjo uporabo ali analizo izolirane celične frakcije.

Po spiranju sledi koncentriranje celic, katerega namen je zmanjšati volumen končnega produkta in doseči zadostno gostoto celic za praktično uporabo, saj je surova celična suspenzija po encimski obdelavi in spiranju običajno prevelikega volumna in premajhne koncentracije za neposredno terapevtsko uporabo.

Poleg encimske obdelave se v literaturi omenjajo tudi neencimske, mehanske metode izolacije SVF, ki temeljijo na fizikalnih silah (npr. centrifugiranje, filtriranje, emulzifikacija) namesto na razgradnji z encimi. Take metode so praviloma hitrejše, cenejše in enostavnejše za izvedbo, vendar dosegajo nižji izkoristek celic in manjši delež progenitorskih celic v primerjavi z encimsko obdelavo (Aronowitz in drugi, 2015).

2.5 Centrifugiranje kot kontrolni postopek za primerjavo rezultatov

Centrifugiranje, kot del manualnega postopka izolacije, opisanega v prejšnjih dveh točkah, v tem diplomskem delu ne predstavlja le enega od korakov izolacije SVF, temveč služi kot kontrolni (referenčni) postopek, s katerim se ovrednotijo rezultati avtomatizirane izolacije v zaprtem fluidnem sistemu. Gre za uveljavljen in dobro poznan pristop, katerega delovanje in rezultati so v strokovni literaturi obsežno dokumentirani, kar omogoča smiselno primerjalno osnovo za oceno novo razvitega sistema.

Ker manualni in avtomatizirani postopek potekata vzporedno, iz istega vzorca lipoaspirata in v enakem časovnem okviru, so razlike v rezultatih med obema postopkoma posledica same metode izolacije, ne pa razlik v izhodiščnem vzorcu. Taka zasnova primerjave omogoča neposredno vrednotenje, ali zaprt fluidni sistem dosega primerljive ali boljše rezultate glede na uveljavljen ročni postopek.

Rezultati centrifugiranja se v nadaljevanju dela primerjajo z rezultati avtomatizirane izolacije predvsem z vidika izkoristka in kakovosti pridobljenih celic ter praktičnih vidikov izvedbe postopka, kot je čas, potreben za dokončanje izolacije, in obseg potrebnih ročnih posegov uporabnika. Podrobni rezultati te primerjave so predstavljeni v poglavju 11, ovrednotenje glede na zastavljene hipoteze pa v poglavju 12.

2.6 Tehnični izzivi pri avtomatizaciji izolacije SVF

Osrednji izziv pri prehodu iz ročnega v avtomatiziran postopek izolacije SVF izhaja iz regulatorne narave same izolirane celične frakcije. SVF se namreč uvršča med napredna zdravila za celično zdravljenje (ATMP – Advanced Therapy Medicinal Product), kar pomeni, da mora proces njene priprave izpolnjevati zahteve dobre proizvodne prakse (GMP) (Cremona in drugi, 2025). Klasičen ročni postopek poteka v odprtem sistemu, kjer je vzorec med posameznimi koraki (encimska obdelava, spiranje, centrifugiranje) izpostavljen okolju in zahteva več ločenih ročnih posegov izvajalca. Tak način dela je z regulatornega vidika

problematičen, saj odprt sistem pomeni večje tveganje za kontaminacijo, hkrati pa zahteva obsežnejšo dokumentacijo, validacijo posameznih korakov in nadzor nad celotnim postopkom, kar dodatno otežuje uporabo v klinični praksi (Cremona in drugi, 2025). Prehod na zaprt fluidni sistem, kjer vzorec med celotnim postopkom ne pride v stik z zunanjim okoljem, zato ni le tehnična, temveč tudi regulatorna zahteva.

Nadaljnji izziv predstavlja ohranjanje sterilnosti pri avtomatiziranem prenosu tekočin med posameznimi fazami postopka. Medtem ko lahko izvajalec pri ročnem postopku sterilnost zagotavlja s sprotnim nadzorom in prilagajanjem svojega dela, mora avtomatiziran sistem enak nivo sterilnosti doseči izključno s konstrukcijsko zasnovo, in sicer z ustreznim tesnjenjem, izbiro materialov in potekom poti tekočin, ne da bi bilo pri tem kadarkoli treba odpreti sistem.

Dodaten izziv izhaja iz variabilnosti vzorcev lipoaspirata, na katero smo opozorili že v prejšnjih poglavjih. Pri ročnem postopku lahko izvajalec potek dela sproti prilagaja glede na opažene lastnosti posameznega vzorca (na primer gostoto, vsebnost olja, količino tkiva), medtem ko mora avtomatiziran sistem zanesljivo delovati znotraj vnaprej določenih parametrov, ne glede na te razlike med vzorci, kar dodatno zahteva robustnost konstrukcijske zasnove.

Posebej pomemben izziv je tudi zagotavljanje, da mehansko rokovanje s tekočino in celicami, predvsem prek črpanja skozi cevke, ventile in druge komponente sistema, ne poškoduje celic oziroma ne zmanjša njihove vitalnosti. Ta vidik je podrobneje obravnavan v poglavjih 8 in 9, kjer je predstavljen vpliv mehanike tekočin na obremenitev celic med pretokom skozi zaprt sistem.

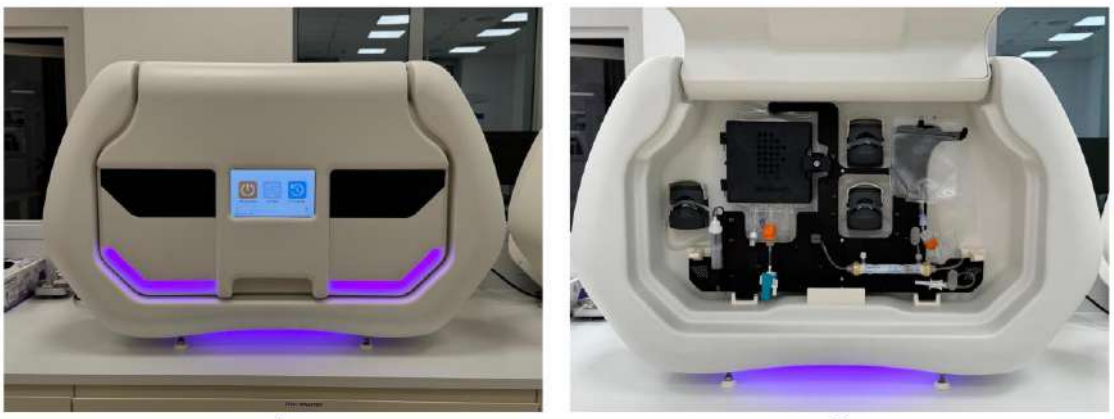
3 IZHODIŠČNA NAPRAVA IN RAZVOJNE ZAHTEVE ZA SISTEM

3.1 Namen in osnovni koncept naprave

Naprava, v katero je vgrajen v tem diplomskem delu obravnavani zaprt fluidni sistem, je namenjena avtomatizirani izolaciji stromalne vaskularne frakcije iz lipoaspirata, in sicer s kombinacijo mehanske obdelave in encimske razgradnje maščobnega tkiva. Osnovni koncept naprave temelji na ideji, da se postopek, ki se sicer izvaja ročno prek več ločenih korakov in komponent, izvede znotraj ene same, kompaktne enote, ki od uporabnika ne zahteva poglobljenega poznavanja posameznih procesnih korakov.

Naprava je zasnovana kot namizna enota z odpirajočim se pokrovom, pod katerim se nahaja notranji prostor za namestitev kartuše za enkratno uporabo ter pripadajočih komponent, potrebnih za izvedbo postopka, med njimi črpalk, grelnega elementa in servo motorjev. Upravljanje poteka prek zaslonskega vmesnika, ki uporabnika vodi skozi posamezne korake namestitve kartuše in izvedbe postopka ter omogoča vpogled v zgodovino izvedenih ciklov.

Naprava omogoča izbiro med tremi vnaprej programiranimi cikli izolacije, prilagojenimi različnim volumnom vzorca (40 ml, 100 ml in 120 ml), kar uporabniku omogoča prilagoditev postopka glede na razpoložljivo količino lipoaspirata. Po namestitvi kartuše in vnosu ustreznega volumna vzorca naprava samostojno izvede vse nadaljnje procesne korake, od premikanja tekočin prek encimske obdelave in ogrevanja do končnega koncentriranja izolirane celične frakcije, brez potrebe po nadaljnjem ročnem posredovanju uporabnika.



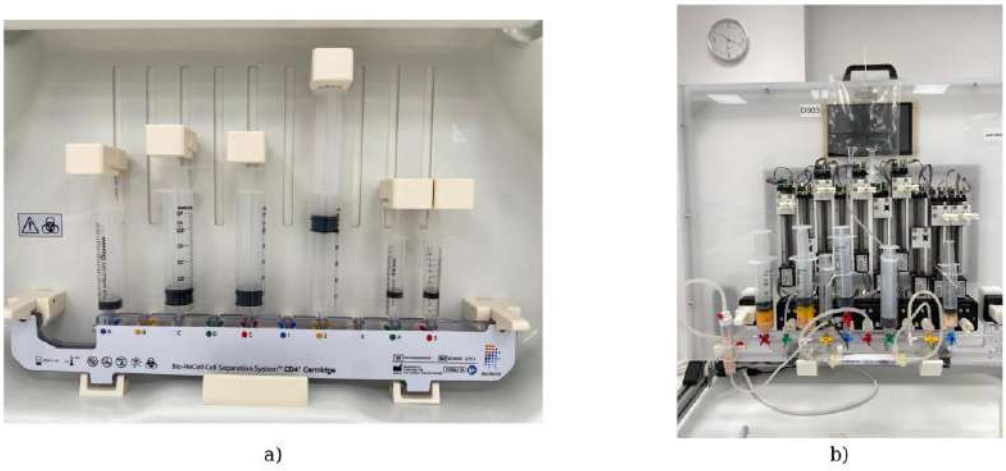
Slika 1: Naprava za avtomatizirano izolacijo SVF: (a) z zaprtim pokrovom; (b) z odprtim pokrovom in vstavljeno kartušo
Vir: (Lastni vir)

3.2 Izhodiščna zasnova naprave za separacijske postopke

Naprava, v katero je bil kasneje vgrajen zaprt fluidni sistem za izolacijo SVF, je bila prvotno zasnovana za separacijo celic iz drugih vrst vzorcev, na primer ločevanje T-celic iz mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC) ali iz afereznih produktov. Premikanje tekočin je pri tej izhodiščni zasnovi temeljilo na sistemu brizg, ne na peristaltičnih črpalkah.

Fluidni del naprave je vseboval dva razdelilna kolektorja, na katerih je bilo skupno osem priključkov za brizge (dva priključka sta ostala nezasedena), pri čemer so bile brizge vnaprej napolnjene z ustreznimi reagenti in so se med seboj razlikovale po volumnu, od 10 do 50 mL. Premikanje tekočine iz posamezne brizge je omogočal koračni motor s pritrjenim aluminijastim vretenom, ki je prek nosilca, pritrjenega na bat brizge, ta bat vlekel navzgor (ustvarjanje podtlaka) ali potiskal navzdol (ustvarjanje pritiska), odvisno od smeri vrtenja motorja. Preklapljanje med posameznimi potmi tekočine je potekalo prek servo motorjev, ki so obračali ventile na razdelilnih kolektorjih, kar je princip, ki se v enaki obliki uporablja tudi v trenutni zasnovi sistema.

Od celotne izhodiščne fluidne zasnove sta se v razvoju sistema za izolacijo SVF ohranila zgolj razdelilna kolektorja s pripadajočimi servo motorji za upravljanje ventilov, medtem ko je bil sistem brizg in koračnih motorjev v celoti opuščen in nadomeščen s peristaltičnimi črpalkami, kot je podrobneje opisano v naslednjih točkah tega poglavja.



a) b)

Slika 2: Izhodiščna zasnova sistema: (a) kartuša z brizgami in razdelilnima kolektorjema; (b) naprava s pogoni za premikanje batov brizg
Vir: (Lastni vir)

3.3 Omejitve začetne zasnove z brizgami in razdelilnimi kolektorji

Izhodiščna zasnova s sistemom brizg se je pri prilagoditvi na postopek izolacije SVF izkazala za neustrezno iz več med seboj povezanih razlogov.

Prvi in temeljni razlog je bil regulatorne narave. Bat brizge namreč predstavlja drsečo tesnilko, ki je med gibanjem izpostavljena okolju, kar v zaprtih aseptičnih sistemih velja za eno ključnih tveganih mest za vdor mikroorganizmov; zato se pri načrtovanju zaprtih sistemov za celične terapije nezaščitenim drsečim tesnilkam, kot je bat brizge, praviloma izogiba (Hampson, 2014).

Nadaljnji sklop težav je izhajal iz same konstrukcije brizg. Gumeni bat brizge je z večkratnim ponavljajočim se gibanjem gor in dol postopoma izgubljal svoje lastnosti, kar je oteževalo njegovo premikanje in posledično zahtevalo večje sile pri potiskanju. Te povečane sile so občasno povzročile lom plastičnega ohišja brizge. Poleg tega se je gumeni bat, ki je bil na plastično telo le nataknjen in ne trajno pritrjen, pri ponavljajočem se premikanju večkrat odstranil od plastičnega dela in ostal znotraj brizge, prav tako pa je obraba gume zmanjšala njeno tesnilno funkcijo, kar je povzročilo uhajanje tekočine mimo bata.



Slika 3: Primer odstopanja gumijastega bata od plastičnega dela brizge med ponavljajočim se gibanjem
Vir: (Lastni vir)

Omejitev je predstavljala tudi geometrija priključkov brizg, katerih notranji premer je znašal približno 2 mm, kar je bilo premalo za prehod večjih koščkov lipoaspirata in je povzročalo

zamašitve. Dodatno je bil volumen posamezne brizge omejen na največ 50 mL, kar je omejevalo največjo količino tekočine, ki jo je bilo mogoče premikati naenkrat, število priključkov na razdelilnih kolektorjih pa je bilo premajhno za vse tekočinske poti, ki jih zahteva postopek izolacije SVF.

Ponavljajoče se gibanje bata je celice v vzorcu izpostavljalo večjim strižnim silam, kar je negativno vplivalo na njihovo vitalnost. Poleg tega bi morala biti za ogrevanje tekočine med mešanjem med brizgami razvita posebej prilagojena rešitev ogrevanja, kar bi dodatno povečalo kompleksnost sistema.

Zaradi naštetih razlogov, predvsem regulatorne neustreznosti drsečih tesnilk brizg, zanesljivostnih težav pri tesnjenju in obrabi ter omejitev pri volumnu in premeru priključkov, je bil sistem brizg opuščen in nadomeščen s peristaltičnimi črpalkami in cevkami.



Slika 4: Pogoni batov brizg z aluminijastimi vreteni in koračnimi motorji v izhodiščni zasnovi naprave
Vir: (Lastni vir)



Slika 5: Preizkusna rešitev ogrevanja vzorca pri zasnovi z brizgami
Vir: (Lastni vir)

3.4 Razlogi za prilagoditev sistema postopku izolacije SVF

Odločitev o prilagoditvi obstoječe naprave, prvotno namenjene separaciji celic iz mononuklearnih celic periferne krvi oziroma afereznih produktov, za potrebe izolacije SVF iz maščobnega tkiva, je izhajala iz poslovne usmeritve podjetja, ki je narekovala razvoj delujoče naprave za avtomatizirano izolacijo SVF na osnovi že obstoječe strojne platforme, namesto razvoja povsem nove naprave. Taka usmeritev je pomenila, da je bilo treba ohraniti čim več uporabnih delov izhodiščne zasnove, hkrati pa jo temeljito prilagoditi novemu namenu.

Prilagoditev ni bila potrebna le zaradi narave novega vzorca, saj se lipoaspirat od krvnih produktov razlikuje po viskoznosti, vsebnosti večjih delcev tkiva in potrebi po encimski obdelavi, temveč predvsem zato, ker izhodiščna zasnova s sistemom brizg ni omogočala izvedbe postopka znotraj zaprtega, regulatorno ustreznega sistema, kot je podrobneje opisano v prejšnji točki.

Na podlagi ugotovljenih omejitev je bila sprejeta odločitev o zamenjavi sistema brizg s peristaltičnimi črpalkami in prilagodljivimi cevkami. Taka rešitev je bila izbrana predvsem zato, ker je peristaltična črpalka ena redkih vrst črpalk, pri katerih je tekočina v celoti izolirana od gibljivih delov mehanizma, saj se tekočina premika izključno s stiskanjem zunanje stene cevke, sam mehanizem pa z njo nikoli ni v neposrednem stiku (Ferretti in drugi, 2023). S tem je odpravljeno tveganje, povezano z drsečimi tesnili, ki je bilo pri brizgah ključna regulatorna in zanesljivostna pomanjkljivost. Peristaltične črpalke poleg tega ne omejujejo volumna

tekočine na vnaprej določeno količino, kot je to veljalo za brizge, temveč omogočajo poljubno dolgo in kontinuirano premikanje tekočine, kar je potrebno za korake, kot je mešanje maščobnega tkiva med dvema vrečkama.

Zamenjava sistema premikanja tekočine je posledično zahtevala tudi prilagoditev preostalih delov fluidnega sistema in same kartuše, saj je bilo treba razdelilna kolektorja, ki sta bila prvotno zasnovana za priklop brizg, znova povezati s cevkami in novimi tekočinskimi potmi, prilagojenimi zahtevam postopka izolacije SVF.

3.5 Prehod iz sistema z brizgami na sistem s peristaltičnimi črpalkami

Pri prehodu na nov način premikanja tekočine so bile brizge nadomeščene s cevkami, ki so se na priključek razdelilnega kolektorja pritrdile prek nazobčanega nastavka, prilagojenega na luer konektor, saj je bil priključek na kolektorju prvotno zasnovan za neposreden priklop brizge z malim luer nastavkom v svojem ohišju. S tem je bilo mogoče obstoječe priključke na razdelilnih kolektorjih ohraniti, ne da bi jih bilo treba konstrukcijsko spreminjati.

Koračni motorji z aluminijastimi vreteni, ki so prej poganjali bate brizg, so bili v celoti odstranjeni in nadomeščeni s peristaltičnimi črpalkami. Namestitev črpalk je bila pri tem delno omejena z obstoječim ogrodjem naprave, saj je bilo to prvotno prilagojeno za povsem drugačno vrsto motorjev, zato je bilo treba položaj črpalk znotraj naprave prilagoditi razpoložljivemu prostoru.

Prehod na nov sistem je potekal postopno. Sprva je bila sprememba načrtovana zgolj za korak mešanja maščobnega tkiva med dvema vrečkama, kjer se je potreba po zamenjavi pokazala kot najbolj nujna, vendar se je v nadaljevanju izkazalo, da je smiselno v celoti zamenjati sistem brizg s peristaltičnimi črpalkami. Ko je bila sprejeta odločitev o popolni opustitvi brizg, je bila nova zasnova od začetka načrtovana s tremi peristaltičnimi črpalkami.

Razdelilna kolektorja sta po prehodu ohranila enako funkcijo kot pri izhodiščni zasnovi, torej usmerjanje pretoka tekočine med posameznimi potmi prek servo motorjev in ventilov, le da tekočino skoznju sedaj namesto brizg poganjajo peristaltične črpalke.

3.6 Zahteve za zaprt sistem, uporabnost, ponovljivost in zmanjšanje tveganja kontaminacije

Poleg zahtev, ki izhajajo iz same narave postopka izolacije SVF, mora prilagojen sistem izpolnjevati tudi vrsto splošnejših zahtev, vezanih na uporabo znotraj obstoječe naprave.

Ena od temeljnih zahtev je kompatibilnost kartuše z napravo, in sicer tako z vidika pozicijske skladnosti kot tudi z vidika ustreznih standardov za medicinske pripomočke. Kartuša mora biti zasnovana tako, da se njeni priključki, cevke in vrečke natančno ujemajo z razporeditvijo črpalk in servo motorjev znotraj naprave, hkrati pa mora njena zasnova ustrezati zahtevam standarda ISO 13485 Mednarodne organizacije za standardizacijo (ISO), ki opredeljuje sistem vodenja kakovosti za medicinske pripomočke (International Organization for Standardization, 2016), standarda ISO 14971, ki opredeljuje postopek obvladovanja tveganja pri medicinskih pripomočkih (International Organization for Standardization, 2019), ter standarda ISO 10993-1, ki opredeljuje zahteve za biološko vrednotenje medicinskih pripomočkov znotraj procesa obvladovanja tveganja (International Organization for Standardization, 2025). Podrobnejši opis, kako je bila zahteva po kompatibilnosti izpolnjena pri dejanski konstrukciji kartuše, je predstavljen v poglavju 5.

Naslednja zahteva se nanaša na uporabnost sistema. Ker napravo upravljajo uporabniki, ki jim ni treba poznati tehničnega ozadja postopka izolacije, mora biti uporaba enostavna in intuitivna, saj morajo biti namestitev kartuše, izbira cikla in zagon postopka izvedljivi z minimalnim številom jasno vodenih korakov.

Pomembna je tudi ponovljivost sistema, ki jo je treba zagotoviti na dveh ravneh. Prva je ponovljivost med posameznimi cikli izvedbe na isti napravi, kjer mora vsak cikel, ne glede na to, kolikokrat je bil izveden, dati primerljive rezultate. Druga raven je ponovljivost med posameznimi kartušami za enkratno uporabo, pri čemer mora biti vsaka izdelana kartuša dovolj konsistentna, da ne povzroča odstopanj v delovanju sistema.

Zadnja, a nič manj pomembna zahteva, je zmanjšanje tveganja kontaminacije, ki smo ga v okviru zaprtosti sistema in ustreznosti regulativi že obravnavali v prejšnjih točkah. Poleg tega dodatno zaščito pred navzkrižno kontaminacijo prinaša tudi sama zasnova kartuše kot komponente za enkratno uporabo, saj se v avtologni celičnih terapijah, kjer vsak vzorec pripada enemu samemu pacientu, tveganje prenosa med posameznimi vzorci prek večkrat uporabljene opreme s tem v celoti izloči (Budde in Jurkiewicz, 2021).

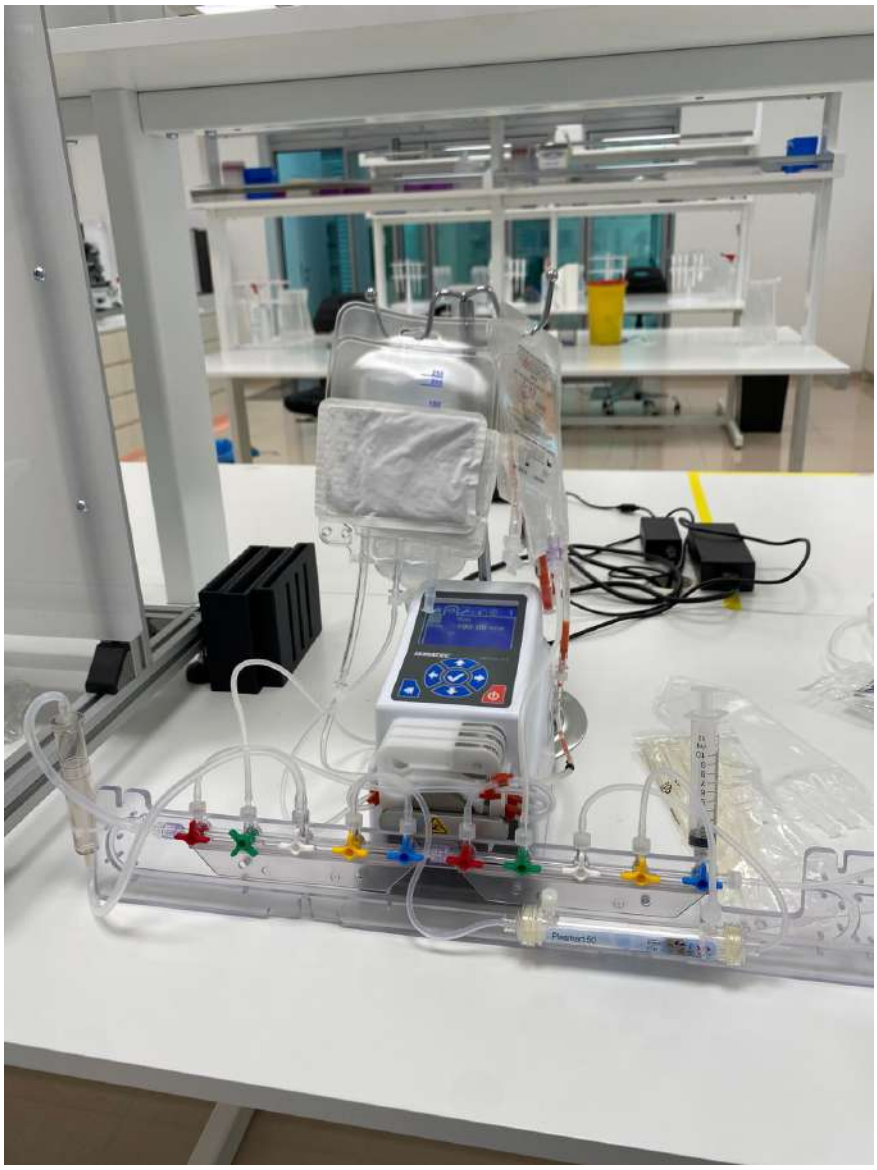
3.7 Omejitve razvoja prve funkcionalne različice sistema

Prva funkcionalna različica sistema, izdelana neposredno po prehodu s sistema brizg na peristaltične črpalke, je nastala, še preden so bile dokončno izbrane ustrezne črpalke, cevke in druge komponente za nadaljnjo uporabo. Prav tako v tej fazi še ni obstajala krmilna programska

oprema za avtomatizirano vodenje procesa, zato je bilo preklapljanje ventilov izvedeno ročno, brez programske podpore.

Premikanje tekočine je v tej razvojni fazi zagotavljala peristaltična črpalka s tremi ločenimi kanali, pri čemer je vsak kanal vseboval šest valjčkov. Največja dosežena pretočna zmogljivost črpalke je znašala 30 mL na minuto, kar je bistveno manj od pretoka, doseženega v kasnejših, dokončnih različicah sistema, opisanih v nadaljnjih poglavjih. Ogrevanje vzorca na temperaturo 37 stopinj Celzija v tej fazi razvoja prav tako še ni bilo integrirano v napravo, temveč je potekalo zunanje, s pomočjo grelnih obližev, ki delujejo na osnovi eksotermne kemične reakcije ob izpostavitvi zraku in prav tako še niso predstavljali dokončno izbrane komponente sistema.

Kljub navedenim omejitvam so že prvi rezultati testiranja s peristaltično črpalko pokazali manj tehničnih težav v primerjavi s predhodnim sistemom z brizgami, kar je dodatno potrdilo ustreznost odločitve, da naj premikanje tekočine v nadaljnjem razvoju sistema v celoti prevzamejo peristaltične črpalke. Podrobnejši opis nadaljnjega konstrukcijskega razvoja kartuše, izbire ustreznih komponent in avtomatizacije procesa je predstavljen v naslednjih poglavjih diplomskega dela.



Slika 6: Zgodnja preizkusna postavitev sistema po prehodu na peristaltično črpanje
Vir: (Lastni vir)

4 ZASNOVA ZAPRTEGA FLUIDNEGA SISTEMA

4.1 Splošna arhitektura fluidnega sistema

Fluidni sistem znotraj kartuše sestavljajo dva razdelilna kolektorja z desetimi ventili, tri peristaltične črpalke, dve vrečki za mešanje maščobnega tkiva, dodatne manjše vrečke za zunanje reagente in končni produkt, kapalna komora ter modul z votlimi vlakni, med seboj povezani s cevkami.

Mešanje maščobnega tkiva poteka med dvema vrečkama s prostornino 250 mL, ki ju v nadaljevanju imenujemo vrečka A in vrečka B. Vrečka A ima tri priključke v uporabi, in sicer priključek za vnos lipoaspirata, priključek za vnos encima ali Ringerjeve raztopine, odvisno od tega, ali gre za mehansko ali encimsko izolacijo, ter priključek, povezan s cevko na vrečko B. Vrečka B ima prav tako tri priključke, od katerih je eden nezaseden, drugi povezan prek cevke na ventil na prvem razdelilnem kolektorju, tretji pa je, enako kot pri vrečki A, namenjen medsebojni povezavi obeh vrečk. Cevka, ki povezuje vrečki A in B, poteka skozi eno od treh peristaltičnih črpalk, kar omogoča kontrolirano premikanje tekočine med njima med fazo mešanja.

Prvi razdelilni kolektor obsega ventile, oštevilčene od 0 do 4. Zgornji del kapalne komore je povezan z levim robnim priključkom prvega razdelilnega kolektorja. Ventil 0, ki je prvi v verigi ventilov na tem kolektorju, ima poleg tega svoj lasten zgornji priključek, ki prek druge peristaltične črpalke vodi do vrečke B. Ventil 1 je povezan z vrečko Ringerjeve raztopine, obešeno znotraj naprave na desni strani kartuše. Ventil 2 je povezan s spodnjim priključkom kapalne komore. Ventil 3 je povezan z levo stranjo modula z votlimi vlakni. Ventil 4 je prek tretje peristaltične črpalke povezan z ventilom 5, ki se nahaja na drugem razdelilnem kolektorju.

Drugi razdelilni kolektor obsega ventile, oštevilčene od 5 do 9. Ventil 6 je povezan z manjšo vrečko s prostornino 50 mL, obešeno na desni strani naprave. Ta vrečka ima dvojno vlogo: po dekantiranju iz vrečk A in B v njej najprej sprejme gostejšo frakcijo Ringerjeve raztopine s sproščenimi celicami, kasneje, po koncentriranju te frakcije skozi modul z votlimi vlakni, pa se vanjo dovede še čista Ringerjeva raztopina, ki v ponovni krožni poti skozi isti modul izpere preostanek encima. Ventil 7 je povezan z desno stranjo modula z votlimi vlakni, ventil 8 pa z izhodnim priključkom istega modula. Ventil 9 je poseben v tem, da je povezan hkrati z dvema vrečkama različnih volumnov: z vrečko za končni produkt s prostornino 50 mL ter z odpadno vrečko s prostornino 250 mL, ki je po tipu enaka vrečkama, uporabljenima pri mešanju. Med

samim potekom procesa je ta ventil praviloma usmerjen tako, da tekočina odteka v odpadno vrečko, proti koncu postopka pa se preusmeri tako, da koncentrirana celična frakcija steče v vrečko za končni produkt.

Tri peristaltične črpalke so tako razporejene na treh ključnih mestih fluidnega kroga: med ventilom 0 in vrečko B, med vrečko A in vrečko B ter med ventiloma 4 in 5.

Celotna arhitektura je zasnovana tako, da so vse komponente, od vrečk in kapalne komore do modula z votlimi vlakni, med seboj povezane izključno s cevkami in tesnjenimi priključki, brez odprtih mest, kjer bi vzorec med postopkom prišel v stik z okolico. S tem kartuša izpolnjuje zahteve zaprtega sistema, opredeljene že v prejšnjih poglavjih.

Slika 7 prikazuje opisano arhitekturo fluidnega sistema kartuše, vključno z razporeditvijo obeh razdelilnih kolektorjev, vrečk, kapalne komore in modula z votlimi vlakni.



Slika 7: Fizična postavitev zaprtega fluidnega sistema z grelnim sklopom, peristaltičnimi črpalkami, razdelilnima kolektorjema, vrečkami in modulom z votlimi vlakni
Vir: (Lastni vir)

4.2 Potek tekočin skozi sistem

Pred vsakim ciklom izolacije se kartuša najprej pripravi s postopkom predhodnega polnjenja, pri katerem se z Ringerjevo raztopino napolni celoten fluidni sistem, torej cevke, oba razdelilna

kolektorja, kapalna komora in modul z votlimi vlakni. Namen predhodnega polnjenja je zagotoviti, da v sistemu med izvedbo postopka ni prisotnega zraka, saj je prisotnost zraka v tekočinskih poteh nezaželena tudi takrat, kadar je ta steriliziran. Predhodno polnjenje se izvede z uporabo dveh peristaltičnih črpalk, in sicer tiste med ventiloma 4 in 5 ter tiste med ventilom 0 in vrečko B, s čimer se zagotovi, da so vse poti sistema pred vnosom vzorca ustrezno napolnjene.

Lipoaspirat se v vrečko A skozi enega od njenih priključkov vnese že pred zagonom izbranega programa, med pripravo kartuše. Pri encimski izolaciji se ob tem skozi drugi priključek vrečke A opcijsko doda še encim, resuspendiran v 5 mL Ringerjeve raztopine, kot je podrobneje opisano v poglavju 7.2. Volumen vnesenega lipoaspirata ustreza predhodno izbranemu ciklu (40, 100 ali 120 mL), medtem ko poteka nadaljnji postopek priprave in izvedbe pri vseh treh ciklih vsebinsko enako, razlikujejo se le trajanje in obseg posameznih faz mešanja ter koncentriranja. Podroben potek priprave kartuše in postopka predhodnega polnjenja je opisan v poglavju 7.1.

Sledi faza mešanja, pri kateri peristaltična črpalka tekočino izmenično prečrpava med vrečkama A in B skozi povezovalno cevko, pri čemer se prenašani volumen med posameznimi prehodi postopoma povečuje, mešanju pa so dodani tudi krajši premori. Podroben potek te faze, vključno z vzorcem prenosov, razlogom za premore in naraščanjem volumna, je opisan v poglavjih 7.4 in 7.5. Ogrevanje tekočine med to fazo dodatno pripomore k učinkovitosti mešanja, saj se z višjo temperaturo zmanjša viskoznost tekočine, kar olajša mehansko razgradnjo koščkov lipoaspirata ob prehodu skozi cevko in priključke, hkrati pa temperatura 37 stopinj Celzija ustreza tudi temperaturnemu optimumu za delovanje encima (Aronowitz in drugi, 2015). Proti koncu faze mešanja se doda še dodatna količina Ringerjeve raztopine, kot je podrobneje opisano v poglavju 7.6, nakar mešanje za določen čas nadaljuje.

Po zaključku mešanja sledi obdobje mirovanja (dekantacija), med katerim se vsebina vrečk loči po gostoti na oljno plast, vezivnotkivno plast in tekočinsko plast, ki vsebuje sproščene celice (Eigenberger in drugi, 2025). Oljna in vezivnotkivna plast med celotnim postopkom nikoli ne zapustita vrečk A in B, iz sistema se odvede le gostejša tekočinska plast, ki se prek kapalne komore prečrpa v manjšo vrečko pri ventilu 6, od koder se začne postopek koncentriranja. Tekočina pri tem kroži po zaključeni poti: iz vrečke skozi ventil 6 do ventilov 5 in 4, naprej do ventila 3, skozi modul z votlimi vlakni ter nazaj skozi ventil 7, ki je v tej fazi usmerjen proti ventilu 6, s čimer se sklene krog. Ventil 8, povezan z izhodnim priključkom modula, je med koncentriranjem usmerjen proti odpadni vrečki, prav tako ventil 9, ki v tej fazi prepušča tok

naprej proti odpadni vrečki, ne proti vrečki za končni produkt. Na ta način tekočina, ki prehaja skozi steno votlih vlaken, odteka v odpad, medtem ko se celice zadržujejo in koncentrirajo v krožečem delu tekočine. Med koncentriranjem se v isto vrečko pri ventilu 6 naknadno doda preostanek gostejše tekočinske plasti iz vrečke B, dodatna Ringerjeva raztopina pa se uporabi tudi za izpiranje kapalne komore, s čimer se zajamejo morebitne celice, zadržane v njej.

Ko je koncentriranje končano, kar se v sistemu zgodi po ustavitvi pretoka tekočine v cevki zaradi vzpostavitve hidrostatičnega ravnovesja, se v vrečko pri ventilu 6 dopolni Ringerjeva raztopina, s katero se skozi enak krožni tok skozi modul z votlimi vlakni izpere preostanek encima iz koncentrirane celične frakcije. Po zaključenem spiranju se manjši del vsebine iz te vrečke prečrpa v vrečko za končni produkt pri ventilu 9, s čimer je postopek izolacije SVF v zaprtem sistemu zaključen.

4.3 Vloga peristaltičnih črpalk v sistemu

V sistemu so uporabljene tri enake peristaltične črpalke znamke Watson Marlow, model 114 ST DV. Gre za štirivaljčno prirobnično glavo z vidnim vrtenjem rotorja, poganja pa jo koračni motor, kar omogoča natančen in ponovljiv nadzor hitrosti pretoka. Odpirajoč se pokrov glave omogoča preprosto in hitro namestitev cevke ter zanesljivo delovanje brez potrebe po dodatnem naravnavanju. Delovanje temelji na principu, opisanem že v poglavju 3.4, in sicer valjčki s stiskanjem zunanje stene cevke potiskajo tekočino naprej, ne da bi prišli v neposreden stik z njo.

Vse tri črpalke uporabljajo cevke iz silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem (platinum cured silicone), ki je zaradi svoje biokompatibilnosti, odpornosti na ponavljajoče se stiskanje in možnosti sterilizacije primeren za stik z biološkim vzorcem. Cevke se med posameznimi mesti uporabe razlikujejo po notranjem premeru, medtem ko je debelina stene pri vseh enaka, 1,6 mm.

Črpalka, ki poganja tekočino med vrečkama A in B, uporablja cevko z notranjim premerom 4 mm. Večji notranji premer je na tem mestu potreben zaradi narave same tekočine, saj gre v tej fazi še za lipoaspirat z večjimi koščki tkiva, ki bi ob prehodu skozi ožjo cevko lahko povzročili zamašitev, kot je bilo opisano že pri omejitvah izhodiščne zasnove z brizgami v poglavju 3.3. Preostali dve črpalki, ki poganjata tekočino med ventilom 0 in vrečko B ter med ventiloma 4 in 5, uporabljata cevko z manjšim notranjim premerom, 2,4 mm, saj na teh mestih po sistemu

kroži že tekočinska plast brez večjih delcev tkiva, kar omogoča uporabo ožje cevke brez tveganja za zamašitev.

4.4 Vloga vrečk, cevk, razdelilnih kolektorjev in priključnih mest

Vrečke

Vse vrečke v sistemu, ne glede na njihovo vlogo (mešanje, zbiranje Ringerjeve raztopine s celicami, končni produkt, odpad), so izdelane iz materiala EVA (etilen vinil acetat) s plastjo, ki preprečuje prehod kisika (oxygen barrier). Tak material se pogosto uporablja pri medicinskih vrečkah za shranjevanje bioloških tekočin, saj je biokompatibilen, fleksibilen in ne prepušča kisika, kar zmanjšuje tveganje oksidacije vsebine. Ringerjeva raztopina, ki se uporablja znotraj sistema, ni vnaprej v vrečki, temveč jo uporabnik doda naknadno, med samim postopkom.

Razdelilna kolektorja in ventili

Razdelilna kolektorja sta kupljeni komponenti. Ventili na kolektorjih temeljijo na principu klasičnega tripotnega ventila (three way stopcock), pri katerem notranji vrtljivi del z izvrtino v obliki narobe obrnjene črke T z obračanjem preusmerja tok tekočine med priključenimi potmi, le da je ta princip pri teh kolektorjih razširjen na pet ločenih ventilov na enem kolektorju namesto enega samega.

Cevi

Skozi celoten sistem se uporablja enak tip cevi, z izjemo mest, kjer cevi potekajo skozi peristaltične črpalke. Na teh mestih so, kot je opisano v poglavju 4.3, uporabljene cevi iz silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem, zaradi njihove odpornosti na ponavljajoče se mehansko stiskanje. Na preostalih delih sistema, kjer cevi niso izpostavljene mehanskemu delovanju črpalke, se uporablja standardna medicinska cevka iz polivinilklorida (PVC).

Priključna mesta

V sistemu obstajata dve različici kartuše, pri čemer je ena namenjena za uporabo v kliničnem okolju, v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse. Priključek za vnos lipoaspirata na vrečki A je izveden kot ženski luer priključek z vgrajenim silikonskim tesnilom, ki deluje kot brezigelni ventil, saj omogoča ponavljajoče se priklapljanje brez potrebe po dodatnem tesnjenju. Enak tip priključka je uporabljen tudi za vnos Ringerjeve raztopine ali encima, le da je za tem priključkom dodatno vgrajen 0,2-mikronski filter, ki preprečuje vstop mikroorganizmov v sistem in s tem ohranja sterilnost. Pri GMP različici kartuše je na priključku

za lipoaspirat dodatno vgrajen tudi sterilni konektor in diskonektor, ki omogočata priklop in odklop brez porušitve sterilnosti sistema.

Povezava med vrečkama A in B poteka prek cevi z reducirnim nastavkom, ki povezuje nazobčana priključka različnih premerov, 6,4 mm na strani vrečke in 4,8 mm na strani cevi do črpalke. Vsi priključki na obeh razdelilnih kolektorjih so izvedeni kot ženski luer priključki, razen priključka, ki kolektor neposredno povezuje s kapalno komoro. Za vse druge, female luer priključke na kolektorjih je zato vedno potreben prehod z moškega luer priključka na nazobčan priključek za cev s premerom 2,4 mm.

Kapalna komora ima na zgornji strani cep z notranjim premerom 4,0 mm, vanj pa je neposredno vstavljena in zalepljena cevka iz PVC. Na spodnji strani ima kapalna komora nastavek, prilagojen za cev s premerom 2,4 mm, kar na tem mestu ne zahteva lepljenja.

Manjši vrečki s prostornino 50 mL, tako vrečka pri ventilu 6 kot vrečka za končni produkt, ter odpadna vrečka imajo reducirne nastavke s premera 4,8 mm na 2,4 mm. Cev, povezana z ventilom 1, ki vodi do zunanje Ringerjeve raztopine (vrečke ali plastenke), ima na koncu trn za prebadanje (spike), s katerim se ohranja sterilnost pri priklopu na zunanjo vrečko.

Med vrečko za končni produkt in ventilom 9 je vgrajen sterilni diskonektor z nazobčanima priključkoma na obeh straneh ter Y-konektor s tremi priključki, in sicer enim za sterilni diskonektor, drugim v obliki nazobčanega ženskega luer priključka s silikonskim tesnilom ter tretjim za vrečko končnega produkta.

4.5 Zahteve za tesnjenje in preprečevanje vdora zraka v sistem

Tesnjenje posameznih povezav v sistemu je zagotovljeno na različne načine, glede na vrsto cevi in mesto povezave. Na mestih, kjer so nameščene cevi iz silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem (torej na mestih, kjer cevi potekajo skozi peristaltične črpalke), so priključki dodatno zavarovani z aluminijastimi objemkami, ki preprečujejo zdrs cevi z nazobčanega priključka pod vplivom ponavljajočega se mehanskega stiskanja črpalke. Na preostalih delih sistema, kjer je uporabljena standardna PVC-cevka, ta na nazobčan priključek zgolj nasede, saj tesnjenje na teh mestih zagotavlja že sama geometrija priključka. Izjema je povezava s kapalno komoro, kjer je zgornja cevka na priključek trajno zalepljena, kot je opisano v poglavju 4.4.

Tesnjenje na vrtljivem delu ventilov na razdelilnih kolektorjih je zagotovljeno že s samo konstrukcijo kupljene komponente. Tesnost med vrtljivim delom ventila in ohišjem pri tej komponenti zagotavljajo natančno obdelane tolerance ter mazivo, nanešeno na vrtljivi del pred

sestavo. Ker so vsi priključki na kolektorjih izvedeni kot ženski luer priključki, ki se povezujejo z moškimi luer priključki, je tudi na teh mestih sistem ves čas zaprt, brez izpostavljenosti okolici.

Za preprečevanje vdora zraka v sistem je pred vsakim ciklom izolacije predviden postopek predhodnega polnjenja, opisan v poglavju 4.2, katerega namen je izločiti zrak iz celotnega fluidnega sistema, praviloma v smeri odpadne vrečke. Sistem trenutno nima vgrajenega senzorja, ki bi zaznaval prisotnost zraka v cevkah, zato je ustreznost tega postopka potrjena na podlagi izkušenj in ponavljajočih se praktičnih preizkusov med razvojem sistema.

4.6 Preprečevanje zadrževanja tekočin in zmanjšanje neugodnih pretočnih mest

Pri zasnovi fluidnega sistema so bile nekatere konstrukcijske odločitve sprejete prav z namenom zmanjšati zadrževanje tekočine in izgubo celic na posameznih mestih sistema.

Priključek na vrečki B, ki je povezan z ventilom 0, je bil izbran kot srednji izmed treh priključkov na tej vrečki, saj tak položaj omogoča bolj enakomeren iztok tekočine med dekantiranjem v primerjavi s tem, če bi bil ventil 0 povezan s katerim od stranskih priključkov. Enakomernejši iztok pri tem zmanjšuje možnost, da bi del gostejše frakcije z encimom in celicami ostal ujet ob robovih vrečke, namesto da bi bil v celoti odveden naprej v postopek koncentriranja.

Zmanjšanje izgube celic je bilo upoštevano tudi pri notranji geometriji obeh manjših vrečk s prostornino 50 mL, katerih stene proti priključku potekajo pod kotom 45 stopinj. Taka oblika omogoča boljše usmerjanje tekočine proti priključku kot pravokotna oziroma kvadratna notranja geometrija, pri kateri bi se v kotih vrečke zadrževalo več tekočine in posledično tudi več celic.

Enak namen ima tudi izpiranje kapalne komore z dodatno količino Ringerjeve raztopine po fazi dekantiranja, opisano že v poglavju 4.2, s katerim se zajamejo morebitne celice, zadržane v notranjosti komore. Podobno je bil premer cevi med vrečkama A in B, opisan v poglavju 4.3, izbran ne le zaradi preprečevanja zamašitve z večjimi koščki lipoaspirata, temveč posredno tudi zaradi zmanjšanja tveganja za zastajanje tekočine na tem mestu.

Sistematična, celovita analiza vseh morebitnih neugodnih pretočnih mest v sistemu sicer presega obseg tega diplomskega dela, opisani ukrepi pa predstavljajo konkretne konstrukcijske rešitve, sprejete na podlagi izkušenj, pridobljenih med iterativnim razvojem sistema.

4.7 Varnostni in uporabniški vidiki zaprtega sistema

Sistem ima vgrajena dva senzorja, enega na levi in enega na desni strani naprave, ki zaznavata pravilno namestitev kartuše. Šele ko sta oba senzorja hkrati pritisnjena, sistem zazna, da je kartuša pravilno nameščena. Sistem nima senzorjev za merjenje pretoka ali tlaka v cevkah, kar pomeni, da v primeru napačno nameščene ali stisnjene cevi sistem ne bo zaznal napake neposredno, temveč se bo to odrazilo v tem, da postopek ne bo potekal tako, kot je predvideno, na primer skozi odstopanja v pretoku ali nepopoln prenos tekočine med posameznimi vrečkami.

Kljub odsotnosti senzorja za tlak pa sama narava peristaltične črpalke prinaša neko lastno, notranjo omejitev tveganja. Peristaltična črpalka namreč deluje tako, da valjček tekočino najprej potisne naprej, nato pa se zaradi prostora med posameznimi valjčki del tekočine premakne nekoliko nazaj, dokler je ne prestreže naslednji valjček. Zaradi takega načina delovanja tlak v cevki ne more neomejeno naraščati, kot bi lahko na primer pri togem batu brizge, temveč se ustali na nekoliko višji vrednosti, ne da bi to privedlo do nenadne porušitve cevi ali priključkov.

Uporabniški vidik zaprtega sistema je bil upoštevan tudi pri sami zasnovi ohišja kartuše. Ob namestitvi kartuše v napravo se cevi na mestih peristaltičnih črpalk samodejno pravilno namestijo v ustrezen položaj znotraj črpalke, kar uporabniku onemogoča, da bi cevi zamenjal ali napačno namestil, ne da bi pri tem kartušo fizično razstavil, kar pri običajni uporabi ni predvideno.

Skupaj z lastnostmi, opisanimi v prejšnjih poglavjih, torej zaprtostjo sistema, kartušo kot komponento za enkratno uporabo ter enostavno in vodeno namestitvijo, opisana zasnova fluidnega sistema uporabniku omogoča razmeroma varno in nezahtevno uporabo, ne da bi ta moral poznati podrobnosti delovanja posameznih procesnih korakov.

5 KONSTRUKCIJSKI RAZVOJ KARTUŠE ZA ENKRATNO UPORABO

5.1 Funkcija kartuše v avtomatizirani napravi

Kartuša predstavlja sestavni del sistema, ki v enem samem, vstavljivem ohišju za enkratno uporabo združuje vse elemente fluidnega dela, opisane v poglavju 4: obe vrečki za mešanje, dodatne manjše vrečke, oba razdelilna kolektorja, kapalno komoro in modul z votlimi vlakni, skupaj s pripadajočimi cevmi. Vse te komponente so vpete v plastično ohišje kartuše, ki jih drži v natančno določenem položaju in ki se prav tako zavrže po enkratni uporabi.

Osnovna funkcija kartuše je tako dvojna. Po eni strani mora zagotoviti, da so vse fluidne komponente pravilno prostorsko razporejene in med seboj povezane, po drugi strani pa mora omogočiti, da se kartuša kot celota mehansko pravilno poveže z deli naprave, ki ostanejo v uporabi med različnimi cikli, torej s peristaltičnimi črpalkami, servo motorji za upravljanje ventilov, senzorji za zaznavo pravilne namestitve in grelnim elementom.

Ker je kartuša zasnovana za enkratno uporabo, medtem ko draga oprema, kot so črpalke, motorji in elektronski sklopi, ostane trajni del naprave, kartuša hkrati opravlja tudi vlogo, opisano že v poglavju 3.6, in sicer zmanjšuje tveganje navzkrižne kontaminacije med posameznimi uporabami, saj vsak vzorec preide skozi svoj lasten, nikoli prej uporabljen fluidni sistem.

5.2 Mehanska zasnova plastičnega ohišja kartuše

Ohišje kartuše je izdelano iz materiala PA12 (poliamid 12), tehnične vrste najlona, primernega za izdelavo s postopkom MJF (Multi Jet Fusion). V zgodnji fazi razvoja so bili prototipi ohišja izdelani iz materiala ABS (akrilonitril butadien stiren) s postopkom FDM (Fused Deposition Modeling), z namenom preveriti, ali oblika in dimenzije kartuše ustrezno pašejo v napravo, šele po potrditvi te osnovne geometrije je bila izdelava prenesena na material PA12 in postopek MJF.

Ohišje je zasnovano kot ploščata nosilna konstrukcija, ki v enem kosu povezuje vse fluidne komponente sistema. Oblika ohišja ni pravokotna ali kvadratna, temveč razvejana in večnivojska, saj se posamezni deli ohišja dvigajo na različne višine, prilagojene legi in velikosti komponent, ki jih nosijo, ter razpoložljivemu prostoru znotraj naprave.

Razdelilna kolektorja nista pritrjena z vijaki, temveč z zaskočnimi elementi (snap fit). Ker je cevka med posameznimi ventili na kolektorju izdelana iz dovolj toge polikarbonatne (PC) cevi, je zaskočno pritrditev mogoče izvesti neposredno na sam kolektor. Ker je telo kolektorja na nasprotni strani ventilov oblikovano kot podaljšan valj, so v ohišju za to oblikovani ustrezni utori, ki zagotovijo pravilno pozicioniranje kolektorja, hkrati pa je ta v teh utorih tudi zaskočno pritrjen.

Kapalna komora je na levi strani plošče pritrjena prek nastavka, v katerega se komora vstavi navpično navzdol. Nastavek je oblikovan rahlo zoženo, kar ustvari dovolj veliko trenje, da komora po vstavitvi ostane na mestu in ne pade ven. Modul z votlimi vlakni je pritrjen z dvema lastnima zaskočnima elementoma v obliki polkroga, ki objameta cilindrično telo modula.

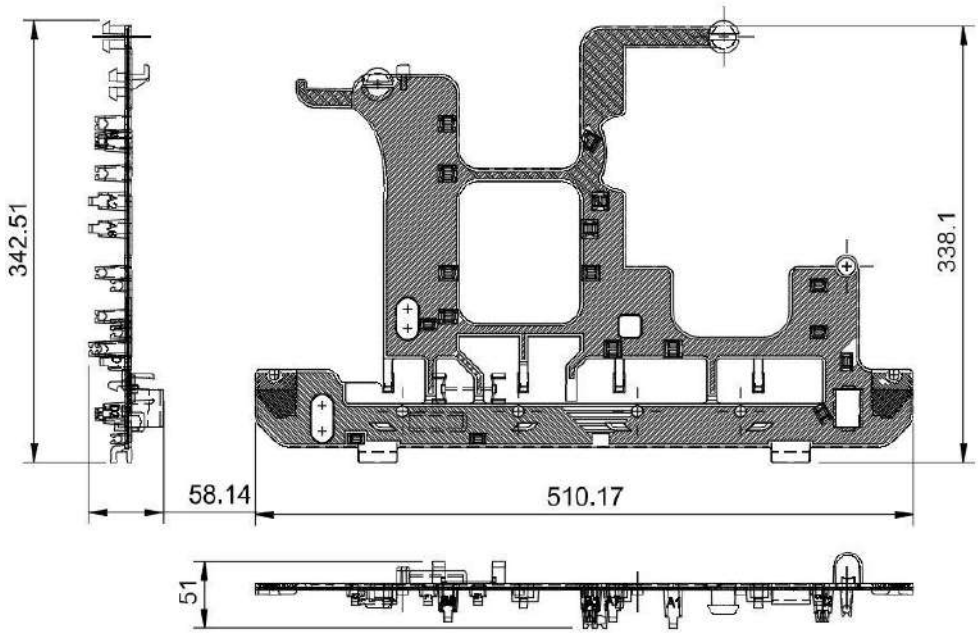
Cevi so v ohišju vodene prek za to oblikovanih nastavkov treh različnih višin, kar preprečuje, da bi se cevi med seboj križale, dotikale ali celo prepognile do te mere, da bi to oviralo pretok tekočine. Ti nastavki hkrati preprečujejo nenadzorovano premikanje cevi, tako med izvajanjem cikla kot tudi med transportom kartuše. Trn za prebadanje (spike) ima svoje ležišče pod modulom z votlimi vlakni, kamor se preprosto vstavi.

Vrečki za mešanje sta na levi strani ohišja obešeni na podaljšani vodoravni nosilec s kljuko na koncu. Enak tip kljuke je uporabljen tudi za obešanje 50-mililitrske vrečke pri ventilu 6 in odpadne vrečke, obe nameščeni na zadnji strani kartuše. Vrečka za končni produkt ima svojo manjšo kljuko na sprednji strani kartuše, kjer je najlažje dostopna in takoj vidna uporabniku.

Pomembna konstrukcijska zahteva je bila tudi, da vzorec oziroma tekočina med celotnim postopkom nikoli ne pride v neposreden stik z materialom PA12, temveč vedno ostaja znotraj namensko izbranih komponent (cevi, vrečk, konektorjev), kar je pomembno tako z vidika biokompatibilnosti kot ohranjanja sterilnosti sistema.

Po celotnem ohišju so razporejeni tudi številni izrezi v obliki rombov in kvadratov, ki zmanjšujejo količino porabljenega materiala in s tem maso ter čas izdelave kartuše, ne da bi to bistveno vplivalo na njeno togost na mestih, kjer je ta potrebna.

Slika 8 prikazuje tehnično risbo ohišja kartuše z glavnimi merami. Največje zunanje mere ohišja znašajo 510,17 × 342,51 × 51 mm, pri čemer večino globine predstavljajo nastavki za vodenje cevi, zaskočni elementi in nosilci komponent, osnovna debelina stene pa znaša 3 mm (poglavje 5.3). Slika 9 prikazuje CAD model samega ohišja brez komponent, na katerem so vidni razvejana oblika plošče, nastavki za vodenje cevi, ležišči obeh razdelilnih kolektorjev in nosilci vrečk.



Slika 8: Tehnična risba ohišja kartuše z glavnimi merami (mere v mm)
Vir: (Lastni vir)



Slika 9: CAD-model ohišja kartuše v programu Fusion 360: (a) pogled na stran z ležiščema razdelilnih kolektorjev; (b) izometrični pogled
Vir: (Lastni vir)

5.3 Prilagoditev ohišja kartuše za izdelavo z brizganjem plastike in MJF tiskanjem

Kartuša je bila že od začetka razvoja načrtovana tako, da je ena in ista geometrija primerna tako za tiskanje s postopkom MJF kot tudi za kasnejšo izdelavo z brizganjem plastike. Tak pristop, pri katerem se izdelek od začetka snuje z mislijo na kasnejšo serijsko proizvodnjo, čeprav se v zgodnji fazi izdeluje z drugačnim postopkom, omogoča, da ob morebitnem prehodu na

brizganje ni potrebno ponovno konstruiranje ohišja, temveč se lahko uporabi že preverjena in dodelana geometrija.

Za tiskanje s postopkom MJF je bil izbran material PA12, za kasnejše brizganje pa je bil kot ustrezen material predviden Makrolon RX2530, medicinski polikarbonat proizvajalca Covestro. Oba materiala sta bila izbrana med drugim tudi zato, ker sta združljiva s sterilizacijo z metodo e-beam (obsevanje z elektronskim curkom), kar je pomembna zahteva za komponento medicinsko-tehnične naprave, tudi če ta ne prihaja v neposreden stik z vzorcem. Trenutno se kartuše izdelujejo izključno s tiskanjem MJF, saj obseg naročil še ne upravičuje začetnega vložka, potrebnega za izdelavo orodja za brizganje. Ko bo obseg naročil dovolj velik, je predviden prehod na brizganje plastike.

Ker je delovni prostor razpoložljivega MJF tiskalnika premajhen za tisk celotnega ohišja v enem kosu, je ohišje za namene tiska navpično razdeljeno na dva ločena dela. Oba dela se med seboj sestavita in pritrdita s štirimi vijaki z nasprotnostoječimi maticami, razporejenimi na štirih mestih vzdolž stika obeh polovic: enim tik nad črpalko, ki povezuje ventila 4 in 5, enim tik pod isto črpalko ter še dvema, nameščenima proti spodnjemu koncu ohišja. Taka delitev je potrebna izključno zaradi omejitve tiskalnika, saj bi bilo ohišje pri izdelavi z brizganjem plastike v celoti izdelano iz enega kosa, brez potrebe po delitvi in naknadnem sestavljanju.

Pri prilagajanju geometrije za brizganje plastike je bila ključna sprememba debeline sten ohišja. Prvotna zasnova je predvidevala osnovno debelino stene 5 mm, kar naj bi zagotavljalo večjo togost in preprečevalo zvijanje ohišja. Taka debelina se je pri posvetovanju z orodjarjem izkazala za neustrezno, saj neenakomerna in prevelika debelina sten pri brizganju plastike povzroči neenakomerno hitrost ohlajanja posameznih delov izdelka. Debelejši predeli se namreč ohlajajo počasneje kot tanjši, kar med strjevanjem ustvari notranje napetosti in vodi v vidne napetostne sledi ter deformacijo (zvijanje) izdelka, kar je pri zasnovi kartuše potrdila tudi izvedena analiza napetosti med strjevanjem materiala. Na podlagi teh ugotovitev je bila zasnova ohišja spremenjena na osnovno debelino stene 3 mm, ojačeno z rebri višine 2 mm na mestih, kjer je bila potrebna dodatna togost, namesto da bi bila dodatna trdnost dosežena z lokalnim odebeljevanjem stene. Ta sprememba je zahtevala prenovo celotne zadnje strani ohišja kartuše, kjer so bila rebra dodana sistematično, medtem ko so bila mesta, ki so bila prej nepotrebno odebeljena, ustrezno stanjšana.

Primerjava vseh treh izdelovalnih postopkov, ki so bili uporabljeni med razvojem ali so predvideni za ohišje kartuše, je podana v Tabeli 1.

Tabela 1: Primerjava izdelovalnih postopkov ohišja kartuše

Lastnost	**FDM tisk**	**MJF tisk**	**Brizganje plastike**
Material	ABS	PA12 (HP 3D HR PA 12)	PC (Makrolon Rx2530)
Uporaba v razvoju	druga različica, preverjanje oblike in ujemanja z napravo	tretja (sedanja) različica, izdelava kartuš za testiranje in uporabo	predvidena serijska proizvodnja
Natezna trdnost / modul elastičnosti	nižja, odvisna od smeri tiska	48 MPa / 1800 MPa	67 MPa (meja tečenja) / 2400 MPa
Izotropnost lastnosti	izrazito anizotropne (šibkejša vez med sloji)	skoraj izotropne (enake vrednosti v smereh XY in Z)	izotropne
Potrebno orodje	ne	ne	da (orodje za brizganje)
Začetni strošek	zanemarljiv	zanemarljiv	visok (izdelava orodja)
Strošek na kos	nizek strošek materiala, a dolg čas tiska	srednji, neodvisen od števila kosov	najnižji pri velikih serijah
Konstrukcijske omejitve	debelejše stene za zadostno togost	delovni prostor tiskalnika, zato ohišje iz dveh delov, spojenih s štirimi vijaki	enakomerna debelina sten (3 mm) z rebri (2 mm), ohišje iz enega kosa
Primernost	prototipi	razvoj in manjše serije	velike serije

Vir: (Covestro, 2018; HP Development Company, 2018); lastni vir

Izbira izdelovalnega postopka je v veliki meri tudi ekonomska odločitev. Pri tisku MJF ni potrebno orodje, zato strošek posamezne kartuše ni odvisen od števila izdelanih kosov, sprememba konstrukcije pa pomeni le spremembo CAD-modela. To je v razvojni fazi in pri sedanjih manjših količinah bistvena prednost. Pri brizganju plastike je potrebno orodje, ki predstavlja visok enkraten začetni vložek, cena posameznega kosa pa je nato bistveno nižja kot pri tisku in se z večanjem serije še zmanjšuje. Brizganje se zato ekonomsko upraviči šele pri

dovolj velikem obsegu naročil, ko se strošek orodja porazdeli na veliko število kartuš. Zato je prehod na brizganje predviden šele v fazi serijske proizvodnje, geometrija ohišja pa je nanj pripravljena že zdaj.

5.4 Namestitev cevk, vrečk, razdelilnih kolektorjev, kapalne komore in modula z votlimi vlakni v kartušo

Sestavljanje kartuše ne poteka tako, da bi se vse komponente neposredno vstavljale v ohišje druga za drugo, temveč se večina delov najprej pripravi kot ločeni podsklopi, ki se šele nato namestijo v ohišje kartuše.

Postopek se začne z rezanjem cevi na ustrezne dolžine in njihovim označevanjem, kar je ključnega pomena za pravilno nadaljnjo sestavo, saj se posamezne cevi med seboj razlikujejo po dolžini in namembnosti, pravilna označitev pa prepreči zamenjavo med njimi. Na podlagi teh cevi se nato pripravi šest ločenih podsklopov.

Prvi podsklop predstavljata obe vrečki za mešanje, medsebojno povezani s cevko in ustreznimi konektorji. Drugi podsklop je kapalna komora, na katere zgornji priključek se zalepi PVC cev, na spodnji nastavek pa se cev zgolj natakne. Tretji podsklop nastane okoli modula z votlimi vlakni, na katerega se namestijo vse cevi, ki nato vodijo naprej proti razdelilnima kolektorjema. Četrti podsklop sestavljajo preostale vrečke, torej 50-mililitrska vrečka, odpadna vrečka in vrečka za končni produkt, od katerih je vsaka povezana s pripadajočo cevko prek reducirnega nastavka s premera 4,8 na 2,4 mm. Peti podsklop predstavljata sestavljena razdelilna kolektorja. Šesti podsklop je daljša cev s trnom za prebadanje (spike) na koncu, namenjena povezavi z zunanjo Ringerjevo raztopino.

Na vseh ceveh, razen na cevi s premerom 4,0 mm, ki je z obeh strani povezana z reducirnima nastavkoma neposredno iz vrečk, se pred nadaljnjo sestavo namesti prehod z nazobčanega priključka na ustrezen luer priključek, potreben za povezavo z razdelilnima kolektorjema.

Šele ko so vsi podsklopi pripravljeni, se začne dejanska namestitev v ohišje kartuše. Vrečke se obesijo na pripadajoče nosilce, cevi se položijo v za to oblikovane nastavke na ohišju, razdelilna kolektorja pa se namestita na svoje mesto in nato privijačita nanj. Ker je pravilna namestitev in medsebojna povezanost vseh cevi ključna za pravilno delovanje celotnega fluidnega sistema, je natančno označevanje posameznih komponent že v zgodnji fazi sestavljanja bistvenega pomena za to, da se kartuša na koncu sestavi pravilno in brez napak.

5.5 *Vpetje kartuše v napravo in pozicioniranje pod kotom*

Mehanizem vpetja kartuše v napravo izvira iz izhodiščne zasnove naprave, namenjene predhodnemu separacijskemu postopku, in ni bil razvit posebej za potrebe izolacije stromalne vaskularne frakcije. Kartuša za izolacijo SVF je bila zasnovana tako, da njeno ohišje ustreza obstoječemu mehanizmu vpetja, hkrati pa nosi vse komponente, potrebne za nov proces, in sicer razdelilna kolektorja, črpalke ter preostale elemente fluidnega sistema. Ponovna uporaba že obstoječega mehanizma vpetja je bila smiselna izbira, saj bi njegov razvoj od začetka pomenil večje dodatno konstrukcijsko delo, medtem ko je prilagoditev ohišja kartuše obstoječemu mehanizmu omogočila hitrejši prehod na nov proces, kar je v skladu tudi z razlogi za prilagoditev sistema, opisanimi v poglavju 3.4.

Vstavljanje kartuše v napravo poteka v dveh zaporednih korakih. Kartušo je najprej treba rahlo nagniti proti uporabniku in jo namestiti na dva vodoravna valja, nameščena na levi in desni strani naprave v rahlo dvignjenem položaju. Ta dva valja delujeta kot os vrtenja, okoli katere se kartuša v drugem koraku zavrti navznoter, dokler ni popolnoma pravokotna na tla. Med tem vrtenjem se ventili na razdelilnih kolektorjih postopoma zataknejo v ustrezne nastavke, povezane s servo motorji naprave, kar zagotavlja, da je kartuša ob koncu vstavljanja mehansko pravilno povezana z gonili, potrebnimi za upravljanje ventilov. Nagibanje kartuše med vstavljanjem izhaja izključno iz geometrije prevzetega mehanizma vpetja in ni povezano s samim potekom procesa izolacije, saj kartuša v končnem, delovnem položaju stoji povsem pravokotno na tla.

V tem končnem položaju je kartuša fiksirana z zapahom na obeh straneh naprave, levem in desnem, ki ju vzmet stalno potiska v zaprt, spuščen položaj pod kotom 90 stopinj. Oba zapaha delujeta neodvisno, vsak na svoji strani kartuše, kar zagotavlja, da je kartuša vzdolž svoje osi vrtenja podprta na obeh koncih in se med izvajanjem cikla ne more premakniti ali zavrteti nazaj v odprt položaj. Odstranitev kartuše iz naprave zato zahteva sočasen dvig obeh zapahov, s čimer se sprosti njena vpetost na vodoravnih valjih in jo je mogoče izvzeti iz naprave.

5.6 *Mehanska povezava kartuše s pogoni ter konstrukcijske rešitve za njeno vstavljanje in odstranitev*

Za pogon vseh desetih ventilov na obeh razdelilnih kolektorjih kartuše je v napravi nameščenih deset servo motorjev, po eden za vsak ventil. Na gred vsakega servo motorja je pritrjen kupljen plastičen nastavek z viličasto, zarezano obliko, prilagojeno geometriji ročice ventila v obliki

narobe obrnjene črke T, opisane že v poglavju 4.4. Zarezana oblika nastavka ročico ventila oprime z obeh strani, kar zagotavlja togo, dvosmerno mehansko povezavo: servo motor lahko ventil prek te povezave obrača v obe smeri, ne le v eno, kar je nujno, saj morajo ventili med posameznimi fazami postopka izolacije preklapljati med različnimi položaji.

Povezava med ročico ventila in nastavkom na servo motorju se v veliki večini primerov vzpostavi samodejno, kot del istega gibanja, s katerim uporabnik kartušo zavrti v končni, pravokotni položaj, opisanega v poglavju 5.5. Med tem vrtenjem se ročice vseh desetih ventilov hkrati zasučejo v ustrezne nastavke na servo motorjih, kar uporabniku omogoča vzpostavitev vseh desetih mehanskih povezav v enem samem gibanju, namesto da bi moral vsako od njih poravnati posebej.

Redkeje se zgodi, da se zatič zapaha med vstavljanjem kartuše ustavi na zgornjem robu kartuše, namesto da bi zdrsnil v svoj končni, zaklenjeni položaj. Do tega prihaja zaradi povečane fleksibilnosti kartuše v globinski (z) smeri, ki je posledica dveh dejavnikov: vertikalne delitve ohišja na dva dela zaradi omejitve tiskalnika MJF, opisane v poglavju 5.3, ter tanjše debeline sten, uvedene pri prilagoditvi geometrije za brizganje plastike. V takem primeru je težavo mogoče odpraviti tako, da uporabnik kartušo rahlo potisne globlje v napravo ali zatič zapaha za trenutek rahlo dvigne, dokler ta ne zdrsne v pravilen, zaklenjen položaj.

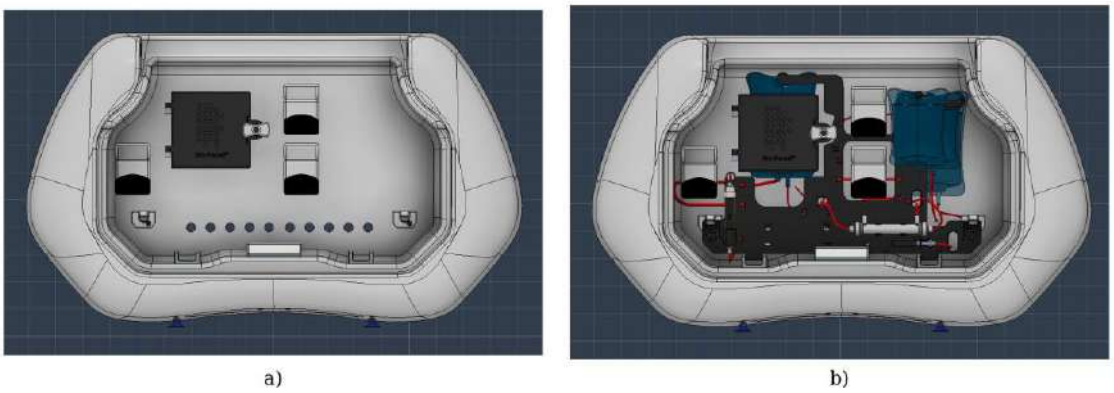
5.7 CAD-modeliranje kartuše in preverjanje konstrukcijskih rešitev

Celotna kartuša je bila zasnovana v programskem okolju Fusion 360, pri čemer je bil CAD-model osrednje orodje skozi ves potek razvoja. Vsaka konstrukcijska rešitev, preden je bila fizično izdelana, bodisi kot MJF prototip bodisi kot preizkusna verzija ohišja, je bila najprej v celoti modelirana in preverjena v CAD-okolju.

CAD-model je bil uporabljen za preverjanje več različnih vidikov zasnove. Prvi vidik je bil ujemanje kartuše z napravo, torej ali gre celotno ohišje v svojih dimenzijah in obliki ustrezno v prostor, namenjen kartuši, in ali njena geometrija omogoča pravilno vstavljanje in vpetje na mehanizem naprave, opisan v poglavju 5.5. Drugi vidik je bila geometrija posameznih nastavkov za komponente, kot so kapalna komora, modul z votlimi vlakni in oba razdelilna kolektorja, kjer je bilo treba natančno določiti dimenzije zaskočnih elementov in frikcijskih nastavkov, da so komponente po eni strani dovolj čvrsto pritrjene, po drugi strani pa jih je še vedno mogoče vstaviti brez prekomerne sile.

Poseben pomen je imelo preverjanje sestavljivosti oziroma medsebojnega prekrivanja komponent (interference check) znotraj CAD-modela. S tem je bilo mogoče že pred fizično izdelavo ugotoviti, ali se cevi, napeljane med posameznimi komponentami, med seboj križajo, dotikajo ali morda celo stisnejo do te mere, da bi to oviralo pretok tekočine. Prav ta preveritev je privedla do rešitve s tremi različnimi višinami nastavkov za cevi, opisane v poglavju 5.2, s katero so cevi speljane vsaka na svoji ravni in se med seboj ne križajo.

Analiza napetosti, ki je pri prilagajanju debeline sten za brizganje plastike pokazala neustreznost prvotne zasnove, opisana v poglavju 5.3, ni bila izvedena v CAD-okolju Fusion 360, temveč v ločenem, specializiranem programskem orodju orodjarja. Na podlagi njenih ugotovitev so bile v CAD-modelu kartuše nato izvedene ustrezne konstrukcijske spremembe, torej zmanjšanje osnovne debeline stene in dodajanje reber, s čimer je bila potrebna sprememba hitro vključena v obstoječo geometrijo, ne da bi bilo treba zasnovo znova graditi od začetka.



Slika 10: CAD-prikaz prostorskega ujemanja kartuše z napravo: (a) notranjost naprave brez kartuše; (b) naprava z vstavljeno kartušo
Vir: (Lastni vir)

Delo v programu Fusion 360 je potekalo od posameznih delov proti sestavu: najprej je bilo modelirano ohišje (Slika 9), nato so bile vanj vstavljene kupljene komponente (razdelilna kolektorja, modul z votlimi vlakni, kapalna komora in vrečke), na koncu pa so bile med njimi speljane cevi. Slika 11 prikazuje tak sestav kartuše. Cevi so v sestavu modelirane kot prostorske krivulje, ki potekajo skozi nastavke za cevi, kar je omogočilo preverjanje njihovega poteka in medsebojnega prekrivanja, opisano v poglavju 5.2. Sestav vključuje tudi modele vrečk, s čimer je bila preverjena njihova lega glede na ohišje in druge komponente.

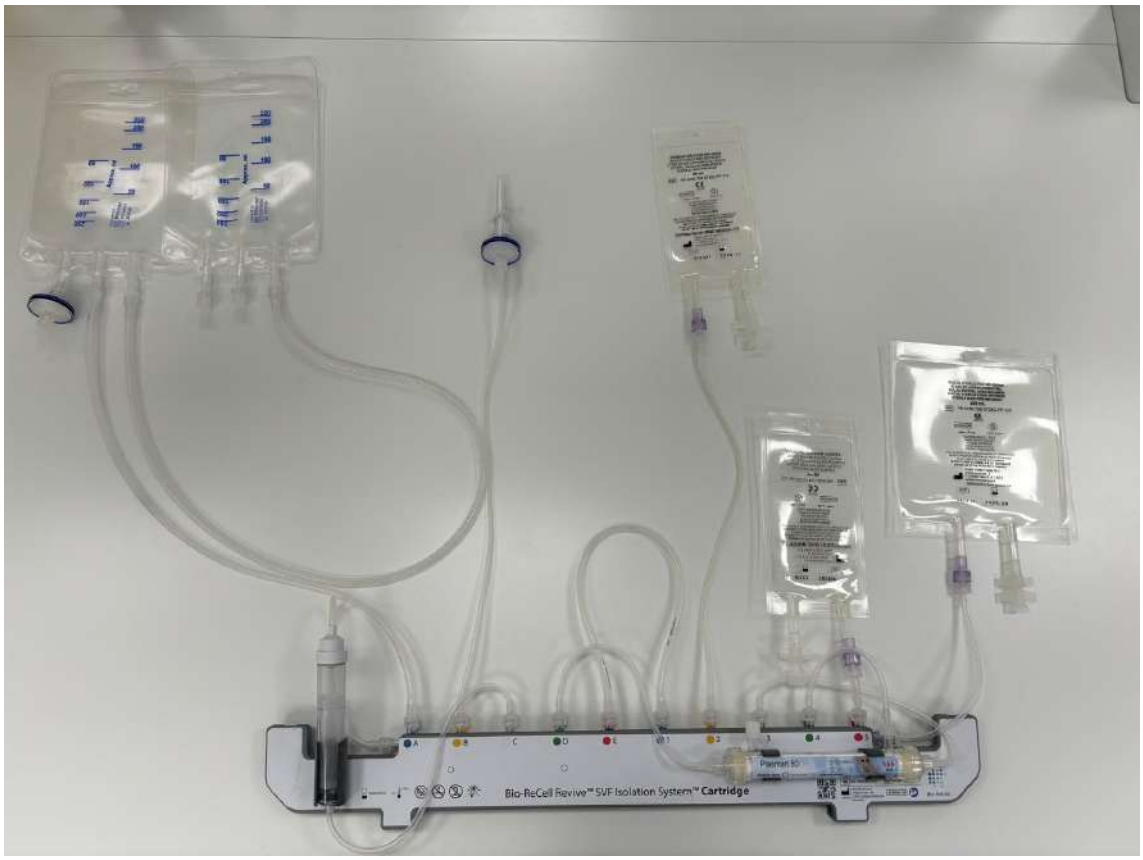


Slika 11: CAD-sestav kartuše v programu Fusion 360 z vrečkami, cevmi in komponentami: (a) izometrični pogled; (b) pogled na stran z razdelilnima kolektorjema
Vir: (Lastni vir)

5.8 Razvojne različice kartuše in spremembe na podlagi testiranj

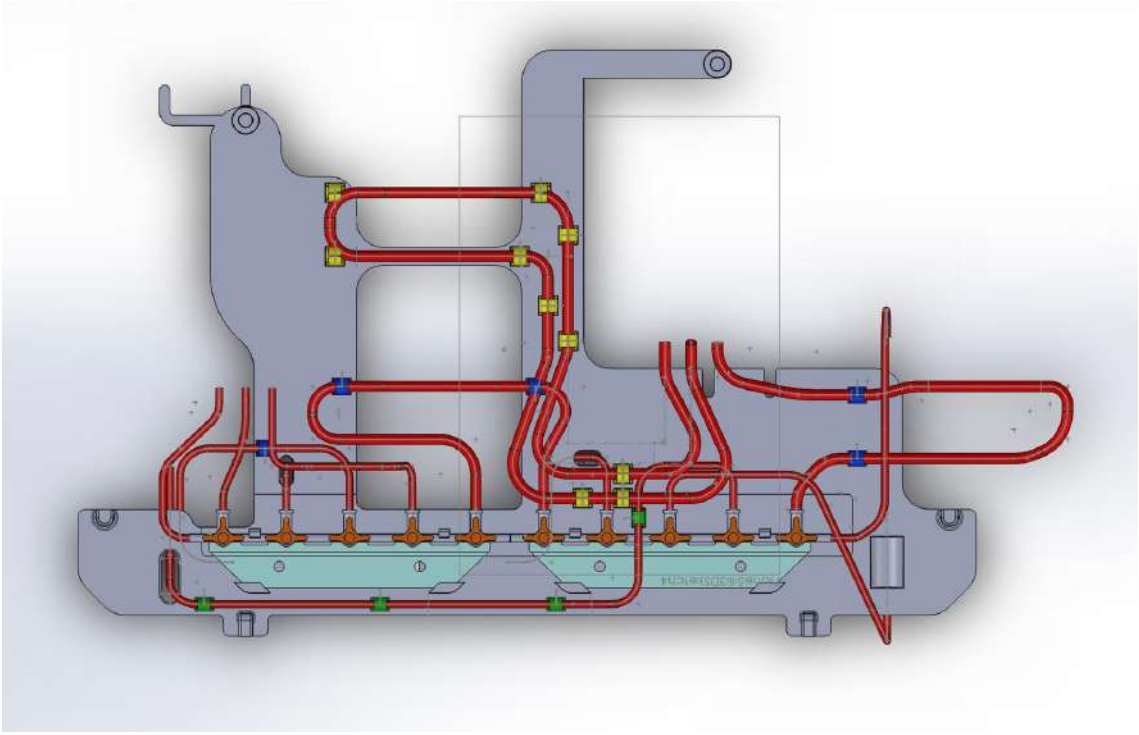
Kartuša je skozi razvoj prešla tri jasno ločene večje razvojne različice, pri čemer je vsaka naslednja odpravljala pomanjkljivosti prejšnje in približevala zasnovo končni, za serijsko proizvodnjo primerni obliki.

Prva različica je bila izrezana iz pleksi stekla, po obliki podobna kartuši, prvotno namenjeni predhodnemu separacijskemu procesu, tako da je ustrezno pasala v napravo. Cevke so bile pri tej različici sicer že pravilno povezane z razdelilnima kolektorjema in preostalimi komponentami, vendar so ostajale prosto viseče, brez fiksacije na ohišje, kar je pri sestavljanju in uporabi otežilo določanje, katera cevka pripada kateremu delu sistema. V tej fazi razvoja so se med testiranjem še spreminjale posamezne komponente, na primer cevi, modul z votlimi vlakni in konektorji, medtem ko splošna geometrija kartuše še ni bila dokončno določena.



Slika 12: Zgodnja razvojna različica fluidnega sklopa s prosto speljanimi cevkami pred uvedbo integriranega nosilnega ohišja
Vir: (Lastni vir)

Druga različica je bila izdelana kot debelejše, s postopkom FDM natisnjeno in sestavljeno ohišje. Poglavitni namen prehoda na to različico je bil bistveno poenostaviti uporabo za končnega uporabnika, saj mu prva različica ni omogočala preproste in intuitivne uporabe, ker je bilo treba vrečke obešati posebej, prava mesta priklopa posameznih cevk pa je bilo treba iskati ročno. Druga različica je zato uvedla ohišje, ki je vse te elemente povezalo v eno samo, vstavljivo enoto, s čimer je bilo hkrati preverjeno tudi, ali oblika in dimenzije tako zasnovanega ohišja ustrezajo prostoru, namenjenemu kartuši v napravi. Do te faze je bila večina komponent sistema, torej črpalke, razdelilna kolektorja in modul z votlimi vlakni, že določena, spremembe so se zato nanašale predvsem na samo ohišje, ne več na izbiro komponent.



Slika 13: Prva zasnova z integriranim nosilnim ohišjem in določenimi mesti vodenja cevk
Vir: (Lastni vir)

Tretja, trenutno zadnja različica je nastala zaradi potrebe po celoviti prilagoditvi kartuše zahtevam izdelave s postopkom MJF in kasnejšega brizganja plastike, opisanim v poglavju 5.3, saj je bilo ohišje iz druge različice, natisnjeno s postopkom FDM, poleg tega tudi zahtevno za sestavljanje. Poleg konstrukcijskih sprememb ohišja so bili v to različico dodatno vključeni tudi sterilni konektorji in diskonektorji, ki jih predhodni različici kartuše še nista vsebovali. Ta tretja različica predstavlja trenutno zaključeno, dokončno obliko kartuše.



Slika 14: Nadaljnji razvoj integriranega nosilnega ohišja: (a) CAD-model črne različice kartuše; (b) fizično izdelana različica iste zasnove
Vir: (Lastni vir)



Slika 15: Sedanja različica kartuše z integriranim nosilnim ohišjem v delovnem položaju znotraj naprave
Vir: (Lastni vir)

6 IZBIRA KOMPONENT IN MATERIALOV

6.1 Merila za izbiro materialov za kartušo in fluidne povezave

Osnovno merilo je bila biokompatibilnost, torej ustreznost materiala za neposreden stik z biološkim vzorcem brez škodljivega vpliva nanj, kar je v skladu z zahtevami standarda ISO 10993-1, obravnavanega že v poglavju 3.6. Ker gre za komponente medicinske naprave, je bila pomembna zahteva tudi možnost sterilizacije z metodo e-beam, kot je bilo opisano že pri izbiri materialov za ohišje kartuše v poglavju 5.3, saj morajo biti tej metodi sterilizacije ustrezni ne le material ohišja, temveč tudi materiali vseh komponent, ki so v stiku z vzorcem.

Naslednje merilo je bila kemična odpornost materialov na snovi, s katerimi so komponente med postopkom v stiku, torej z lipoaspiratom, Ringerjevo raztopino in kolagenazo. Namesto posebnega eksperimentalnega preverjanja kemične odpornosti je bila izbira materialov pri tem vezana na že uveljavljene, v medicinski praksi preverjene materiale, za katere je odpornost na tovrstne snovi splošno znana in dokumentirana.

Pomembno merilo je bila tudi prosojnost materialov, uporabljenih pri vrečkah in ceveh, saj ta uporabniku omogoča neposreden vizualni nadzor nad potekom postopka. Skozi prozorne stene je mogoče spremljati pretakanje tekočine po celotni kartuši, saj vsak tovrsten pretok povzroča delovanje ene od peristaltičnih črpalk, kar je koristno tako pri razvoju in testiranju sistema kot pri dejanski uporabi.

Poleg naštetih meril so bile pri izbiri materialov upoštevane tudi splošne mehanske lastnosti, kot sta trdnost in odpornost na ponavljajoče se mehansko obremenjevanje, kar je še posebej pomembno pri materialih, uporabljenih na mestih peristaltičnih črpalk, kjer je cevka izpostavljena stalnemu, ponavljajočemu se stiskanju.

Vsi sestavni deli kartuše so z materialom, glavnimi merami in količino na eno kartušo navedeni v kosovnici v Tabeli 2. V tabeli so uporabljene kratice NP (notranji premer), ZP (zunanji premer), PP (polipropilen), PES (polietersulfon), DEHP (di(2-etilheksil) ftalat), DOP (dioktil ftalat), LDPE (polietilen nizke gostote), SMS (netkana tekstilija v sestavi spunbond-meltblown-spunbond) in BOPET (biaksialno orientiran polietilen tereftalat). Deli, ki so v kartuši uporabljeni na več mestih, a so isti izdelek, so navedeni le enkrat, s skupno količino. Pri ceveh je namesto števila kosov podana skupna dolžina cevi na eno kartušo.

Tabela 2: Kosovnica kartuše za enkratno uporabo

Komponenta	Namen	Material	Glavne mere	Količina
Ohišje kartuše	nosilna konstrukcija celotnega sestava	PA12 (MJF)	510 × 343 × 51 mm, iz dveh delov	1 kos
Cev, silikon	povezava vrečk A in B skozi črpalko	silikon, strjen s platino	NP 4,0 mm, ZP 7,2 mm	72 cm
Cev, silikon	črpalna odseka (vrečka B–ventil 0, ventila 4–5)	silikon, strjen s platino	NP 2,4 mm, ZP 5,6 mm	80,5 cm
Cev, PVC	preostale povezave (12 odsekov)	PVC brez DEHP	NP 2,4 mm, ZP 4,0 mm	182,5 cm
Vrečka 250 mL	vrečki A in B za mešanje ter odpadna vrečka	EVA	konično dno, 3 priključki (6,4; 4,8; 4,8 mm)	3 kos
Vrečka 50 mL	zbiranje tekočinske plasti in končni produkt	EVA	konično dno, 1 priključek 4,8 mm	2 kos
Razdelilni kolektor	preklapljanje tekočinskih poti	PC	5 ventilov	2 kos
Modul z votlimi vlakni Plasmart 50	koncentriranje celic in odstranjevanje encima	membrana PES, ohišje kopoliester	pore 0,2 µm	1 kos
Kapalna komora z mrežico	zadrževanje večjih delcev tkiva	ABS, PVC brez DOP, mrežica PP-poliamid	mrežica 200 µm	1 kos
Bakterijski filter	sterilen vnos encima v vrečko A	ABS, steklena vlakna	hidrofoben, pore 0,2 µm	1 kos
Trn za prebadanje	priklop zunanje Ringerjeve raztopine	ABS, pokrovček LDPE (ni v stiku)	brez odzračevanja, ženski luer	1 kos

Komponenta	Namen	Material	Glavne mere	Količina
Redukcijski nastavek	priključka vrečk A in B	PP	6,4 mm na 4,8 mm	2 kos
Nazobčan priključek na ženski silikonski luer (brezigelni ventil)	priključki vrečk	silikon in PC	4,8 mm	3 kos
Redukcijski nastavek	priključki manjših vrečk in odpadne vrečke	PP	4,8 mm na 2,4 mm	4 kos
Nazobčan priključek na ženski luer	odpadna vrečka, priključka modula	PC	2,4 mm	3 kos
Nazobčan priključek na moški luer	priključki razdelilnih kolektorjev in trna	PC	2,4 mm	12 kos
Nazobčan priključek na ženski silikonski luer (brezigelni ventil)	mesti za vzorčenje in odvzem produkta	silikon in PC	3,2 mm	2 kos
Vtični zamašek, nazobčan	zapiranje neuporabljenih priključkov odpadne vrečke	PP	4,8 mm	2 kos
Vtični zamašek, nazobčan	zapiranje širšega priključka odpadne vrečke	PP	6,4 mm	2 kos
Nazobčan priključek na ženski luer	priključek za encim na vrečki A	PP	4,8 mm	1 kos
Y-konektor, nazobčan	razcep proti vrečki za končni produkt	PP	2,4 mm	1 kos

Komponenta	Namen	Material	Glavne mere	Količina
Sterilna pregrada (vrečka)	pakiranje in sterilizacija končne kartuše	PP SMS, laminat BOPET/PP	500 × 800 mm	1 kos

Vir: (Lastni vir)

Tabela 3 prikazuje primerjavo osnovnih lastnosti materialov, iz katerih so izdelani deli kartuše. Navedene so tipične vrednosti iz tehničnih listov proizvajalcev materialov oziroma reprezentativnih medicinskih izdelkov iste vrste in ne vrednosti, izmerjene na delih kartuše. Navedbe o biološki ustreznosti se nanašajo na material, kot jih navaja proizvajalec, in ne pomenijo certifikacije končne kartuše, ki mora biti kot celota ovrednotena v skladu s standardom ISO 10993-1. V tabeli so uporabljene kratice HDT (temperatura upogiba pod obremenitvijo), EtO (etilenoksid) in USP (Farmakopeja Združenih držav Amerike).

Tabela 3: Primerjava lastnosti materialov, uporabljenih v kartuši

Lastnost	PP	PC (Makrolon Rx2530)	PA12 (HP MJF)	ABS	Silikon, Pt (Tygon 3350)	PVC brez DEHP (Tygon ND 100-65)
Gostota [g/cm³]	0,905	1,20	1,01	1,04	1,14	1,19
Natezna trdnost [MPa]	33	67 (meja tečenja)	48	45	10	14,3
Modul elastičnosti [MPa]	1345	2400	1800	2340	1,9 (pri 200 % raztezku)	5,6 (pri 100 % raztezku)
Raztezek [%]	12 (na meji tečenja)	> 50	20	25	770	415
Trdota	–	–	–	–	50 Shore A	65 Shore A
Temperaturna obstojnost [°C]	HDT 99 (0,45 MPa), največ 82	HDT 134 (0,45 MPa)	HDT 175 (0,45 MPa)	HDT 102 (1,8 MPa), največ 60	največ 204	največ 74

Lastnost	PP	PC (Makrolon Rx2530)	PA12 (HP MJF)	ABS	Silikon, Pt (Tygon 3350)	PVC brez DEHP (Tygon ND 100-65)
Prosojnost	prosojen	prozoren	neprozoren	neprozoren	prosojen	prozoren
Sterilizacija s sevanjem (po proizvajalcu)	–	primeren za visokoenergijsko sevanje	–	–	sevanje do 2,5 Mrad	EtO, gama
Biološka ustreznost materiala (po proizvajalcu)	–	več zahtev ISO 10993-1	USP razred I–VI (stik z nepoškodovano kožo)	–	USP razred VI, ISO 10993	USP razred VI, ISO 10993
Uporaba v kartuši	konektorji, mrežica	kolektorja, prehodi luer, ohišje (brizganje)	ohišje (MJF)	prototip ohišja (FDM), trn, filter	cevi na črpalkah	preostale cevi

Vir: (Covestro, 2018; HP Development Company, 2018; Professional Plastics, n.d.; Laminated Plastics, n.d.; Saint-Gobain Performance Plastics, n.d.; Saint-Gobain Performance Plastics, 2011)

Na podlagi meril iz tega poglavja in lastnosti iz Tabele 3 je v Tabeli 4 povzeto, zakaj je bil posamezen material izbran na posameznem mestu v kartuši in kakšno vlogo je pri tem imela cena.

Tabela 4: Utemeljitev izbire materialov po mestu uporabe

Material	Mesto uporabe	Ključne zahteve	Razlog izbire	Vloga cene
PA12 (MJF)	ohišje kartuše	togost, natančnost zaskočnih spojev, izdelava brez orodja	skoraj izotropne lastnosti, zadostna trdnost, združljivost s sterilizacijo e-beam;	brez stroška orodja, ugodno pri majhnih količinah

Material	Mesto uporabe	Ključne zahteve	Razlog izbire	Vloga cene
			material ne pride v stik z vzorcem	
PC (Makrolon Rx2530)	ohišje pri brizganju (predvideno)	medicinski razred, togost, sterilizacija	najvišji modul elastičnosti (2400 MPa), primeren za sterilizacijo s sevanjem	nizka cena kosa pri serijski proizvodnji
PC	razdelilna kolektorja, del prehodov na luer	toge tesnilne površine, prozornost	visok modul in dimenzijska stabilnost navojev luer in sedeža ventila, vizualni nadzor pretoka	standardna izvedba kupljenih komponent
PP	večina konektorjev, mrežica kapalne komore	kemijska odpornost, nizka masa	dobra kemijska odpornost na vodne raztopine, nizka gostota	cenovno najugodnejši konektorji pri dobavitelju
Silikon, strjen s platino	cevi na peristaltičnih črpalkah	odpornost na ponavljajoče se stiskanje, prožnost	velik raztezek in nizka trdota, temperaturna obstojnost	dražji od PVC, zato uporabljen le na mestih črpalk
PVC brez DEHP	preostale cevi	prozornost, prožnost, brez izluževanja DEHP	zadostna prožnost, prozornost, plastifikator brez DEHP	cenovno najugodnejša cev za mesta brez črpalke
EVA	vrečke	prožnost, prozornost, zapora za kisik	uveljavljen material za medicinske vrečke	kupljene standardne vrečke

Vir: (Lastni vir)

6.2 *Izbira cevk glede na dimenzije, pretok, fleksibilnost in združljivost s peristaltičnimi črpalkami*

V sistemu so uporabljene tri različne vrste cevi, katerih dimenzije in materiali so bili izbrani na podlagi zahtev, ki izhajajo iz mesta uporabe posamezne cevi znotraj fluidnega sistema, opisanega v poglavjih 4.3 in 4.4.

Cev med vrečkama A in B, izdelana iz silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem, ima notranji premer 4 mm in debelino stene 1,6 mm. Ta premer je bilo treba določiti kot kompromis med dvema nasprotujočima si zahtevama. Po eni strani mora biti cev dovolj široka, da skoznjo lahko prehajajo večji koščki lipoaspirata, ne da bi prišlo do zamašitve, čeprav dejansko najožje mesto na tej poti ne predstavlja cev sama, temveč reducirni nastavek s premerom 3 mm. Prav zaradi tega je bilo treba notranji premer cevi določiti tako, da omogoča prehod koščkov skozi ta reducirni nastavek pri dani hitrosti pretoka in hkrati pripomore k mehanski razgradnji koščkov lipoaspirata, ne da bi pri tem prišlo do zamašitve zaradi prevelikega koščka. Poleg tega je moral biti material biokompatibilen in dovolj fleksibilen, da je cev mogoče brez težav vstaviti v nastavke na ohišju kartuše, opisane v poglavju 5.2, hkrati pa je morala cev ustrezati tehničnim zahtevam peristaltične črpalke Watson Marlow 114 ST DV, ki podpira cevi z debelino stene 1,6 mm v štirih materialih: bioprenu, termoplastičnem elastomeru (TPE), PVC in silikonu, strjenem s platinastim katalizatorjem (Watson-Marlow, n.d.). Čeprav je PVC cenovno najugodnejša izmed teh možnosti in bi bila za enkratno uporabo verjetno dovolj ustrezna, ta material na tem mestu ni bil izbran, saj lipoaspirat na tej cevi neprekinjeno kroži skoraj 25 minut, biokompatibilnost PVC pa je slabša od silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem, proizvajalec pa tudi ni imel dovolj podatkov o obnašanju PVC cevi pri tako dolgotrajni uporabi na tej črpalki.

Na mestih med ventilom 0 in vrečko B ter med ventiloma 4 in 5 je uporabljena cev iz enakega silikona, strjenega s platinastim katalizatorjem, vendar z manjšim notranjim premerom, 2,4 mm, prav tako z debelino stene 1,6 mm. Manjši premer je bil izbran, da se zmanjša izguba volumna tekočine, hkrati pa cev ne sme povzročati čezmerne obremenitve celic. Ker ta črpalka na posameznem mestu deluje neprekinjeno približno 20 minut, je mehanska obraba cevi razmeroma velika, zaradi česar je bila ocenjena, da bi bila za to mesto prevelika za material PVC.

Tretja vrsta cevi je PVC brez dodatka DEHP, prav tako z notranjim premerom 2,4 mm, a s tanjšo steno debeline 0,8 mm. DEHP je plastifikator, ki se pogosto dodaja PVC, da postane ta

mehkejši in bolj gibljiv, saj je nemodificiran PVC pri sobni temperaturi trd in krhek. Ker DEHP v polimer ni kovalentno vezan, lahko sčasoma izloči iz materiala v tekočino, s katero je cev v stiku, pri čemer se to izločanje občutno poveča pri stiku z lipofilnimi (v maščobah topnimi) tekočinami, pri povišani temperaturi in pri daljšem času stika (Horne in drugi, 2009). Glede na to, da gre pri lipoaspiratu za izrazito lipidno bogat vzorec, ki je med postopkom izpostavljen temperaturi 37 stopinj Celzija, uporaba PVC z DEHP na tem mestu ne bi bila ustrezna izbira, zato je bil uporabljen PVC brez tega plastifikatorja. Ta material je bil izbran zaradi ugodnih rezultatov pri testiranju citotoksičnosti ter zadostne fleksibilnosti, ki zagotavlja majhno izgubo volumna, hkrati pa ustreza tudi geometriji priključkov na kapalni komori, tako na njenem zgornjem kot spodnjem delu.

Število različnih vrst cevi v sistemu je bilo namenoma omejeno na te tri, kar poenostavlja sestavljanje kartuše, opisano v poglavju 5.4, glede na to, da sistem že sicer vsebuje veliko število komponent. Zaradi te odločitve na mestu modula z votlimi vlakni ni uporabljena morebiti tehnično ugodnejša, širša cev za shranjevanje tekočine oziroma celic, temveč je bila prednost dana enostavnejši, vnaprej poenostavljeni sestavi celotne kartuše.

Ustreznost izbranih cevi je bila dodatno potrjena tudi z vidika tlaka, ki nastopa v posameznih delih sistema med delovanjem. Ker gre pri celotnem fluidnem sistemu za nizkotlačni prenos tekočine, izračunani tlaki niso zahtevali uporabe posebej ojačenih cevi, kar je dodatno potrdilo ustreznost izbire standardnih, komercialno dostopnih cevi na vseh treh mestih uporabe.

6.3 Primerjava vpliva različnih dimenzij cevk na delovanje sistema

Za povezavo med vrečkama A in B so bili med razvojem preizkušeni štirje različni notranji premeri cevi: 2,4 mm, 3,2 mm, 4,0 mm in 4,8 mm.

Pri premerih 2,4 mm in 3,2 mm je prihajalo do pogostih zamašitev, saj cev ni omogočala prehoda večjih koščkov lipoaspirata, kar je skladno tudi z omejitvijo notranjega premera reducirnega nastavka, opisano v poglavju 6.2. Pri premeru 4,8 mm se je pokazala nasprotna težava: koščki lipoaspirata so pri tako široki dovodni cevi v reducirni nastavek, ki predstavlja najožje mesto na tej poti, vstopali počasneje in manj usmerjeno, kar je zmanjšalo hitrost pretoka skoznjo ter posledično pogostost in intenzivnost stika koščkov s stenami reducirnega nastavka. Ker je prav ta ponavljajoči se stik s koščki izpostavljal strižnim silam, ki jih razgrajujejo, se je pri širšem premeru dovodne cevi mehanska razgradnja koščkov lipoaspirata bistveno poslabšala. Notranji premer 4,0 mm se je izkazal za najustreznejšega, saj je z ustreznim

pretokom skozi reducirni nastavek zagotavljal dovolj pogost in intenziven stik koščkov z njegovimi stenami za učinkovito mehansko razgradnjo, hkrati pa ni prihajalo do zamašitev.

Podobna primerjava je bila izvedena tudi za cev, povezano z modulom z votlimi vlakni, kjer so bile preizkušene tudi cevi širšega premera od trenutno uporabljenega. Rezultati so pri širši cevi na tem mestu pokazali boljše delovanje, vendar je bila, kot je bilo pojasnjeno že v poglavju 6.2, sprejeta odločitev, da se zaradi poenostavitve sestavljanja kartuše in zmanjšanja števila različnih vrst cevi v sistemu prednost nameni enostavnosti pred nekoliko boljšimi rezultati, ki bi jih prinesla dodatna, četrta vrsta cevi.

6.4 Pregled konektorjev, uporabljenih v sistemu

V sistemu je uporabljenih deset različnih tipov konektorjev, ki omogočajo povezovanje cevi, vrečk in preostalih komponent. Vsi uporabljeni konektorji so z materialom in količino na eno kartušo navedeni v kosovnici v Tabeli 2 (poglavje 6.1).

Pri izbiri vseh naštetih konektorjev so bila upoštevana enaka osnovna merila kot pri izbiri cevi in vrečk, opisana v poglavju 6.1: biokompatibilnost, ustrezni rezultati testiranja citotoksičnosti, združljivost z izbrano metodo sterilizacije ter cenovna ugodnost in dobavljivost pri izbranem dobavitelju. Večina konektorjev je izdelana iz polipropilena (PP), medtem ko so nekateri prehodi z nazobčanega priključka na luer priključek izdelani iz polikarbonata (PC). Izbira med tema materialoma je sledila razpoložljivosti ustreznega, cenovno najugodnejšega izdelka pri dobavitelju, vendar sta s strojniškega vidika oba materiala na svojem mestu ustrezna (Tabela 3 in Tabela 4). PC ima približno dvakrat višji modul elastičnosti kot PP (2400 MPa proti približno 1350 MPa) in je prozoren, kar zagotavlja togost navojev luer in omogoča vizualni nadzor pretoka. PP je lažji, cenejši in kemično odporen, kar zadošča za reducirne nastavke in druge nazobčane prehode, ki niso obremenjeni z navojem.

Redukcijski nastavki opravljajo prehod med dvema različnima premeroma cevi in so med seboj namensko ločeni. Večji nastavek (6,4 mm na 4,8 mm) povezuje priključek vrečke s premerom 6,4 mm s cevjo s premerom 4,8 mm, ki se nato zoži na cev s premerom 4,0 mm med vrečkama A in B, opisano v poglavjih 6.2 in 6.3. Ker se ta redukcijski nastavek na svojem koncu zaključi z nazobčanim priključkom, katerega stena dodatno zoži dejansko odprtino, znaša njegov najožji notranji premer 3,2 mm, kar je bilo pri izbiri premera povezovalne cevi upoštevano kot omejujoč dejavnik. Manjši nastavek (4,8 mm na 2,4 mm) je uporabljen na vseh preostalih

mestih v sistemu, kjer je potreben prehod s premera 4,8 mm na 2,4 mm, ne glede na to, ali gre za pot proti silikonski ali PVC-cevi.

Priključki v obliki brezigelnega ventila, opisani že v poglavju 4.4, so v sistemu prisotni v dveh velikostih, s premerom nazobčanega priključka 4,8 mm oziroma 3,2 mm, pri čemer je slednji izveden z dodanim barvnim pigmentom, kar je zgolj posledica izbire pri dobavitelju in ne pomeni funkcionalne razlike med obema izvedbama. Tak ventil ima vgrajeno silikonsko pregrado, ki je v mirovanju zaprta in zadrži tekočino znotraj priključka, ko vanj ni vstavljen moški luer priključek. Šele vstavitev moškega luer priključka pregrado mehansko odpre in omogoči pretok tekočine v obe smeri. Zaradi te dvosmernosti brezigelni ventil ne deluje kot protipovratni ventil, ki bi tok omejeval na eno samo smer, čeprav se v dokumentaciji nekaterih komponent zanj uporablja tudi poimenovanje protipovratni ventil (check valve).

Prehodi z nazobčanega priključka na luer priključek omogočajo povezavo cevi z ženskimi luer priključki na razdelilnih kolektorjih ter z moškimi luer priključki, kjer je to potrebno, kot je opisano v poglavju 4.4.

Posebno vlogo ima Y-konektor, ki se nahaja med razdelilnim kolektorjem in vrečko za končni produkt. Gledano od kolektorja proti vrečki, Y-konektor razdeli pot na dva kraka, pri čemer eden vodi naprej proti vrečki za končni produkt, drugi pa se prek dodatne cevi zaključi z brezigelnim ventilom, ki omogoča dostop do te tekočinske poti. Pri GMP različici kartuše je med Y-konektorjem in priključkom na razdelilnem kolektorju dodatno vgrajen sterilni diskonektor, opisan že v poglavju 3.6, medtem ko ta pri enostavnejši, klinični različici kartuše ni prisoten. Enako velja tudi za priključek za vnos lipoaspirata na vrečki A, kjer je pri GMP različici kartuše prav tako treba dodati sterilni konektor, saj mora biti vsako mesto, kjer se v zaprt sistem vnaša vzorec ali dodatna tekočina, pri tej različici izvedeno tako, da omogoča priklop brez porušitve sterilnosti (European Commission, 2022).

Vtična zamaška se uporabljata na odpadni vrečki, ki je istega tipa kot vrečki za mešanje in ima tako tri priključke, od katerih je pri tej vlogi v uporabi le eden. Preostala dva priključka, s premeroma 4,8 mm in 6,4 mm, sta zamašena z ustreznima zamaškoma, kar preprečuje nenameren dostop do vrečke skozi neuporabljena priključka in hkrati zagotavlja, da tekočina, ki med postopkom priteka v vrečko kot odpad, ostane znotraj nje.

Splošna ustreznost izbranih konektorjev je bila prav tako potrjena z vidika tlaka, ki nastopa znotraj sistema med delovanjem. Ker gre pri celotnem fluidnem sistemu za nizkotlačni prenos tekočine, uporaba bolj zahtevnih, za višje tlake namenjenih rešitev, kot so kovinski konektorji

ni bila potrebna, saj bi taka izbira po nepotrebnem povečala zahtevnost in ceno izdelave kartuše, ne da bi to prineslo dejansko korist pri delovanju sistema. Podrobnejši izračun tlakov v posameznih delih sistema je predstavljen v poglavju 8.

6.5 Izbira peristaltičnih črpalk s koračnimi motorji

Za premikanje tekočine znotraj sistema so bile med možnimi tipi črpalk izbrane peristaltične črpalke, poganjane s koračnimi motorji. Da bi utemeljili to izbiro, je smiselno najprej pojasniti, kako peristaltična črpalka sploh deluje in zakaj je za obravnavano aplikacijo primernejša od drugih pogosto uporabljenih tipov črpalk, kot sta brizgalna in centrifugalna črpalka.

6.5.1 Delovanje peristaltične črpalke

Peristaltična črpalka spada med potisne (pozitivno-izpodrivne) črpalke, pri katerih premikanje tekočine ne poteka prek neposrednega stika mehanizma s tekočino, temveč prek mehanskega stiskanja fleksibilne cevi od zunaj. Glava črpalke ima na vrtečem se rotorju nameščenih več valjčkov, pri uporabljeni črpalki Watson Marlow 114 ST DV, opisani v poglavju 4.3, so ti štirje. Cev je speljana po notranji, ukrivljeni stezi (raceway) znotraj ohišja glave, valjčki pa se med vrtenjem rotorja zaporedoma dotikajo cevi in jo stisnejo ob to stezo, dokler njena notranjost povsem ne kolabira, kar imenujemo okluzija. Ker se valjčki gibljejo po cevi drug za drugim, nastane med njimi na cevi premikajoč se segment popolnoma stisnjene cevi, ki pred seboj potiska ujeto tekočino naprej, za seboj pa, ko se cev po prehodu valjčka spet razširi v prvotno obliko, ustvarja rahel podtlak, ki vase povleče novo količino tekočine iz vira. S ponavljanjem tega cikla, valjček za valjčkom, nastane neprekinjen, a rahlo pulzirajoč pretok tekočine skozi cev (Ferretti in drugi, 2023). Samo stiskanje cevi med valjčkom in nosilno stezo pri tem ni le sredstvo za premikanje tekočine, temveč hkrati prispeva tudi k mehanski razgradnji večjih koščkov lipoaspirata, saj so ti ob prehodu vsakega valjčka izpostavljeni ponavljajočemu se stisku, kar dopolnjuje mehansko razgradnjo, ki poteka tudi na mestu reducirnih nastavkov, opisano v poglavjih 6.2 in 6.3.

Ker tekočina med tem procesom nikoli ne pride v stik z rotorjem, valjčki ali ohišjem črpalke, temveč izključno z notranjostjo cevi, peristaltična črpalka omogoča popolnoma zaprt, kontaminaciji odporen pretok tekočine, kar je bilo za ta sistem ključno že iz razlogov, opisanih v poglavju 3.4. Poleg tega je taka črpalka zmožna prenašati tudi bolj viskozne tekočine in tekočine z večjimi trdnimi delci, kar ustreza naravi lipoaspirata, hkrati pa je delovanje

razmeroma nežno do celic v primerjavi z nekaterimi drugimi tipi črpalk, saj tekočina ni izpostavljena visokim strižnim silam znotraj rotacijskega mehanizma.

6.5.2 Pomen debeline stene cevi

Debelina stene cevi na mestu peristaltične črpalke ni poljubna, temveč mora natančno ustrezati razmiku med valjčkom in nosilno stezo znotraj glave črpalke, tako da je doseženo ravno pravšnje stiskanje cevi. Če je stena cevi pretanka, se cev pod valjčkom ne stisne dovolj, da bi njena notranjost popolnoma kolabirala, zaradi česar tekočina delno steče nazaj mimo mesta stiska, kar zmanjša učinkovitost črpanja in natančnost doziranja. Če je stena predebela, pride do prekomernega stiskanja cevi, kar pospeši utrujenost materiala, skrajša življenjsko dobo cevi in poveča upor, ki ga mora premagovati motor. Debelina stene 1,6 mm, uporabljena pri vseh ceveh na mestih peristaltičnih črpalk v tem sistemu, ustreza razmiku, za katerega je zasnovana glava črpalke Watson Marlow 114 ST DV, s čimer je zagotovljeno tako zanesljivo doziranje kot sprejemljiva življenjska doba cevi (Blue-White Industries, n.d.).

6.5.3 Koračni motor kot pogon črpalke

Rotor peristaltične črpalke poganja koračni motor, izbran namesto drugih možnih tipov motorjev, saj je bila za to aplikacijo potrebna natančnost doziranja tekočine v mililitrih.

Koračni motor je vrsta brezkrtačnega elektromotorja, ki celoten obrat razdeli na velik, natančno določen niz enakih korakov. Vsak posamezen električni impulz, ki ga motor prejme od krmilnika, povzroči vrtenje rotorja za natanko en tak korak, kar pomeni, da je položaj in hitrost vrtenja motorja mogoče zelo natančno določiti zgolj s štetjem poslanih impulzov, brez potrebe po dodatnem senzorju za merjenje dejanskega položaja, kar imenujemo odprtozančno vodenje. Ker je pri peristaltični črpalki preneseni volumen tekočine neposredno sorazmeren s številom obratov rotorja, taka odprtozančna, a natančna kontrola vrtenja omogoča neposreden, predvidljiv nadzor nad dozirano količino tekočine (Stepperonline, n.d.).

Motor, uporabljen v črpalki 114 ST DV, je dvofazni bipolarni koračni motor. Tak motor ima dve ločeni navitji (fazi), ki ju krmilnik izmenično napaja s tokom v obeh smereh, s čimer se ustvarja vrteče se magnetno polje, ki zobati rotor motorja korak za korakom vleče iz enega položaja v naslednjega. Dvofazna bipolarna zasnova je najbolj razširjena in cenovno ugodna

izvedba koračnega motorja, saj za krmiljenje zadostujeta zgolj dva izhodna kanala krmilnika, kar poenostavi elektroniko, hkrati pa taka zasnova zagotavlja dovolj velik navor glede na velikost motorja za zanesljivo delovanje pri nizkih hitrostih, kot jih zahteva ta sistem.

To se razlikuje od navadnega enosmernega motorja, katerega hitrost vrtenja ni podana v natančnih, ponovljivih korakih in niha glede na obremenitev, kar brez dodatnega senzorja položaja ne omogoča natančnega doziranja. Podobno velja tudi za brezkrtačni enosmerni motor (BLDC), ki sicer v primerjavi z navadnim enosmernim motorjem doseže višji izkoristek in daljšo življenjsko dobo, saj za komutacijo namesto mehanskih krtačk uporablja elektronsko krmiljenje, vendar je prav tako zasnovan predvsem za neprekinjeno vrtenje pri nastavljeni hitrosti, ne pa za natančno štetje in ponovljivo izvajanje diskretnih korakov, kar bi za doseganje natančnega doziranja zahtevalo dodaten dajalnik položaja.

Prednost koračnega motorja se v tem sistemu odraža tudi v njegovi zmožnosti hitrega in natančnega spreminjanja hitrosti vrtenja. Med fazo mešanja, opisano v poglavju 4.2, črpalka ob posameznih prehodih tekočine med vrečkama doseže hitrost tudi do 400 vrtljajev na minuto, nato pa se skoraj takoj ustavi, ne da bi zaradi vztrajnosti prišlo do izgube nadzora nad prenešenim volumnom. Tovrsten hiter prehod med visoko hitrostjo in popolnim mirovanjem je mogoč prav zaradi odprtozančnega, korakovnega vodenja motorja, saj krmilnik v vsakem trenutku natančno pozna položaj rotorja, ne glede na to, kako hitro se je ta pred tem vrtel.

Ker v tem sistemu ni bilo potrebe po visoki dinamiki ali hitrih spremembah obremenitve, temveč predvsem po natančnem, ponovljivem doziranju znanih volumnov tekočine pri razmeroma nizkih hitrostih, se je koračni motor s svojim vgrajenim, korakovno natančnim pozicioniranjem izkazal za ustrezno in stroškovno ugodnejšo izbiro.

6.5.4 Primerjava z brizgalno in centrifugalno črpalko

V primerjavi z brizgalno črpalko, katere omejitve smo podrobno obravnavali že v poglavjih 3.3 in 3.4 (drseče tesnilo bata kot tveganje za kontaminacijo, omejen volumen, obraba gumijastega bata), ima peristaltična črpalka prednost predvsem v tem, da omogoča neprekinjeno, poljubno dolgo pretakanje tekočine brez potrebe po ponovnem polnjenju, hkrati pa v celoti odpravi tveganje, povezano z drsečimi tesnili.

Centrifugalna črpalka, ki premika tekočino s pomočjo vrtečega se rotorja (impelerja) znotraj ohišja, v tem sistemu ni bila primerna izbira iz več razlogov. Rotor take črpalke je vedno v

neposrednem stiku s tekočino, kar bi pomenilo dodatno komponento, ki bi jo bilo treba zasnovati kot del kartuše za enkratno uporabo, kar dodatno zaplete zasnovo in poveča strošek. Poleg tega centrifugalne črpalke niso primerne za prenos viskoznih tekočin z večjimi trdnimi delci, saj lahko taki delci poškodujejo rotor ali se zataknejo znotraj ohišja črpalke, prav tako pa hitro vrteči se rotor tekočino izpostavlja večjim strižnim silam, kar bi škodilo vitalnosti celic. Centrifugalne črpalke so zato bolj primerne za prenos velikih količin manj občutljivih tekočin pri visokih, neprekinjenih pretokih, ne pa za natančno, nadzorovano doziranje manjših volumnov občutljivega biološkega vzorca, kot je to potrebno v tem sistemu (Cole-Parmer, n.d.).

6.6 Vloga razdelilnih kolektorjev pri preklapljanju tekočinskih poti

Razdelilna kolektorja, uporabljena v sistemu, sta izdelana iz polikarbonata (PC), kar je eden od materialov, ki jih proizvajalec Elcam Medical za to družino izdelkov (petportni kolektor SafePort) ponuja kot standardno možnost.

Preklapljanje toka na posameznem ventilu kolektorja temelji na vrtljivem delu z izvrtino v obliki narobe obrnjene črke T, ki ga glede na trenutni zasuk poganja pripadajoči servo motor prek nastavka, opisanega v poglavju 5.6. Zasuk tega vrtljivega dela omogoča več različnih kombinacij odprtih in zaprtih poti na istem ventilu. V tovarniškem, izhodiščnem položaju (0 stopinj), ko je T obrnjen narobe, so odprte vse tri smeri hkrati, torej zgornja pot ter obe stranski poti, levo in desno. Pri zasuku za 45 stopinj v desno se stranski priključek zapre, medtem ko pri zasuku za 90 stopinj vrtljivi del zavzame obliko črke I, kar omogoča pretok samo med zgornjo in desno potjo. Pri zasuku za 180 stopinj je zgornja pot zaprta s prečnim delom T, tako da je omogočen pretok samo vzdolž ravne osi ventila, torej med obema stranskima potema. Zasuk za 270 stopinj ustreza enaki konfiguraciji kot pri 90 stopinjah, le v nasprotni smeri, torej z omogočenim pretokom med zgornjo in levo potjo. S kombinacijo teh petih možnih položajev je mogoče na vsakem posameznem ventilu natančno določiti, med katerima od treh priključenih poti tekočina teče, kar omogoča zelo natančen nadzor nad celotnim potekom tekočine skozi sistem v vseh fazah procesa, opisanih v poglavju 4.2.

Odločitev za uporabo enotnega razdelilnega kolektorja s petimi ventili, namesto na primer petih ločenih, samostojnih ventilov (kot so pinch ventili), izvira sicer še iz izhodiščne zasnove naprave, opisane v poglavju 3.2, vendar se je pri prilagoditvi sistema za izolacijo SVF izkazala kot ustrezna tudi za nove zahteve. Kolektor kot ena sama, sestavljena komponenta omogoča lažjo vgradnjo v napravo v primerjavi z desetimi ločenimi ventili, saj gre za eno samo mesto pritrditve namesto več ločenih, prav tako pa zmanjšuje število potrebnih medsebojnih povezav

in s tem poenostavi sestavljanje kartuše. Ne glede na to, ali bi bili ventili združeni v kolektor ali izvedeni ločeno, bi jih bilo treba med seboj in s preostalimi komponentami sistema tako ali tako povezati s cevmi, zato je uporaba enega kompaktnega kolektorja namesto več ločenih delov predstavljala smiselno poenostavitev.

6.7 Izbira in vključitev silikonskih grelnih elementov

Grelni element je sestavljen iz nosilca, na katerega je grelec pritrjen z lepilom, čez njega pa je nameščena inox plošča. Taka zgradba je izvedena na obeh straneh grelca, saj ima ta vgrajena vratca, med katera se namesti kartuša z vrečkama A in B.



Slika 16: Prikaz notranjosti grelnega sklopa z odprtimi vratci
Vir: (Lastni vir)

Ob namestitvi kartuše se vratca grelca najprej odprejo z lastnim mehanizmom, nato pa se kartuša vpne na stiske na obeh straneh grelca, ki jo tam pridržijo. Ko so vratca po namestitvi kartuše ponovno zaprta, vrečki A in B neposredno nalegata na inox plošči na obeh straneh grelca. Mehanizem za odpiranje in zapiranje vratc ima pri tem dvojno vlogo, saj poleg samega odpiranja in zapiranja skrbi tudi za to, da med delovanjem ves čas vzdržuje stalen, tesen stik med inox ploščama in vrečkama. Tak neposreden in stalen stik je pomemben zato, ker je prevajanje toplote (kondukcija) med dvema telesoma najbolj učinkovito prav takrat, ko sta si

telesi v neposrednem in tesnem stiku, medtem ko se toplota, ki tako prehaja iz grelca prek inox plošče v vrečko, znotraj same tekočine naprej širi s konvekcijo. Vrečki sta pri tem stisnjeni druga ob drugo, njuna vsebina pa se med fazo mešanja, opisano v poglavju 4.2, neprekinjeno izmenično prehaja iz ene v drugo, tako da je v posameznem trenutku ena vrečka bolj polna, druga bolj prazna, njuno razmerje pa se s ponavljajočim se pretakanjem ves čas spreminja.

Inox plošči nista namenjeni le prenosu toplote, temveč tudi lažjemu čiščenju naprave ter zakrivanju kablov in preostale elektronike znotraj grelca pred neposredno izpostavljenostjo okolju.

Za material samega grelnega elementa je bil izbran silikon, in sicer iz več razlogov hkrati: silikon je dovolj dober toplotni prevodnik za to aplikacijo, je cenovno ugoden in zlahka dostopen material, hkrati pa je omogočal enostavno, nezapleteno konstrukcijsko rešitev. Grelec ima vgrajen tudi lasten temperaturni senzor, ki je del zanke PID (proporcionalno-integralno-derivativne) regulacije, s katero naprava natančno vzdržuje ciljno temperaturo 37 stopinj Celzija.

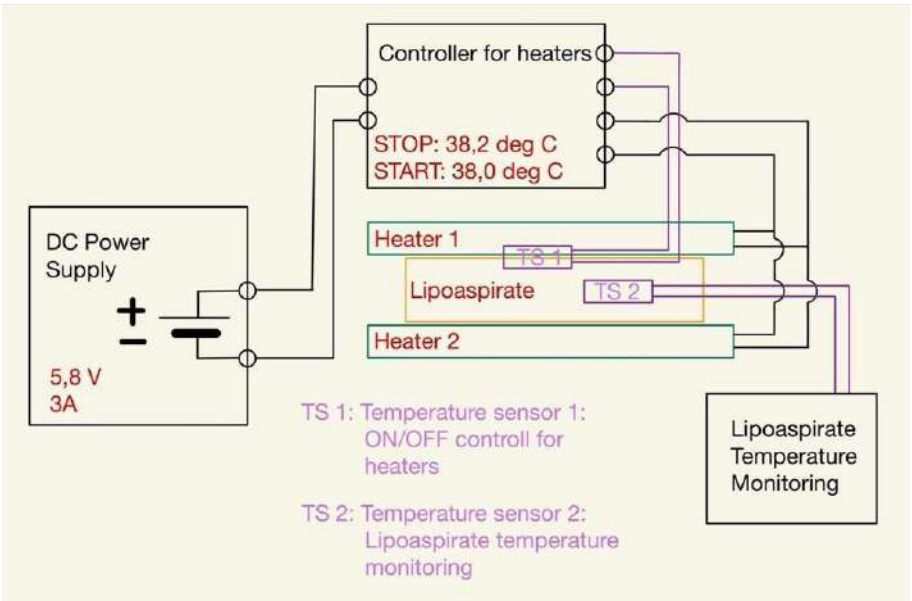
Sistem ogrevanja ima dve neodvisni ravni varnosti pred pregrevanjem. Programska oprema je nastavljena tako, da samodejno prekine napajanje grelca takoj, ko izmerjena temperatura doseže 50 stopinj Celzija, ne glede na to, v kateri fazi procesa se naprava nahaja. Poleg te programske zaščite je v sistem vgrajena tudi termična varovalka, ki pri temperaturi 60 stopinj Celzija prekine tokokrog neodvisno od programske opreme; v nasprotju s klasično, enkratno varovalko gre za resetljivo izvedbo, ki po ohladitvi znova omogoči delovanje. Ta dodatna, strojna zaščita je pomembna predvsem kot varovalo v primeru okvarjenega temperaturnega senzorja, ko se programska oprema ne bi mogla zanesti na njegove meritve.

Slika 17 prikazuje CAD-model grelnega sklopa z vratci in vrtljivim zapiralom, s katerim se vratca zaprejo in inox plošči pritisneta ob vrečki A in B.



Slika 17: CAD model grelnega sklopa z vratci in zapiralom
Vir: (Lastni vir)

V zgodnji fazi razvoja je bilo ogrevanje izvedeno z enostavnejšo dvopoložajno (vklop/izklop) regulacijo, prikazano na Sliki 18. Dva grelca sta obdajala vzorec, temperaturni senzor TS1 ob grelcu je krmilil vklop in izklop grelcev (vklop pri 38,0 °C in izklop pri 38,2 °C), ločen senzor TS2 v vzorcu pa je služil samo za spremljanje dejanske temperature lipoaspirata. Ločeno merjenje temperature grelca in vzorca je bilo uporabljeno tudi pri preverjanju kasnejših izvedb (poglavje 7.3), sama regulacija pa je bila v sedanji izvedbi nadgrajena v regulacijo PID s senzorjem, vgrajenim v grelec.



Slika 18: Blok shema zgodnje izvedbe ogrevanja z dvopoložajno regulacijo in ločenim merjenjem temperature vzorca
Vir: (Lastni vir)

6.8 *Vloga kapalne komore in mrežice pri zadrževanju večjih delcev maščobnega tkiva*

Znotraj kapalne komore je nameščen valjast mrežni vložek, obešen v zgornjem delu notranjosti komore, skozi katerega mora tekočina pri prehodu iz zgornjega proti spodnjemu priključku preiti radialno, torej skozi njegovo cilindrično steno. Taka oblika je bila izbrana namenoma, saj valjasta geometrija v primerjavi z ravno, vodoravno nameščeno mrežico enakega premera ponuja bistveno večjo skupno filtrirno površino. Pri ravni mrežici na dnu komore bi se namreč koščki maščobnega tkiva sčasoma nabirali neposredno na omejeni površini, kar bi hitro zmanjšalo prehodnost in povečalo tveganje za zamašitev, medtem ko valjasta oblika to tveganje zmanjšuje, saj tudi delna zamašitev dela površine ne prepreči pretoka skozi preostanek mrežice.

Po fazi mešanja in dodajanju Ringerjeve raztopine, opisani v poglavju 4.2, se vsebina vrečk A in B loči na plasti, pri čemer se za nadaljnjo obdelavo odvzame spodnja, tekočinska plast, ki se v strokovni literaturi o obdelavi lipoaspirata označuje kot infranatant in vsebuje sproščene celice (Cleveland in drugi, 2015). Čeprav gre za tekočinsko plast, ta še vedno vsebuje manjše ostanke vlaken in tkiva, ki bi lahko zamašili modul z votlimi vlakni, če jih pred tem ne bi odstranili. Prav to je osrednja vloga kapalne komore in vgrajenega mrežnega vložka v njej: mrežica iz polipropilena (PP) z velikostjo por 200 mikronov zadrži delce, večje od te vrednosti, preden tekočina nadaljuje pot proti modulu z votlimi vlakni.

Med razvojem je bila preizkušena tudi mrežica z velikostjo por 100 mikronov, vendar so bili poskusi s to različico omejeni zaradi pomanjkanja zaloge tega materiala in drugih razvojnih prioritet, zato podrobnejša primerjava ni bila izvedena. Rezultati enega izmed opravljenih poskusov so sicer nakazovali, da bi mrežica s 100-mikronskimi porami lahko dosegla še boljše rezultate, vendar to ni bilo dodatno potrjeno, zato je bila za trenutno različico sistema obdržana mrežica z velikostjo por 200 mikronov. Vloga kapalne komore je v tem koraku procesa omejena izključno na filtriranje delcev, večjih od 200 mikronov, ne opravlja pa pri tem še kakšne dodatne funkcije.

Kapalna komora je v postopek koncentriranja vključena dvakrat, in sicer enkrat ob prenosu glavnine infranatanta proti modulu z votlimi vlakni, drugič pa ob zaključnem izpiranju z dodatno Ringerjevo raztopino. Namen te druge vključitve je zajeti celice, ki bi med prvim prehodom skozi komoro in mrežni vložek morda ostale ujete na njem, ne da bi dosegle nadaljnjo pot proti koncentriranju. Poleg tega je kapalna komora, tako kot preostali fluidni sistem, že pred začetkom teh dveh korakov napolnjena z Ringerjevo raztopino v okviru predhodnega polnjenja

sistema, opisanega v poglavju 4.2, s čimer je zagotovljeno, da v njej ob začetku procesa ni prisotnega zraka. Natančen potek in časovnica obeh vključitev kapalne komore v postopek koncentriranja sta podrobneje predstavljena v poglavju 7.

6.9 Izbira modula z votlimi vlakni za koncentriranje celic in odstranjevanje encima

6.9.1 Delovanje modula z votlimi vlakni

Modul z votlimi vlakni deluje na principu tangencialne pretočne filtracije (angl. tangential flow filtration, TFF), pri kateri vhodna tekočina teče vzporedno s površino polprepustne membrane, namesto neposredno vanjo, kot je to značilno za čelno filtracijo (angl. normal flow filtration). Gonilna sila prehoda tekočine skozi membrano je razlika tlaka med obema stranema membrane, imenovana transmembranski tlak. Pod njenim vplivom del tekočine, skupaj z raztopljenimi snovmi in delci, manjšimi od velikosti por membrane, membrano prečka; ta del imenujemo permeat. Preostanek tekočine, ki vsebuje delce, prevelike za prehod skozi pore, membrane ne prečka in ga imenujemo retentat.

V modulu z votlimi vlakni je membrana oblikovana kot snop tankih, vzporednih votlih vlaken, katerih konca sta vlita v skupno cilindrično ohišje. Vhodna tekočina teče po notranjosti vlaken, imenovani lumen, retentat pa zapušča modul na nasprotnem koncu lumna. Permeat, ki membrano prečka radialno navzven, skozi steno vlakna prehaja v prostor med vlakni in zunanjim ohišjem, od koder je odveden skozi ločen priključek modula.

Ker tekočina znotraj lumna teče vzdolž membrane, nastali strig ob njeni površini sproti prepreči kopičenje zadržanih delcev na membrani, do katerega bi sicer prišlo, saj se tovrstno kopičenje pri čelni filtraciji neprekinjeno povečuje neposredno na filtrski površini in postopoma zvišuje upor filtracije. Ta lastnost je bila eksperimentalno potrjena tudi za module z votlimi vlakni, kjer je bilo pri koncentriranju raztopine beljakovin doseženo neprekinjeno delovanje modula več kot 120 ur brez zaznavnih znakov zamašitve membrane (Yehl in Zydney, 2020). Ker uporabljena membrana modula Plasmart 50 zadržuje delce, večje od 0,2 mikrona, torej ne glede na njihovo molekulsko maso, gre za obliko tangencialne mikrofiltracije, ki jo od ultrafiltracije loči prav to, da je merilo zadrževanja velikost por, ne molekulska masa.

6.9.2 Izbrani modul in njegove specifikacije

V sistemu je uporabljen modul Plasmart 50 proizvajalca Medica S.p.A., prvotno namenjen ločevanju krvne plazme pri postopkih afereze. Modul uporablja membrano iz polietersulfona (PES), z vlakni notranjega premera 300 mikronov, zunanjega premera 470 mikronov in debeline stene 85 mikronov, pri skupni filtrirni površini 0,05 kvadratnega metra in dolžini vlaken 127 milimetrov. Notranja prostornina vlaken znaša 3,9 mililitra, modul pa je zasnovan za največji pretok do 50 mililitrov na minuto in največji transmembranski tlak do 100 mmHg. Ohišje modula je izdelano iz kopoliestra brez dodatka bisfenola A (BPA) ali polikarbonata (Medica S.p.A., n.d.). Modul je dobavljiv v dveh različicah glede na način sterilizacije, in sicer z etilenoksidom ali z obsevanjem z visokoenergijskim elektronskim curkom, znanim tudi kot beta žarki oziroma e-beam (Medica S.p.A., n.d.). Za sistem je bila izbrana različica, sterilizirana z metodo e-beam, saj je ta skladna s sterilizacijsko strategijo, uveljavljeno za preostale komponente kartuše, med njimi tudi za material ohišja, izbran v poglavju 5.3. Velikost por membrane, uporabljene za zadrževanje celic v tem sistemu, znaša 0,2 mikrona, kar je dovolj majhno, da učinkovito zadrži vse celice v retentatu, hkrati pa dovolj veliko, da raztopljen encim in preostala tekočina prosto prehajata v permeat.

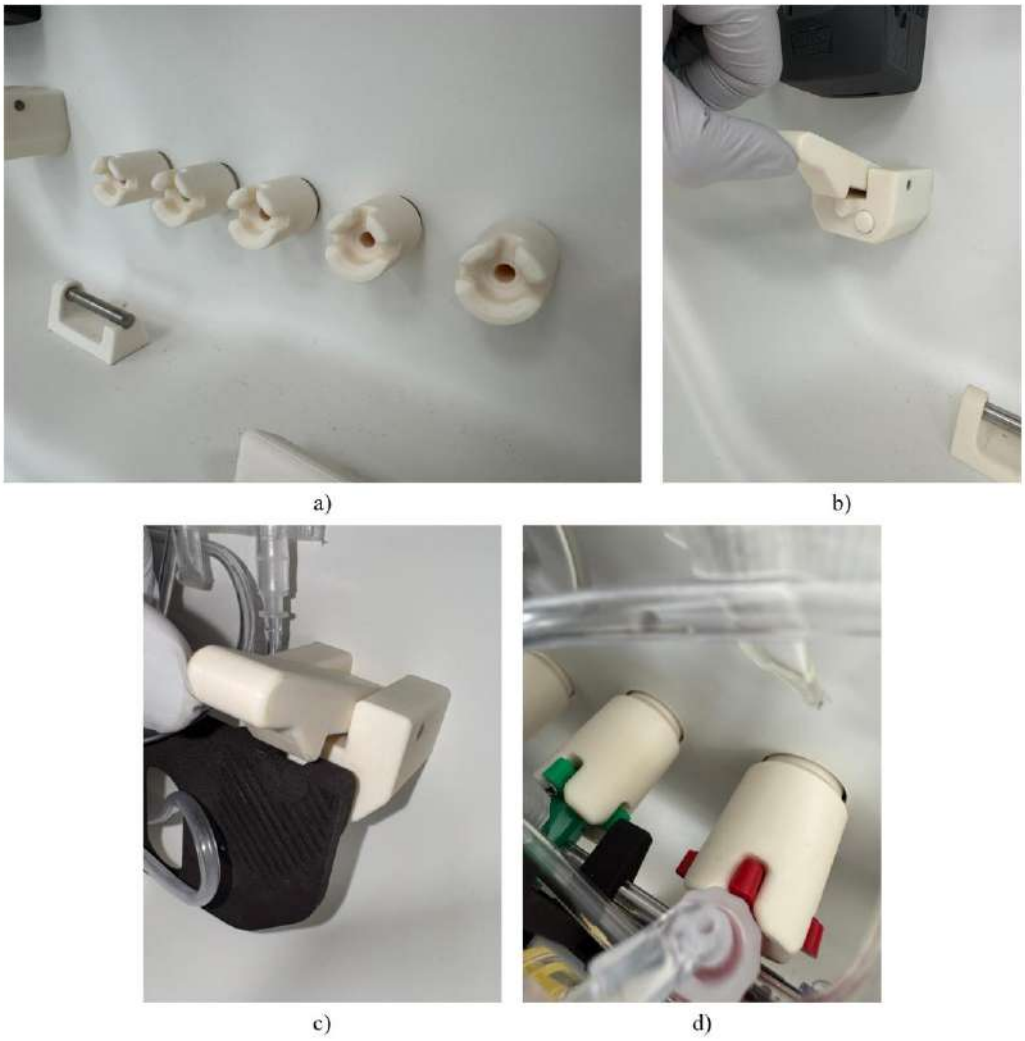
Modul, čeprav prvotno namenjen za povsem drugačno aplikacijo, je bil za uporabo v tem sistemu izbran predvsem zato, ker je bil med primerjanimi alternativami cenovno najugodnejši, hkrati pa je v praktičnem testiranju dosegal boljše rezultate od preostalih preizkušenih modulov. Med zgodnjim razvojem je bil preizkušen tudi modul z manjšo filtrirno površino in manjšim premerom vlaken, vendar se razvoj v to smer ni nadaljeval, saj se je izkazalo, da trenutno izbrani modul Plasmart 50 bolje ustreza zahtevam sistema.

7 PROCESNI SKLOPI IZOLACIJE SVF V ZAPRTEM SISTEMU

7.1 Priprava sistema in predhodno izpiranje kartuše z Ringerjevo raztopino

Priprava sistema se začne, še preden uporabnik sploh zažene izbrani program. Po odprtju sterilne embalaže, v kateri je shranjena kartuša, in odstranitvi kartuše iz embalaže uporabnik na napravi pritisne gumb za začetek. Naprava nato od uporabnika zahteva vnos identifikacijske kode cikla, ki se ujema s kodo, natisnjeno na embalaži in na zunanji škatli kartuše, kar omogoča sledljivost posamezne kartuše skozi celoten postopek. Sledi izbira enega izmed treh razpoložljivih ciklov, ki se med seboj razlikujejo po volumnu lipoaspirata (40, 100 ali 120 mL). Šele po tej izbiri uporabnik kartušo pravilno namesti v napravo, kot je opisano v poglavju 5.5. Takoj ko naprava zazna pravilno nameščeno kartušo, se vsi ventili na obeh razdelilnih kolektorjih samodejno zaprejo. Na zaslonu se nato izpiše poziv, naj uporabnik v vrečko A skozi njen namenski priključek vnese predhodno izbrani volumen lipoaspirata, hkrati pa na napravo obesi zunanjo vrečko oziroma plastenko Ringerjeve raztopine in jo poveže z ustreznim priključkom na kartuši. Šele ko je ta priprava zaključena, je mogoče dejansko zagnati izbrani program, s čimer se prične samodejno izvajanje spodaj opisanega zaporedja.

Slika 19 prikazuje zaporedje namestitve kartuše, ki sledi prikazu zaprte in odprte naprave na Sliki 1 ter notranjosti naprave brez kartuše na Sliki 16. Na steni naprave so nameščeni viličasti nastavki servo motorjev, po eden za vsak ventil razdelilnih kolektorjev (a). Ob vstavljanju kartuše je zapah v dvignjenem, odprtem položaju (b). Ko je kartuša zavrtena v navpični delovni položaj, zapah pod vplivom vzmeti zdrsne čez rob ohišja in kartušo zaklene (c). Hkrati se ročice ventilov zataknejo v nastavke servo motorjev (d), zato lahko naprava takoj po zaznavi kartuše zapre vse ventile. Sledita vnos lipoaspirata in priklop Ringerjeve raztopine, ob zagonu programa pa se najprej vklopi grelni sklop.



Slika 19: Zaporedje namestitve kartuše: (a) nastavki servo motorjev za ventile brez kartuše; (b) zapah v odprtem položaju; (c) zapah v zaprtem položaju na ohišju kartuše; (d) nastavki servo motorjev, ki primejo ročice ventilov
Vir: (Lastni vir)

Ob zagonu programa se najprej aktivira grelni sistem, opisan v poglavju 6.7, ki začne segrevati proti ciljni temperaturi 37 stopinj Celzija. V tem času, ki traja približno tri minute, so vsi ventili še vedno zaprti, tekočina po sistemu torej še ne kroži. Ta čakalna doba hkrati pomeni dodaten čas predgrevanja za lipoaspirat, ki je v tem trenutku že v vrečki A, kar dodatno pripomore k zmanjšanju njegove viskoznosti še pred fazo mešanja, opisano podrobneje v poglavju 4.2.

Po preteku treh minut se začne dejanski postopek predhodnega polnjenja sistema z Ringerjevo raztopino. V prvi fazi se ventil 1 zasuka tako, da se njegov zgornji priključek, povezan z zunanjo vrečko Ringerjeve raztopine, odpre proti levi, torej proti ventilu 0. Ventil 0 pri tem deluje kot čist prehod med to potjo in svojim levim robnim priključkom, na katerega je vezan zgornji del kapalne komore, medtem ko njegov lastni zgornji priključek, ki sicer prek druge črpalke vodi do vrečke B, v tej fazi ostane zaprt. Ringerjeva raztopina tako steče v kapalno komoro, od tam pa skozi njen spodnji priključek do ventila 2, ki tok usmeri naprej proti ventiloma 3 in 4. Ventil

3, povezan z levo stranjo modula z votlimi vlakni, je v tej fazi nastavljen zgolj za prehod tekočine mimo modula, brez preusmeritve vanj. Ventil 4 tok usmeri naprej proti tretji peristaltični črpalki, ki tekočino prek povezovalnega segmenta pripelje do drugega razdelilnega kolektorja. Na tem kolektorju ventil 5 svoj zgornji priključek, na katerega prihaja tok iz črpalke, odpre proti desni, ventili 6, 7 in 8 pa delujejo zgolj kot prehod. Ventil 9 nazadnje tok usmeri proti desni, torej proti odpadni vrečki, medtem ko njegov zgornji priključek, namenjen vrečki za končni produkt, ostane neuporabljen. Ta prva faza predhodnega polnjenja tako zajame najdaljšo pot v sistemu, tisto, ki vključuje kapalno komoro. Za popolno odstranitev zraka po tej poti se prečrpa 20 mL Ringerjeve raztopine pri hitrosti 100 vrtljajev na minuto.

Ko je ta dolga pot napolnjena, se ventili preklopijo tako, da Ringerjeva raztopina iz zunanje vrečke steče neposredno, brez prehoda, skozi kapalno komoro, v manjšo vrečko s prostornino 50 mL pri ventilu 6. Ker so cevke na tej krajši poti po zaključku prve faze že napolnjene s tekočino brez zraka, se ta korak lahko izvede pri višji hitrosti črpalke, kar zmanjša tveganje, da bi na stenah cevk ostali manjši mehurčki zraka, hkrati pa skrajša skupni čas priprave, kar je pomembno, saj mora celoten postopek pri 40-mililitrskem ciklu trajati največ približno 50 minut. Vrečka pri ventilu 6 se v tej fazi v celoti napolni s 50 mL Ringerjeve raztopine, kar je potrebno za naslednji korak, izpiranje modula z votlimi vlakni.

Ko je vrečka pri ventilu 6 polna, se ventili nastavijo v podobno konfiguracijo, kot se kasneje uporablja med fazo koncentriranja, opisano v poglavju 7.9, le da se v tem primeru najprej odpre zgornji izhodni priključek modula, ventil 8, medtem ko priključek na desni strani modula, ventil 7, ki bi sicer omogočil prost izhod tekočine, ostane zaprt. Taka zaporedna nastavitev ventilov prisili tekočino, da modul napolni od spodaj navzgor, saj vstopa skozi približno 2 mm širok vhodni priključek na spodnji levi strani modula. Zaradi te geometrije polnjenja se preostanek ujetega zraka ne more umakniti proti desni strani modula, temveč ostane ujet v zgornjem levem delu modula, medtem ko se večina preostalega zraka izloči skozi odprt zgornji izhodni priključek. Za ta korak se porabi 40 mL od skupno 50 mL Ringerjeve raztopine v vrečki.

Po zaključku tega koraka se zgornji izhodni priključek modula zapre, preostalih 7 mL Ringerjeve raztopine iz vrečke pri ventilu 6 pa se prečrpa skozi priključek na desni strani modula proti odpadni vrečki. Namenoma se ne porabi celotnih preostalih 10 mL, temveč le 7 mL, s čimer se prepreči, da bi zrak iz zgornjega, praznega dela vrečke znova vstopil v sistem.

V zadnjem koraku predhodnega polnjenja se vsi doslej odprti priključki zaprejo, nato pa se znova odpreta ventila 0 in 1, kar v sistem spusti dodatnih 20 mL Ringerjeve raztopine. Od tega

5 mL ostane v cevki med ventilom 0 in vrečko B, preostalih 15 mL pa se prek povezovalne cevke prečrpa iz vrečke B v vrečko A, s čimer sta obe vrečki tik pred začetkom mešanja povezani s tekočino brez zraka. S tem je celoten postopek predhodnega polnjenja zaključen, njegovo skupno trajanje pa znaša približno tri minute.

Namen odstranjevanja zraka iz celotnega fluidnega sistema pred vsakim ciklom izolacije je dvojen. Prvič, tekočina je, v nasprotju z zrakom, praktično nestisljiva, kar sistemu omogoča, da prek nadzorovanega delovanja črpalk natančno določa premaknjeni volumen na posameznem mestu, medtem ko bi prisotnost stisljivega zraka to razmerje med vrtljaji črpalke in dejansko premaknjenim volumnom naredila nepredvidljivo. Drugič, odsotnost zraka v sistemu zmanjša tveganje poškodb celic, saj lahko mehurčki zraka, ujeti v cevkah, ob gibanju povzročajo lokalne mehanske obremenitve na stiku med zrakom in tekočino, kar je v bioprocesni industriji povezano s poškodbami in odmiranjem celic (Chisti, 2001). Poleg tega bi neprimerno napolnjena kapalna komora ali nezadostno napolnjen modul z votlimi vlakni lahko med kasnejšim delovanjem sistema onemogočila njuno pravilno delovanje, saj vlakna modula za učinkovito filtracijo potrebujejo, da je celoten notranji volumen napolnjen s tekočino.

7.2 Vnos maščobnega tkiva in encima v vrečko

Vrečka A ima za namen vnosa vzorca dva ločena priključka, ki se med seboj razlikujeta glede na to, kaj je skozi njiju namenjeno vnašati v sistem. Priključek, namenjen vnosu lipoaspirata, je preprost silikonski priključek tipa luer, brez kakršnegakoli filtra, saj bi filter, ki bi zaustavljal delce v velikostnem razredu celic, neizogibno zaustavil tudi sam vzorec. Drugi priključek, namenjen opcijskemu vnosu encima, pa je sestavljen iz zaporedja treh elementov: zunanjega priključka tipa female luer, takoj za njim vgrajenega filtra z velikostjo por 0,2 mikrona, ki ima na svoji zunanji strani priključek male luer, na notranji strani pa je speljan naprej do priključka na sami vrečki. Tak filter zagotavlja, da vsaka tekočina, ki jo uporabnik skozi ta priključek vbrizga od zunaj, pred vstopom v sicer zaprt sistem prehaja skozi sterilizacijsko filtracijo, s čimer se ohranja sterilnost vrečke A, kljub temu da gre za ročno dodajanje snovi iz okolice.

Odločitev, ali se pri posameznem ciklu izolacije uporabi encim, je v celoti prepuščena uporabniku sistema, glede na to, kateremu izolacijskemu protokolu sledi. Sistem sam po sebi ne predpisuje niti vrste niti koncentracije encima, temveč zgolj zagotavlja pot za njegov vnos v primeru, da se uporabnik zanj odloči. Če se uporabnik odloči za encimsko izolacijo, encim pred vnosom sam resuspendira v 5 mL Ringerjeve raztopine in tako pripravljeno mešanico vbrizga

skozi opisani filtrirni priključek. Pri mehanski izolaciji, torej brez uporabe encima, ta priključek ostane povsem neuporabljen, skozenj pa se ne vnese niti sama Ringerjeva raztopina.

Oba vnosa, lipoaspirata skozi prvi priključek in po potrebi encima skozi drugega, uporabnik izvede na istem koraku priprave sistema, torej še pred zagonom programa, hkrati z obešanjem in priklopom zunanje vrečke Ringerjeve raztopine, kot je opisano v poglavju 7.1. Med seboj si vnosa ne sledita v določenem vrstnem redu, saj gre za dva neodvisna priključka na isti vrečki.

Način fizičnega vnosa se razlikuje glede na različico kartuše. Pri kartuši, namenjeni uporabi v operacijskem okolju, uporabnik lipoaspirat vnese z navadno brizgo, opremljeno s priključkom male luer, ki jo privije na priključek na kartuši, izprazni njeno vsebino v vrečko A, nato pa jo odvije in odvrže med biološke odpadke. Pri kartuši, izdelani skladno z zahtevami dobre proizvodne prakse, pa je za enak korak potreben dodaten, drugi del sterilnega konektorja, ki ga uporabnik pred vnosom pripne na priključek kartuše, s čimer nastane sterilna povezava med brizgo in vrečko A. Po opravljenem vnosu se s pripadajočim sterilnim diskonektom brizga skupaj s priključenim delom konektorja odstrani, ne da bi se pri tem prekinila sterilnost zaprtega sistema. Ta korak je pri tej različici kartuše nujen, saj privita brizga sicer fizično ne bi dopuščala zapiranja pokrova naprave.

7.3 Ogrevanje vzorca na 37 °C med encimsko obdelavo

Izbira temperature 37 stopinj Celzija za segrevanje vzorca med postopkom izolacije ni naključna, temveč izhaja iz treh medsebojno povezanih razlogov, ki skupaj določajo tako spodnjo kot zgornjo mejo primernega temperaturnega območja.

Prvi razlog je fiziološka ustreznost te temperature za same celice. Gre za temperaturo, ki ustreza notranjemu okolju človeškega telesa, torej okolju, v katerem celice, ki sestavljajo stromalno vaskularno frakcijo, normalno delujejo; 37 stopinj Celzija je zato temperatura, pri kateri večina sesalskih celičnih linij dosega optimalno rast in vitalnost, medtem ko celice razmeroma majhno in kratkotrajno preseganje te vrednosti prenašajo bistveno slabše kot enako odstopanje navzdol (ATCC, n.d.). Zaradi tega se ta temperatura uveljavlja kot standardna izbira tudi v uveljavljenih protokolih izolacije SVF, kot je bilo že omenjeno v poglavju 2.3. Zgornja meja segrevanja v tem sistemu zato ni določena z željo po še hitrejšem delovanju encima, temveč z ohranjanjem celic znotraj njim varnega temperaturnega razpona, sistem pa namenoma ne teži k višjim temperaturam, temveč ostaja pri fiziološko preverjeni vrednosti. Dodatna varnostna meja je

zagotovljena tudi na ravni same programske in strojne opreme grelnega sistema, kot je opisano v poglavju 6.7.

Drugi razlog je narava lipoaspirata kot nenewtonske tekočine, katere viskoznost ni konstantna, temveč se spreminja glede na razmere, med drugim tudi glede na temperaturo. Maščobno tkivo je sestavljeno pretežno iz trigliceridov, ki pri sobni temperaturi delno ostajajo v bolj kristalinični, torej trši obliki, s segrevanjem proti telesni temperaturi pa postopoma prehajajo v bolj tekočo obliko (Yanina in drugi, 2023). Ta fazni prehod neposredno vpliva na to, kako lahko se lipoaspirat pretaka skozi cevke in priključke ter kako enostavno ga je mehansko razgraditi med fazo mešanja, opisano v poglavju 4.2, saj tršo, hladnejšo tkivo pri enaki mehanski obremenitvi nudi večji upor pretakanju kot tkivo, ogreto na 37 stopinj.

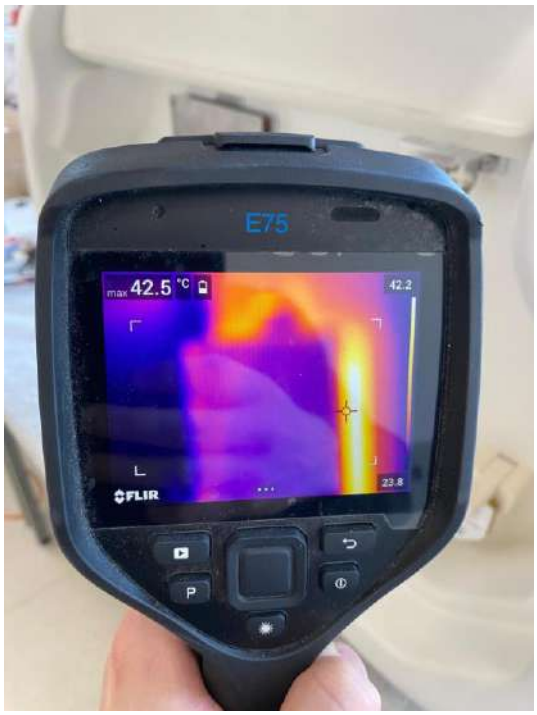
Tretji razlog je temperaturni optimum za delovanje kolagenaze, encima, uporabljenega pri encimski izolaciji, katerega vloga je bila že opisana v poglavju 2. Aktivnost kolagenaze je najvišja v temperaturnem območju med približno 35 in 37 stopinjami Celzija, medtem ko že razmeroma majhno znižanje temperature na 30 stopinj povzroči približno 60-odstotno zmanjšanje njene maksimalne aktivnosti (VitaCyte, n.d.). Vzdrževanje temperature pri zgornjem robu tega optimuma, torej pri 37 stopinjah, zato zagotavlja, da encimska razgradnja zunajcelične matrice poteka kar se da učinkovito v razpoložljivem času encimske obdelave, hkrati pa ta temperatura ne presega meje, ki bi bila fiziološko škodljiva za same celice.

Vsi trije razlogi torej kažejo v isto smer, saj tako fiziologija celic kot lastnosti tkiva in delovanje encima dosegajo ugoden rezultat prav pri temperaturi, ki ustreza notranji telesni temperaturi, kar ni naključje, temveč posledica tega, da so tako celice kot encim, uporabljen za njihovo sproščanje, evolucijsko oziroma biokemijsko prilagojeni na to isto temperaturno okolje.



Slika 20: Primer merjenja temperature med preizkusom sistema
Vir: (Lastni vir)

Za preverjanje segrevanja površine grelnega sklopa je bila uporabljena tudi termovizijska kamera (Slika 21). Največja izmerjena površinska temperatura je znašala 42,5 °C. Termovizijski posnetek prikazuje temperaturo površine in ne temperature vzorca v vrečki, ki je bila merjena ločeno s termometrom (Slika 20).



Slika 21: Termovizijski posnetek grelnega sklopa med segrevanjem
Vir: (Lastni vir)

7.4 Mešanje maščobnega tkiva med dvema vrečkama

Mehanska razgradnja maščobnega tkiva med fazo mešanja poteka z izmeničnim prečrpavanjem vsebine med vrečkama A in B skozi povezovalno cevko, pri čemer peristaltična črpalka na tem mestu deluje pri 400 vrtljajih na minuto, torej pri bistveno višji hitrosti kot pri predhodnem polnjenju, opisanem v poglavju 7.1. Tako visoka hitrost ni naključna, saj je prav pretakanje pri visoki hitrosti tisto, ki omogoča učinkovito mehansko razgradnjo tkiva.

Do te razgradnje po naši oceni prihaja predvsem na dveh mestih. Prvo je zožitev na povezovalni cevki, kjer se notranji premer zmanjša na 3,2 mm, drugo pa je sama peristaltična črpalka, kjer valjčki ob svojem gibanju stiskajo cev in s tem dodatno mehansko obremenijo delce tkiva, ki so v tistem trenutku znotraj nje. Na obeh mestih gre za enak osnovni mehanizem, torej za povečanje strižnih sil na stiku med tekočino in trdnejšimi delci tkiva, kar je znano kot enega od virov mehanske poškodbe pri pretakanju bioloških vzorcev (Chisti, 2001).

Mešanje ne poteka neprekinjeno, temveč v ponavljajočih se sklopih. En sklop obsega dva zaporedna popolna prehoda tekočine, vsak iz vrečke A v vrečko B in nazaj, kar skupno pomeni štiri prenose, čemur sledi premor v dolžini treh minut. Znotraj posameznega sklopa se volumen med prvim in drugim prehodom poveča za 5 do 10 mL, isti vzorec naraščanja pa se nadaljuje tudi med zaporednimi sklopi. Pri 40-mililitrskem ciklu se mešanje začne pri prehodu 25 mL,

konča pa pri prehodu 55 mL, kar skupno predstavlja štiri take sklope, ločene s tremi premori. Po zadnjem sklopu in premoru se ponavljanje sklopov zaključi, zadnjih pet minut faze mešanja pa namesto tega poteka kot neprekinjeno pretakanje pri takrat že doseženih 55 mL, brez nadaljnjih premorov. Pri ciklih s 100 in 120 mL so tako koraki naraščanja volumna kot skupno trajanje mešanja sorazmerno večji oziroma daljši.

Odločitev za mešanje v sklopih s premori namesto za neprekinjeno mešanje izhaja iz lastnih razvojnih opažanj, pri katerih se je tak pristop izkazal za ugodnejšega z vidika ohranjanja vitalnosti celic. Pri encimski izolaciji k temu dodatno pripomore tudi narava same encimske reakcije, ki je, v nasprotju s čisto mehansko razgradnjo, ne poganja mehanska sila, temveč difuzija in vezava encima na substrat, zato lahko kolagenaza razgrajuje kolagen v okolici ujetih celic tudi med premorom, ko mehanska obremenitev tkiva miruje. Pri izključno mehanski izolaciji, kjer take dodatne, od gibanja neodvisne poti razgradnje ni, premor kljub temu ostaja koristen izključno z vidika zmanjšanja skupne mehanske obremenitve celic.

7.5 Dodajanje Ringerjeve raztopine in dekantiranje celične frakcije

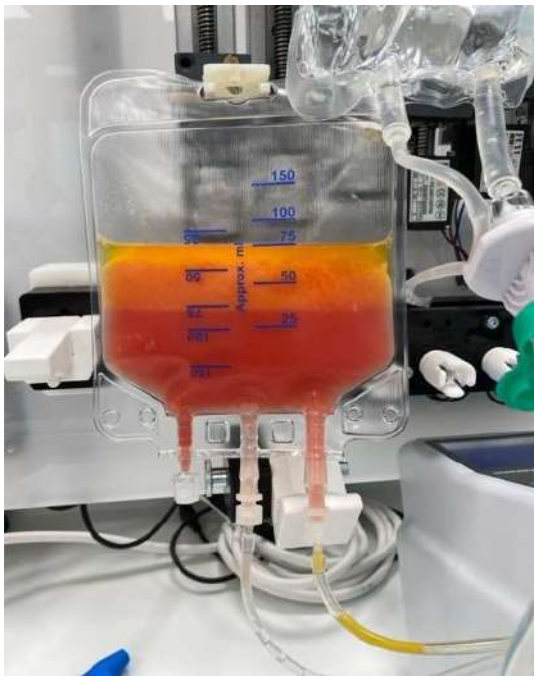
Takoj po zaključku zadnjih petih minut neprekinjenega mešanja, opisanega v poglavju 7.4, sistem v vrečko doda dodatnih 50 mL Ringerjeve raztopine po enaki poti, kot se uporablja pri predhodnem polnjenju. Ta volumen je trenutno enak ne glede na izbrani cikel izolacije, kar je posledica tega, da se je razvoj tega parametra ustavil, ko je razvoj naprave in kartuše prešel v fazo priprave na produkcijo in validacije že obstoječih programov, zato dodatna optimizacija tega volumna glede na posamezen cikel še ni bila izvedena.

Namen tega koraka je povečati delež tekočinske faze pred dekantiranjem in s tem izboljšati zajem celic, ki so se med encimsko in mehansko obdelavo sprostile iz tkiva. Ker sistem ne vključuje centrifuge, ki bi celice aktivno usedala v gostejšo tekočinsko frakcijo, je zajem celic v tem sistemu odvisen izključno od pasivnega ločevanja po gostoti med mirovanjem vzorca. Vsebina vrečke se pri tem loči na oljno plast, vezivnotkivno plast in tekočinsko plast s sproščenimi celicami (Eigenberger in drugi, 2025), pri čemer večji volumen tekočinske plasti, dosežen z dodajanjem Ringerjeve raztopine, poveča verjetnost, da se prosto plavajoče celice ujamejo prav v to plast, namesto da bi ostale ujete med gostejšima plastema oz. na njunih mejah.

Po dodanem volumnu mešanje ne preneha takoj, temveč se za dodaten čas nadaljuje brez premorov. Pri 40-mililitrskem ciklu to pomeni, da skupni volumen v sistemu na tej točki znaša 105 mL pri mehanski izolaciji oziroma 110 mL pri encimski izolaciji, kjer je vštetih dodatnih

5 mL raztopine z encimom, dodane že na začetku postopka. Pri ciklih s 100 in 120 mL so ustrezni skupni volumni in trajanje nadaljnjega mešanja sorazmerno večji. Ta korak poteka pri vsakem ciklu izolacije, ne glede na to, ali gre za mehansko ali encimsko izolacijo, saj je povečanje volumna tekočinske plasti pred dekantiranjem koristno v obeh primerih.

Ko se mešanje zaključi, sledi obdobje mirovanja v trajanju petih minut, med katerim se vsebina vrečke B po gostoti razsloji na že omenjene tri plasti. Po preteku tega časa se iz vrečke B odvzame 25 mL tekočinske plasti, natančna pot tega odvzema pa je opisana v poglavju 7.6. Preostalih 25 mL tekočinske plasti iz vrečke B se odvzame kasneje, po zaključku prvega kroga koncentriranja, opisanega v poglavju 7.7. Skupno torej iz vrečke B odvzamemo 50 mL tekočinske plasti, razdeljenih na dva enaka odvzema.



Slika 22: Primer razslojevanja vsebine procesne vrečke pred odvzemom tekočinske frakcije
Vir: (Lastni vir)

Ker sistem nima senzorja, ki bi zaznaval dejansko mejo med tekočinsko in vezivnotkivno plastjo, sta oba odvzeta volumna vnaprej določena, fiksna, in temeljita na pričakovanem deležu posamezne plasti glede na znan skupni volumen vzorca. Za 40-mililitrski cikel skupno trajanje mirovanja in prvega odvzema znaša približno 8 do 9 minut, medtem ko sta pri ciklih s 100 in 120 mL tako čas mirovanja kot čas odvzema sorazmerno daljša.

7.6 Zaščita sistema pred večjimi delci maščobe in ostanki tkiva

Odvzem tekočinske plasti iz vrečke B poteka pri hitrosti črpalke 100 vrtljajev na minuto. Tako nizka hitrost je namerna, saj tekočini omogoči dovolj časa, da doseže dno vrečke, kjer je izhodni

priključek, preden se ta izprazni. Pri višji hitrosti bi črpalka izmenično vlekla enkrat zrak, enkrat tekočino, kar bi zmanjšalo učinkovitost odvzema, saj je cilj pridobiti izključno tekočino s celicami.

Pot poteka prek ventila 0 (270°), ki tekočino iz vrečke B usmeri v kapalno komoro, naprej prek ventila 2 (90°) ter ventilov 3, 4 in 5, ki so vsi nastavljeni na 180 stopinj in delujejo zgolj kot prehod, do ventila 6 (270°), ki tekočino usmeri v manjšo vrečko. Ta pot se izvede dvakrat, kot je opisano v poglavju 7.5.

Po drugem odvzemu se skozi enako pot, tokrat iz zunanje vrečke Ringerjeve raztopine prek ventila 1, splakne še dodatnih 10 mL Ringerjeve raztopine skozi kapalno komoro, s čimer se zajamejo morebitne celice, zadržane v njej. Pri tem se ventil 4 nastavi na 270 stopinj, ventil 5 pa na 90 stopinj, preostali ventili na tej poti pa ostanejo v enakih položajih kot pri glavnem odvzemu. V vrečki B po zaključku tega koraka ostane med 5 in 10 mL tekočine, v kateri je po večkratnih meritvah praktično zanemarljivo malo celic, saj se te med mirovanjem posedejo proti dnu vrečke, torej proti izhodnemu priključku.

7.7 Koncentriranje celic z modulom z votlimi vlakni in pridobitev končnega produkta

Koncentriranje je pri tem sistemu nujen korak ne glede na uporabljen protokol izolacije, saj je klinično uporaben volumen za vbrizgavanje izoliranih celic s strani kirurga omejen na približno 7 do 8 mL, medtem ko skupni volumen tekočine, zbrane med dekantiranjem, to vrednost precej presega. Modul z votlimi vlakni zato služi zmanjšanju volumna tekočinske frakcije ob hkratnem ohranjanju celic znotraj krožečega dela sistema.

Prvi krog koncentriranja se začne takoj po prvem odvzemu 25 mL tekočinske plasti iz vrečke B, opisanem v poglavju 7.6. Krožna pot se vzpostavi z naslednjimi položaji ventilov: ventil 6 v položaju 0 stopinj, kar omogoča hkratno povezavo vrečke z levo in desno potjo, ventil 5 v položaju 90 stopinj, ventil 4 v položaju 270 stopinj, ventil 3 v položaju 90 stopinj, ventil 7 v položaju 270 stopinj, ventil 8 v položaju 90 stopinj ter ventil 9 v položaju 180 stopinj, ki tok filtrata usmeri proti odpadni vrečki. Tekočina pri tem kroži iz vrečke prek ventilov 5 in 4 ter tretje peristaltične črpalke, ki deluje pri 100 vrtljajih na minuto, naprej skozi ventil 3 v modul z votlimi vlakni, kjer del tekočine prehaja skozi steno votlih vlaken in kot filtrat prek ventila 8 odteka v odpadno vrečko, preostanek s koncentriranimi celicami pa skozi ventil 7 nazaj v vrečko pri ventilu 6, s čimer se sklene krog.

Pri tem je treba opozoriti na posledico masne bilance v spoju pri ventilu 6, kjer se stikajo trije tokovi: dotok iz vrečke, povratni tok iz ventila 7 in odtok proti ventilu 5. Ker peristaltična črpalka premika točno določen volumen na obrat, je pretok skozi zanko konstanten, kar pomeni, da je dotok iz vrečke v vsakem trenutku enak volumnu filtrata, ki v istem času zapusti sistem skozi steno votlih vlaken, preostanek pa se v celoti vrne nazaj v vrečko. Vrečka se torej ne prazni s hitrostjo črpalke, temveč z bistveno počasnejšo hitrostjo filtracije, kar pomeni, da tekočina skozi modul med celotnim koncentriranjem večkrat zaokroži.

Koncentriranje se konča samodejno, brez uporabe senzorja nivoja ali merjenja preostalega volumna, kar izhaja izključno iz geometrije cevne poti med ventiloma 4 in 5. Vrečka pri ventilu 6 je nanj neposredno priključena, zato tekočina vanj preprosto steče po gravitaciji, brez kakršnegakoli vzpenjanja na tej poti. Drugače pa je na poti med ventiloma 5 in 4, kjer je nameščena tretja peristaltična črpalka. Ker je ta nameščena približno 6 do 7 centimetrov više od obeh razdelilnih kolektorjev, cevka na tem mestu ne poteka vodoravno, temveč v obliki narobe obrnjene črke U: iz ventila 5 se najprej vzpne navzgor do črpalke, nato pa se na drugi strani spet spusti navzdol do ventila 4. Črpalka je torej najvišja točka na celotni krožni poti, cevni odsek okoli nje pa deluje kot sifon, ki za svoje delovanje zahteva neprekinjen stolpec tekočine čez to najvišjo točko.

Dokler je v vrečki dovolj tekočine, ta sifon ostaja neprekinjen in koncentriranje poteka nemoteno. Ko se vrečka izprazni, v ventil 6 in naprej v zanko začne vstopati zrak. Ko ta zrak po krožni poti doseže vrh sifona pri črpalki, se neprekinjenost stolpca tam prekine, s čimer se spremeni narava celotnega sistema. Do tega trenutka je bila v cevi izključno tekočina, praktično nestisljiva, zato se je vsak premik valjčka neposredno pretvoril v enak premik tekočine drugje v zanki. Z vstopom stisljivega zraka na vrh sifona pa se del tlaka, ki ga ustvari črpalka, namesto za premikanje tekočine porabi za stiskanje tega zraka, zaradi česar razmerje med vrtljaji črpalke in dejansko premaknjenim volumnom ni več neposredno.

To potrjuje tudi drobno nihanje, opaženo med testiranjem. Ob prehodu posameznega valjčka se gladina za trenutek pomakne malenkost navzdol, nato pa se, ko noben valjček cevi več ne stiska popolnoma, vrne natanko na isto višino, torej na višino same črpalke. Črpalka torej še vedno teče, vendar tekočine v neto smislu ne premika več, saj se je na vrhu sifona vzpostavilo hidrostatično ravnovesje med težo stolpca tekočine in tlačno razliko, ki jo črpalka na tem mestu še zmore vzdrževati.

Ko se konča prvi krog, se v vrečko doda še preostalih 25 mL tekočinske plasti iz vrečke B, kot je opisano v poglavju 7.6, nato pa se enak postopek koncentriranja ponovi še enkrat, pri enakih položajih ventilov in enaki hitrosti črpalke.

Po zaključku drugega kroga koncentriranja se v vrečko nad ventilom 6 prek tretje peristaltične črpalke doda še 50 mL Ringerjeve raztopine, nato pa se celoten postopek koncentriranja ponovno izvede. Namen tega dodatnega kroga je izpiranje morebitnih ostankov encima iz že koncentrirane celične frakcije. Ta korak je smiseln izključno pri encimski izolaciji, saj pri mehanski izolaciji encima ni, poleg tega dodatno spiranje lahko celice tudi mehansko obremeni in zmanjša končni izkoristek. Ker je bil sistem prvotno zasnovan izključno za encimsko razgradnjo, je ta korak trenutno del programa ne glede na izbrani protokol, pri čemer se v okviru nadaljnjega razvoja proučuje možnost, da bi naprava pred zagonom programa uporabnika vprašala, ali uporablja encim, in temu ustrezno izbirala med šestimi programi, torej tremi encimskimi in tremi mehanskimi, pri čemer bi slednji dodatno spiranje izpustili.

Po zaključku vseh krogov koncentriranja v vrečki nad ventilom 6 ostane manjša količina tekočine s koncentriranimi celicami, skupaj z nekaj ujetega zraka. Prav ta preostali zrak omogoča, da se koncentrirana celična frakcija iz sistema potisne naprej v vrečko za končni produkt. To se doseže s spremembo položajev ventilov: ventil 6 se nastavi na 270 stopinj, ventil 7 na 90 stopinj, ventil 8 na 180 stopinj, s čimer ta deluje zgolj kot prehod, in ventil 9 na 270 stopinj, kar tok tokrat namesto proti odpadni vrečki usmeri proti vrečki za končni produkt. Tekočina tako po isti fizični poti kot med koncentriranjem, tokrat brez vračanja v izvorno vrečko, steče vse do vrečke za končni produkt, s čimer je postopek izolacije stromalne vaskularne frakcije v zaprtem sistemu zaključen.

8 MEHANIKA TEKOČIN IN VPLIV PRETOČNIH POGOJEV

8.1 Ocena pretočnih razmer

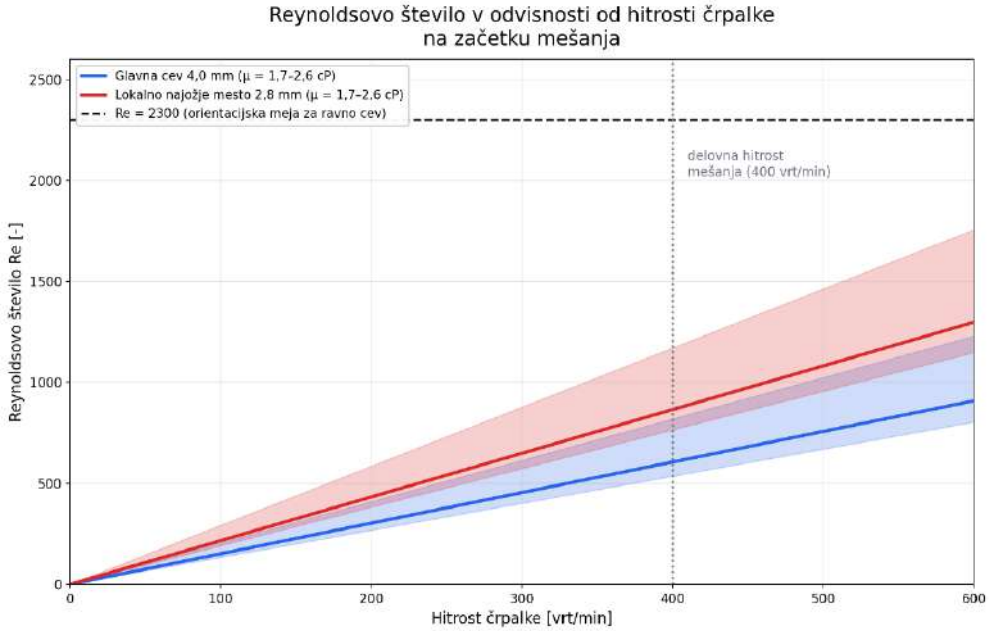
Mehanika tekočin je v tem delu obravnavana kot orientacijska, podporna ocena pretočnih razmer med mešanjem lipoaspirata med vrečkama A in B, kjer so obremenitve v sistemu največje. Uporabljen je model laminarnega toka newtonske tekočine skozi ravno cev, tj. Hagen–Poiseuillov tok (Çengel in Cimbala, 2024), viskoznost razredčene zmesi pa je ocenjena s Krieger–Doughertyjevim modelom na podlagi literaturnih vrednosti za lipoaspirat (Tong in drugi, 2018). Pri delovni hitrosti črpalke 400 vrtljajev na minuto znaša ocenjeni pretok skozi cev z notranjim premerom 4,0 mm približno 268 mL/min (Watson-Marlow, n.d.). Poleg glavne cevi je obravnavano tudi lokalno najožje mesto v enem od ovinkov s premerom približno 2,8 mm. Zbirni rezultati po stanjih procesa so podani v Tabeli 5.

Tabela 5: Zbirni prikaz ocenjenih pretočnih parametrov po stanjih procesa pri 400 vrt/min

Stanje procesa	**Volumen [mL]**	**Viskoznost [cP]**	**Re (4,0 mm)**	**Re (2,8 mm)**	**Padec tlaka [Pa]**	**τ ob steni, 4,0 mm [Pa]**	**τ ob steni, 2,8 mm [Pa]**
Nerazredčen lipoaspirat	40	3,0–7,0	199–464	284–663	1472–3434	–	–
Začetek mehanske izolacije	55	1,74–2,56	545–800	779–1143	855–1253	1,1–1,8	3,3–5,3
Začetek encimske izolacije	60	1,58–2,18	639–883	912–1262	774–1070	1,1–1,8	3,3–5,3
Po dodatku 50 mL, mehanska	105	1,06–1,21	1149–1317	1642–1881	519–595	0,7–0,9	2,1–2,5
Po dodatku 50 mL, encimska	110	1,04–1,18	1184–1345	1691–1922	508–577	0,7–0,9	2,1–2,5

Vir: (Lastni vir)

Grafikon 1 prikazuje, kako se Reynoldsovo število spreminja s hitrostjo črpalke na začetku mešanja. Pri delovni hitrosti 400 vrtljajev na minuto ostaja tako v glavni cevi kot na najožjem mestu pod mejo laminarnega toka za ravno cev ($Re \approx 2300$).



Grafikon 1: Reynoldsovo število v odvisnosti od hitrosti črpalke na začetku mešanja med vrečkama A in B
Vir: (Lastni vir)

8.2 Ugotovitve za konstrukcijo sistema

Iz ocene izhaja nekaj ugotovitev, pomembnih za konstrukcijo sistema. Tok je pri vseh obravnavanih stanjih procesa laminaren, saj Reynoldsovo število tudi na najožjem mestu ne preseže približno 1900. Redčenje z Ringerjevo raztopino zmanjša viskoznost zmesi s približno 2 cP na približno 1 cP, zaradi česar se Reynoldsovo število poveča, padec tlaka v glavni cevi pa se skoraj prepolovi.

Ocenjene stenske strižne napetosti znašajo do približno 1,8 Pa v glavni cevi in do približno 5,3 Pa na najožjem mestu. Te vrednosti so reda nekaj paskalov in primerljive z orientacijskimi vrednostmi 3 do 10 Pa za izbrane celične linije (Connolly in drugi, 2020), ki pa niso potrjena varnostna meja za celice SVF. Kavitacijsko število na zožitvi je bilo ocenjeno na približno 67, kar ne kaže pogojev za stacionarno kavitacijo, kratkotrajnih podtlakov ob odmiku valjčka črpalke pa brez meritve tlaka ni mogoče izključiti.

Konstrukcijsko so najbolj kritična lokalna zoženja in prehodi (reducirni nastavki, ovinki in ventili), kjer se povečata hitrost in strig ter obstaja tveganje zagozditve večjih koščkov tkiva. To je bil tudi razlog za neposredno povezavo vrečk A in B mimo razdelilnega kolektorja in za izbiro notranjega premera cevi 4,0 mm (poglavji 6.2 in 6.3). Ocene so orientacijske, saj ne zajemajo pulziranja peristaltične črpalke, nenewtonskega obnašanja lipoaspirata in gibanja

večjih koščkov tkiva, zato končna presoja vpliva pretoka na celice temelji na eksperimentalnih rezultatih v poglavju 9.

9 EKSPERIMENTALNO TESTIRANJE PROTOTIPOV IN REZULTATI

9.1 Namen in potek eksperimentalnega testiranja

Namen eksperimentalnega testiranja je bil preveriti, ali se teoretična pričakovanja iz poglavja 8 v praksi dejansko potrdijo, ter z opazovanjem in meritvami usmerjati nadaljnji razvoj sistema. Testiranje ni potekalo linearno, po vnaprej določenem zaporedju posameznih sklopov, temveč vzporedno in iterativno, kar potrjuje tudi zabeleženih 63 eksperimentov med letoma 2023 in 2026.

Razvoj je potekal v treh prekrivajočih se smereh. Prva je bila postopna nadgradnja samega koncentracijskega in ločevalnega principa, od zgodnjih ročnih preizkusov modula z votlimi vlakni v letu 2023, prek zaporednih iteracij kartuše in prehoda na vrečke ter peristaltične črpalke v letu 2024, do končne, popolnoma avtomatizirane naprave. Ta prehod je vključeval tudi zamenjavo posameznih komponent, na primer peristaltične črpalke, katere zgodnja različica je omejevala hitrost vrtenja na 100 vrtljajev na minuto, kasnejša različica pa je omogočila bistveno višje hitrosti, kar je odprlo prostor za nadaljnjo optimizacijo. Druga smer so bili namenski, ozko usmerjeni poskusi za določitev posameznih procesnih parametrov, na primer hitrosti črpalk, načina in časa segrevanja vzorca ter volumna vzorca v posameznem ciklu, katerih rezultati so neposredno vplivali na končno zasnovo, opisano v poglavju 7. Tretja smer je bilo vzporedno preverjanje alternativnih pristopov k ločevanju in koncentriranju celic, preden se je razvoj dokončno usmeril v pristop z modulom z votlimi vlakni, obravnavan v tej nalogi.

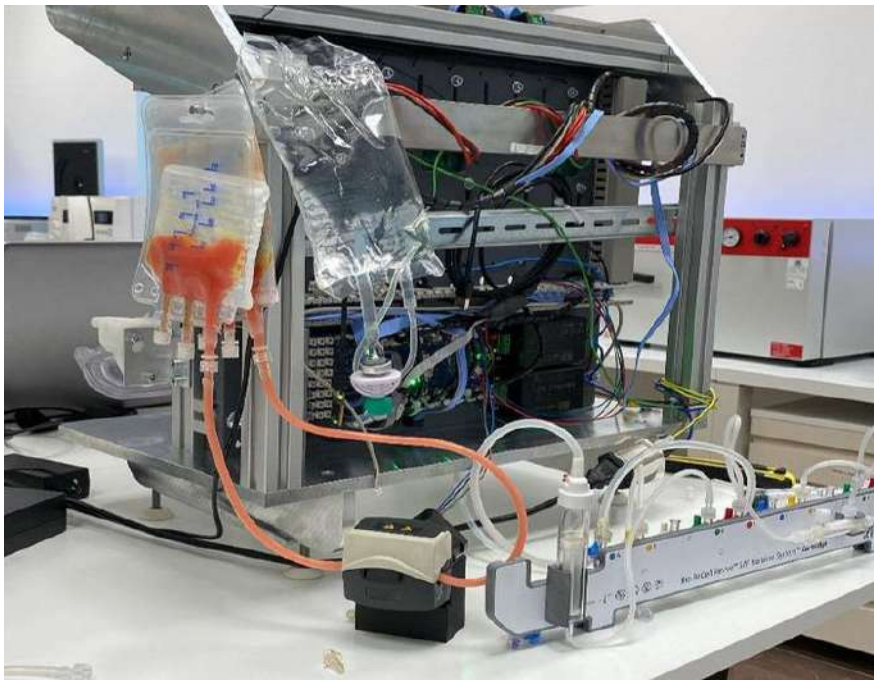
Teste je izvajala razvojna ekipa, pri čemer merjenje ni temeljilo na zapletenih merilnih sistemih, temveč na kombinaciji neposrednega opazovanja delovanja med potekom cikla, merjenja časa s štoparico, spremljanja temperature s temperaturnim senzorjem ter naknadne analize rezultatov, torej izkoristka in viabilnosti celic, pridobljenih s pretočno citometrijo in testom tvorbe kolonij, kot je opisano v nadaljevanju tega poglavja. Število ponovitev posamezne konfiguracije se je razlikovalo glede na to, ali je šlo za grobo, zgodnjo presojo delovanja ali za bolj dokončno potrditev že izbrane rešitve.

9.2 Rezultati testiranja pretoka in delovanja peristaltičnih črpalk

Testiranje črpalk je potekalo v dveh ločenih sklopih, glede na to, za kateri del sistema je šlo, mešanje med vrečkama A in B ali krog za koncentriranje z modulom z votlimi vlakni, saj so se za oba dela izkazale različne, med seboj nasprotujoče si zahteve.

Za mešanje je bil neposredno testiran vpliv hitrosti črpalke na izkoristek in viabilnost celic, pri hitrostih 100, 200 in 300 vrtljajev na minuto na cevi z notranjim premerom 2,4 mm. Izhodiščna hipoteza je bila, da bo višja hitrost, in s tem večja mehanska obremenitev vzorca, viabilnost celic poslabšala. Rezultati so hipotezo ovrgli, saj je viabilnost z naraščajočo hitrostjo naraščala, najboljši izkoristek viabilnih celic pa je bil dosežen prav pri najvišji testirani hitrosti. Kot mogoč razlog je bilo navedeno, da višja hitrost izboljša samo mešanje, torej razbitje ločenih plasti lipoaspirata in raztopine encima, ali da dodatna mehanska razgradnja koščkov tkiva pri več obratih pripomore k sproščanju celic, ne da bi jih pri tem poškodovala. Na podlagi tega trenda in kasnejšega preverjanja zanesljivosti same črpalke pri višjih hitrostih je bila za končno zasnovo izbrana hitrost 400 vrtljajev na minuto, torej višja od najvišje neposredno testirane vrednosti, oprta na ekstrapolacijo ugotovljenega trenda ter na naknadno izračunane strižne obremenitve, obravnavane v poglavju 8.

Zanesljivost same črpalke Watson Marlow je bila preverjena ločeno od vpliva na celice. Črpalka je bila testirana pri 300, 400 in 500 vrtljajih na minuto, tudi v razmerah, ko je bila cev namenoma stisnjena, da se je simuliral zastoj. Pri nobeni od teh hitrosti niso bile opažene pomembne težave s hrupom, segrevanjem ali odzivom na zastoj, kar potrjuje, da izbrana hitrost 400 vrtljajev na minuto ostaja znotraj varnega obratovalnega območja same črpalke. Pri tem je bila opažena ločena, ponavljajoča se težava, in sicer nepravilna namestitev cevi na sredino valjčkov s strani različnih izvajalcev, kar je konstrukcijsko, ne procesno vprašanje in ni nadalje obravnavano v tem poglavju.



Slika 23: Preizkusna postavitev pri testiranju zanesljivosti peristaltične črpalke pri 300, 400 in 500 vrtljajih na minuto
Vir: (Lastni vir)

Za krog koncentriranja je bila zgodba nasprotna. V zgodnejših različicah krmilne programske opreme je filtracija skozi modul z votlimi vlakni potekala pri 300 vrtljajih na minuto, poskus s povečanjem te hitrosti na 400 vrtljajev na minuto pa je učinkovitost filtracije poslabšal, in sicer z 39 na 34 odstotkov, zaradi česar ta smer ni bila naprej razvita. Nasprotno, glede na priporočila proizvajalca uporabljenega modula, Plasmart 50, katerega največji priporočeni pretok ustreza približno 69 vrtljajem na minuto pri uporabljeni cevi, so želeli hitrost črpalke še znižati. Programska oprema je v tisti fazi razvoja dovoljevala najnižjo hitrost 300 vrtljajev na minuto, zato je poskus nastavitve nižje hitrosti sprožil napako. To je jasno pokazalo, da mora biti hitrost na tem krogu bistveno nižja od tiste, uporabljene pri mešanju, kar je skupaj s preudarkom o preprečevanju vnosa zraka, opisanim v poglavju 7.1, privedlo do končne izbrane vrednosti 100 vrtljajev na minuto za predhodno polnjenje in koncentriranje.

Ta dva sklopa ugotovitev, torej da hitrejše mešanje celicam ne škoduje, medtem ko hitrejše koncentriranje poslabša učinkovitost filtracije, pojasnita, zakaj imata omenjena dela sistema tako različni obratovalni hitrosti, čeprav gre v obeh primerih za isto vrsto črpalke.

9.3 Rezultati testiranja različnih dimenzij cevk

Testiranje dimenzij cevk je potekalo v dveh smereh, ki sta se ukvarjali z različnima vprašanjema, potjo pretakanja med vrečkama A in B ter natančnostjo doziranja pri različnih notranjih premerih.

Prva smer je primerjala dva načina povezave vrečk A in B. V prvi izvedbi sta bili vrečki povezani posredno, vsaka s svojim priključkom na razdelilni kolektor, po cevi z notranjim premerom 2,4 mm, tako da je tekočina med prenosom potovala skozi ventile kolektorja. V drugi izvedbi sta bili vrečki povezani neposredno med seboj, mimo kolektorja, po cevi z notranjim premerom 3,2 mm, pri čemer je vsaka vrečka svoj drugi priključek še vedno ohranila povezan na kolektor za namene priprave in koncentriranja. Neposredna povezava se je izkazala za ustreznejšo, predvsem zaradi enostavnejše izvedbe in manjšega števila zapletov med delovanjem. Pri posredni povezavi je namreč tekočina skozi razdelilni kolektor tekla pod pravim kotom, kar je za koščke tkiva pomenilo bistveno večje tveganje zataknitve kot pri ravni, neposredni poti med vrečkama, na kateri se je tveganje zamašitve posledično zmanjšalo. To je osnova za pot, opisano v poglavjih 7.4 in 8, saj se s tem izogne tudi dodatnim prehodom skozi ventile na mestu, kjer poteka najbolj intenzivno in pogosto ponavljajoče se mešanje.

Druga smer je pokazala, kako notranji premer cevi vpliva na natančnost doziranja, kar neposredno izhaja iz načela, da peristaltična črpalka na obrat premakne določen volumen, ki je odvisen od preseka cevi, kot je bilo količinsko obravnavano v poglavju 8. Pri enem izmed poskusov je po pomoti prišlo do uporabe cevi z večjim notranjim premerom, kot je predvideno, kar je pri sicer enakem programu, torej enakem številu vrtljajev črpalke, povzročilo opazno večje pretočene volumne, razvidne tako iz volumna po dekantiranju kot iz volumna končnega produkta. To potrjuje, da je natančen notranji premer cevi kritičen parameter za ponovljivo doziranje, in ne le za pretočne razmere, obravnavane v poglavju 8.

9.4 Rezultati testiranja mešanja med vrečkama

Testiranje mešanja je poleg hitrosti črpalke, obravnavane v poglavju 9.2, in izbire povezovalne cevi med vrečkama, obravnavane v poglavju 9.3, zajemalo še tri vprašanja: vzorec izmenjav, vpliv segrevanja na izid mešanja ter dejansko pojavljanje zamašitev zaradi koščkov in vlaken tkiva.

Prvo vprašanje je bilo, ali naj mešanje poteka neprekinjeno skozi celoten čas prebave, ali razdeljeno na krajše sklope, ločene s premori, pri čemer se volumen posameznega prenosa med

sklopi postopoma povečuje. Slednji pristop je bil uveden zaradi pomisleka, da bi kombinacija segrevanja in neprekinjene mehanske obremenitve prek peristaltične črpalke za celice predstavljala prehudo obremenitev. Neposredna primerjava je pomislek potrdila: prvotno, 30-minutno neprekinjeno mešanje je dalo približno polovico toliko skupnih jedrnatih celic kot ročna izolacija. Skrajšanje trajanja na 15 minut ob sicer enakem, neprekinjenem mešanju je izkoristek izboljšalo na približno 75 odstotkov ročnega postopka, enako 15-minutno trajanje z mešanjem, razdeljenim na sklope s premori, pa je izkoristek dvignilo na približno 90 odstotkov. Pri mešanju s premori se je izenačilo tudi število kolonije tvorečih enot z ročno izolacijo, medtem ko je bilo pri neprekinjenem mešanju to število občutno nižje, v ločenem poskusu pa je bila pri mešanju s premori izmerjena tudi občutno višja viabilnost celic. To je potrdilo, da je bilo prvotno, neprekinjeno mešanje v kombinaciji s segrevanjem za celice dejansko preveč obremenjujoče, in je osnova za vzorec mešanja, opisan v poglavju 7.4.

Drugo vprašanje je bilo, kako na izid mešanja in prebave vpliva segrevanje vzorca. V neposredni primerjavi je bil pri segrevanju dosežen večji skupni izkoristek celic, hkrati pa se je razlikovala tudi sestava pridobljenih celic. Vzorec, prebavljen brez segrevanja, je vseboval večji delež CD45 pozitivnih celic, torej celic krvnega izvora, medtem ko je bil pri segrevanem vzorcu delež CD90 pozitivnih celic, torej mezenhimskih matičnih celic, višji. Segrevanje med prebavo tako ni pomembno le za količino pridobljenih celic, temveč tudi za kakovost oziroma sestavo končnega produkta, kar dodatno utemeljuje pomen segrevanja, opisanega v poglavjih 6.7 in 7.3.

Tretje vprašanje se je nanašalo na dejansko pojavljanje zamašitev med mešanjem, predvsem v zgodnejših fazah razvoja, ko so bili koščki tkiva pred dodatkom encima ali pri mehanski izolaciji še povsem nerazgrajeni. V več primerih je večji strjen kos tkiva popolnoma zaustavil pretakanje med dvema posodama, pri čemer je bila za ponovno vzpostavitev pretoka potrebna občutno večja sila, v enem primeru pa je bilo pretakanje mogoče nadaljevati šele, ko je bil zataknjeni kos ročno odstranjen. Te izkušnje neposredno potrjujejo oceno tveganja zagozditve na zožitvah iz poglavja 8 in kažejo, da je tveganje za zamašitev v praksi resnično prisotno predvsem pri večjih, še nerazgrajenih koščkih tkiva, ne pa toliko pri že delno prebavljenem vzorcu, kakršen je prisoten v kasnejših fazah postopka.

9.5 Rezultati testiranja tesnjenja in povezovalnih mest

Testiranje tesnjenja se je v veliki meri navezovalo na pravilno delovanje samih ventilov razdelilnega kolektorja. Izkazalo se je, da mora biti posamezen ventil zavrten natanko na 45

stopinj, da so vse tri poti, torej zgornja in obe stranski, popolnoma zaprte. Pri nepopolnem zasuku je prihajalo do počasnega uhajanja Ringerjeve raztopine skozi delno odprto pot, tudi kadar je bil ventil navidezno v zaprtem položaju. Ta ugotovitev je pomembna predvsem za krmiljenje pogonov ventilov, saj mora biti kot zasuka pri vsakem prehodu med položaji natančno določen in ne le približen.

Za splošno preverjanje tesnosti celotnega zaprtega sistema je bila uporabljena tudi preprosta kvalitativna metoda. Peristaltična črpalka je bila priključena na priključek pri ventilu 9, torej na mesto, kamor je sicer priključena vrečka za končni produkt, vsi ventili na obeh razdelilnih kolektorjih pa so bili odprti. Črpalka je nato iz kartuše aktivno odvajala zrak. Če bi bil sistem netesen, bi črpalka lahko neprekinjeno vlekla zrak, ki bi v sistem uhajal skozi netesno mesto, ne da bi se v notranjosti kartuše kdaj vzpostavil znaten podtlak. Ker pa je črpalka po določenem času začela preskakovati, kar je posledica tega, da cevi zaradi vzpostavljenega podtlaka ni več uspela ustrezno napolniti med posameznimi valjčki, je to potrdilo, da sistem nikjer ne pušča in da torej ohranja svojo zaprtost tudi pod podtlakom.

Druge težave s tesnjenjem so se pojavljale predvsem pri zgodnejših, kasneje opuščenih rešitvah, na primer pri ročno prilagojenih konektorjih za standardne infuzijske filtre ali pri uporabi mikrolizorja za mehansko razgradnjo tkiva, kjer je pod visokim pritiskom prihajalo do uhajanja vzorca ob gumijastem zamašku brizge. Ker te rešitve niso del končne zasnove kartuše, opisane v poglavjih 5 in 6, te izkušnje ne vplivajo neposredno na trenutno konstrukcijo, kažejo pa, da je bilo tesnjenje pod tlakom eden od dejavnikov, ki je prispeval k opustitvi teh alternativ v korist zaprtega sistema z vrečkami in razdelilnimi kolektorji.

9.6 Rezultati testiranja koncentriranja celic brez senzorja nivoja

Prvotna zasnova sistema je za zaznavanje konca posameznega koraka filtracije skozi modul z votlimi vlakni predvidevala uporabo senzorja, ki naj bi zaznaval prehod zraka skozi cev in s tem sistemu sporočil, da je vrečka prazna. V praksi se je ta senzor izkazal za nezanesljivega. Pri veliki večini poskusov je senzor že sproženo dekantirano celično suspenzijo napačno zaznaval kot zračni mehurček in filtracijo ustavil že po nekaj sekundah, čeprav je bila vrečka še vedno polna. Težavo je bilo mogoče začasno obiti z ročnim pritiskanjem cevi na mesto senzorja, kar je senzorju simuliralo poln pretok, vendar to ni bila rešitev, primerna za samodejno delovanje naprave.

Napako je bilo sprva mogoče pripisati sami strojni opremi senzorja, zato je bil ta v nadaljnjem razvoju v celoti zamenjan z novim modelom. Nov senzor je bil pred uporabo uspešno umerjen in preizkušen tako s tekočino podobne barve kot z dejansko odpadno tekočino iz procesa, pri čemer je v obeh primerih pravilno zaznaval prehod tekočine oziroma zraka. Kljub temu je isti senzor pri dejanskih bioloških vzorcih ponovno dosledno odpovedal, kar je pripeljalo do domneve, da senzor napačno zaznava same celice, morda predvsem eritrocite, kot zračne mehurčke, ne glede na to, kako natančno je bil predhodno umerjen.

Ker senzorja tudi po zamenjavi strojne opreme ni bilo mogoče zanesljivo usposobiti, je bila v nadaljnjem razvoju sprejeta odločitev, da se nadzor nad koncem posameznega koraka filtracije v celoti prestavi na kombinacijo časovnega vodenja in same geometrije sistema. Namesto da bi konec koraka določal senzor, je bila hitrost črpalke na tem delu sistema znižana, cevna pot pa zasnovana tako, da tvori sifon, znotraj katerega ostane celična suspenzija ujeta, ne da bi vanjo lahko vstopil zrak. Ta pristop se je izkazal za zanesljivega pri vseh nadaljnjih preizkusih naprave in je neposredna praktična osnova za teoretično obravnavo samodejne ustavitve koncentriranja zaradi prekinitve sifona, predstavljeno v poglavju 7.7. Nizka hitrost 100 vrtljajev na minuto, uporabljena na tem delu sistema, je bila torej izbrana ne le zaradi preprečevanja vnosa zraka, opisanega v poglavju 7.1, temveč tudi zato, ker je prav ta nižja hitrost pogoj, da sifonski mehanizem sploh zanesljivo deluje namesto senzorja.

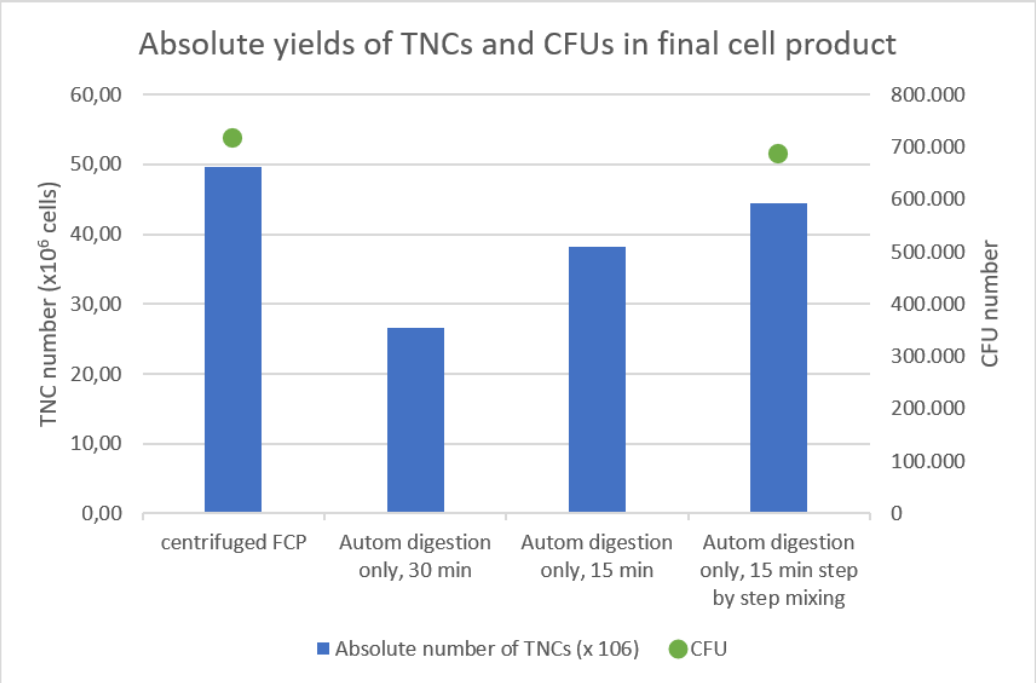
9.7 Primerjava rezultatov s kontrolnim postopkom centrifugiranja

Skozi celoten razvoj je bila vsaka pomembnejša različica sistema neposredno primerjana s kontrolnim postopkom, torej z ročno izolacijo, ki se je zaključila s centrifugiranjem. Metodologija primerjave je bila zasnovana tako, da je razlika med obema potema izhajala izključno iz načina ločevanja in koncentriranja celic, ne pa iz same razgradnje tkiva. Iz istega vzorca lipoaspirata je bil zato vzet enak delež za napravo in za kontrolni postopek, oba dela pa sta bila digestirana z enako količino in koncentracijo encima ter pri enaki temperaturi. Kontrolni vzorec je bil nato ločen od naprave, običajno centrifugiran pri 800 g za 5 minut, pogosto v dveh zaporednih izpiranjih z Ringerjevo raztopino, in nazadnje filtriran skozi 200-mikronski filter, s čimer je bil pridobljen končni produkt, primerljiv s tistim iz naprave.

Za oceno obeh poti sta bili dosledno uporabljeni isti dve metodi, pretočna citometrija za določitev skupnega števila celic in njihove viabilnosti ter test tvorbe kolonij za oceno deleža celic z ohranjeno sposobnostjo delitve. Rezultati teh primerjav so podrobneje predstavljeni v nadaljevanju tega poglavja, tukaj pa je treba poudariti predvsem to, da je bila taka vzporedna

primerjava stalnica skozi ves razvoj, kar je omogočilo, da je bila vsaka sprememba v zasnovi naprave ovrednotena neposredno glede na uveljavljeno alternativo, ne le glede na prejšnjo različico same naprave.

Za ločeno oceno vpliva razgradnje in mešanja so bili vzorci po avtomatizirani razgradnji na napravi nadalje obdelani enako kot centrifugirani vzorec. Grafikon 2 zato ne primerja celotnega procesa brez centrifugiranja z ročnim postopkom, temveč kaže absolutno število vseh jedrnih celic (TNC), in kjer so bili podatki na voljo, kolonije tvorečih enot (CFU) po različnih načinih razgradnje ob naknadni centrifugaciji.



Grafikon 2: Absolutno število TNC in CFU po različnih načinih razgradnje ter naknadni obdelavi s centrifugiranjem
Vir: (Lastni vir)

Prikazani rezultati kažejo, da je 15-minutna avtomatizirana razgradnja s stopenjskim mešanjem dosegla absolutno število TNC, ki je bilo bližje centrifugiranemu referenčnemu vzorcu kot pri 15- ali 30-minutni avtomatizirani razgradnji brez enakega režima mešanja. Število CFU je bilo prikazano za centrifugirani referenčni vzorec in za 15-minutno stopenjsko mešanje ter je bilo med njima podobno. Ker graf ne prikazuje ponovitev, mer variabilnosti ali statistične analize, je primerjava opisna. Rezultati podpirajo vpliv režima mešanja na sproščanje celic, ne dokazujejo pa enakovrednosti celotnega avtomatiziranega procesa.

Nižji izkoristek končnega produkta naprave je zato lahko posledica več ločenih mehanizmov: nepopolnega sproščanja celic med razgradnjo, njihovega zadrževanja v oljni ali vezivnotkivni plasti pri dekantiranju ter izgub pri nadaljnjem pretakanju in koncentriranju. Naknadna

centrifugacija preostalih frakcij lahko pokaže, da je del celic ostal nezajet, vendar brez popolne številčne bilance ni mogoče trditi, da je s tem pojasnjena celotna razlika. Pri mehanski izolaciji nižje število CFU lahko odraža poškodbo celic, nepopolno sproščanje iz matrice ali kombinacijo obojega; razpoložljivi podatki teh možnosti ne ločijo.

9.8 Zbirni pregled rezultatov po ciklih

Za razliko od preostalih podpoglavij, ki so bila organizirana po posameznih vprašanjih testiranja, spodnja preglednica združi končne rezultate po vseh treh ciklih hkrati.

Tabela 6: Zbirni rezultati testiranja po ciklih izolacije

Cikel	**Volumen lipoaspirata**	**Tipičen končni volumen produkta**	**Viabilnost**	**Opomba**
Mali	40 mL	6–9,5 mL	40–95 %	Razpon zajema tako zgodnje, neoptimizirane poskuse kot zrelejše različice sistema
Srednji	100 mL	7–8 mL	Primerljiva zrelejšim poskusom pri 40 mL	Manjše število ponovitev kot pri malem ciklu
Veliki	120 mL	6–7,2 mL	Primerljiva zrelejšim poskusom pri 40 mL	Manjše število ponovitev kot pri malem ciklu

Vir: (Lastni vir)

Iz preglednice je razvidno, da se končni volumen produkta pri vseh treh ciklih giblje v podobnem, klinično uporabnem razponu, kljub temu da vhodni volumen lipoaspirata med cikli variira za faktor tri, kar je neposredna posledica zasnove koncentriranja z modulom z votlimi vlakni, opisane v poglavju 7.7, katere namen je prav izenačitev končnega volumna ne glede na začetno količino vzorca.

9.9 Iterativne spremembe sistema na podlagi eksperimentalnih opažanj

Skozi opisano testiranje je sistem doživel vrsto pomembnejših sprememb, ki jih je smiselno strniti na enem mestu, saj posamično niso bile vedno del istega poskusa, skupaj pa pojasnjujejo, kako je nastala zasnova, opisana v poglavjih 5 do 7.

Najbolj temeljna sprememba je bil prehod od ročnega rokovanja z brizgami k zaprtemu sistemu z vrečkami in peristaltičnimi črpalkami. V zgodnji fazi razvoja je bila kartuša zasnovana okoli brizg, med katerimi je uporabnik ročno prenašal vzorec za mešanje, ta postopek pa je zahteval fizično prisotnost operaterja pri vsakem koraku in ni bil primeren za samodejno delovanje. Prehod na vrečke, povezane s peristaltičnimi črpalkami, je šele omogočil, da je celoten postopek, od predhodnega polnjenja do koncentriranja, lahko potekal brez ročnega posega, kar je predpogoj za avtomatizirano napravo, opisano v tej nalogi.

Na tej novi arhitekturi je nato prišlo do več nadaljnjih sprememb. Peristaltična črpalka je bila v zgodnji fazi omejena na največ 100 vrtljajev na minuto, zamenjava za zmogljivejšo črpalko pa je odprla prostor za testiranje bistveno višjih hitrosti, kar je privedlo do izbire 400 vrtljajev na minuto za mešanje, opisane v poglavju 7.4. Povezava med vrečkama A in B se je razvila iz posredne poti skozi razdelilni kolektor v neposredno povezavo med vrečkama, kar je zmanjšalo število prehodov na najbolj obremenjenem delu sistema. Vzorec mešanja se je iz neprekinjenega prečrpavanja skozi celoten čas prebave razvil v mešanje po sklopih s premori in postopoma naraščajočim volumnom. Hitrost črpalke na krogu za koncentriranje se je gibala v nasprotni smeri, saj se je izkazalo, da hitrejše delovanje poslabša učinkovitost filtracije skozi modul z votlimi vlakni, kar je pripeljalo do bistveno nižje končne hitrosti 100 vrtljajev na minuto. Senzor za zaznavanje konca filtracije je bil po ponovnih neuspehih, tudi po zamenjavi strojne opreme, v celoti opuščen v korist časovnega vodenja v kombinaciji s sifonsko geometrijo cevi.

Spremembe so se dogajale tudi na ravni izbire posameznih komponent. Sam modul z votlimi vlakni je bil sprva na voljo v dveh različicah, Plasmart 25 in Plasmart 50, pri čemer je slednji dosledno dajal večje absolutno število pridobljenih celic, boljšo skladnost med številom celic in testom tvorbe kolonij ter je zahteval bistveno manj prehodov skozi črpalko za enak volumen. Plasmart 25 je bil zato v nekaterih kasnejših poskusih uporabljen le začasno, zaradi pomanjkanja modulov Plasmart 50 pri dobavitelju, ne zaradi tehnične prednosti. Način segrevanja vzorca se je razvil od ročnega ogrevanja v dlaneh in kemičnih grelnih blazinic, ki so za dosego 37 stopinj potrebovale približno pol ure, do električnih silikonskih grelnih

elementov z lastnim regulatorjem temperature, ki cilj dosežejo v nekaj minutah, kar je opisano v poglavju 6.7. Tudi same vrečke so skozi razvoj menjale dobavitelja in obliko, glede na razpoložljivost na trgu in ustreznost velikosti za držalo z grelniki. Nazadnje je bilo z eksperimentalnim testiranjem različnih doz sevalne sterilizacije ugotovljeno, da visoka doza 60 kiloGrayov povzroči vidne poškodbe ohišja kartuše, kar je pripeljalo do izbire nižje, še vedno ustrezne doze za sterilizacijo končnih kartuš.

Skupna nit vseh teh sprememb je, da so bile v veliki meri posledica neposrednega opazovanja delovanja sistema, ne pa vnaprejšnjega teoretičnega načrtovanja, kar je v skladu z iterativno naravo razvoja, opisano že v poglavju 9.1.

10 UPORABA UMETNE INTELIGENCE KOT PODPORNEGA ORODJA PRI RAZVOJU SISTEMA

10.1 Vloga umetne inteligence pri raziskovanju strokovnih virov

Pri iskanju strokovne literature je bila umetna inteligenca skozi ves razvoj sistema uporabljena namesto klasičnega spletnega iskalnika, saj je omogočala hitrejše usmerjanje k relevantnim virom glede na konkretno tehnično ali biološko vprašanje, ne pa le glede na ključne besede. Pri tem se je dosledno uveljavila praksa, da se ob vsakem navedenem viru zahteva tudi dostop do izvirnega članka, ki se nato prebere neposredno, namesto da bi se sprejela zgolj povzeta trditev orodja.

Ta praksa se je izkazala za ključno tudi pri pisanju same naloge, kjer je neposreden vpogled v izvorne članke večkrat razkril, da je bil vir sicer resničen in pravilno naveden, njegova prva uporaba pa preozka, netočna ali celo notranje nasprotujoča. Pri usklajevanju podatkov o viskoznosti lipoaspirata v poglavju 8 je bilo tako treba ločiti med dvema viroma, ki sta na prvi pogled navajala vrednosti, različne za več velikostnih redov, dejansko pa sta merila dve povsem različni fizikalni lastnosti. Podobno je bilo pri iskanju podatkov o velikosti koščkov tkiva v poglavju 8 in pri preverjanju kritičnih vrednosti strižne napetosti za celice v poglavju 8 treba iz več virov razbrati, kateri od njih dejansko ustreza razmeram v obravnavanem sistemu, torej laminarnemu cevnemu toku, in kateri opisuje povsem drugačne pogoje, na primer neprekinjeno mešanje v bioreaktorju. Brez neposrednega branja izvirnika taka razlika ne bi bila razvidna, saj bi orodje vsak od virov navedlo kot enakovredno podporo isti trditvi.

10.2 Uporaba umetne inteligence pri tehničnih izračunih in razumevanju fluidnih pojavov

Tehnični izračuni, povezani s pretakanjem tekočin skozi sistem, so bili z umetno inteligenco izvajani že pred pričetkom pisanja te naloge, in sicer z uporabo drugih jezikovnih modelov v zgodnejših fazah razvoja, ko so bile take ocene potrebne za sprotno odločanje o hitrostih črpalk, dimenzijah cevk in podobnih parametrih.

Pri pisanju poglavja 8 je bil isti sklop izračunov v celoti ponovljen in preverjen iz osnovnih fizikalnih načel, kar je razkrilo, da je bilo več prej uporabljenih predpostavk netočnih. To je vključevalo napačno domnevo o notranji geometriji razdelilnih ventilov, zaradi katere je bilo

treba prvotno zasnovo poti tekočine med ventili večkrat popraviti, napačno privzeto število in razporeditev ovinkov na povezovalni cevi med vrečkama, ter napačno prvotno oceno mesta, na katerem na sesalni strani črpalke nastopi najnižji tlak, kar je neposredno vplivalo na presojo tveganja kavitacije. V vseh teh primerih je šlo za napake, ki izračuna kot takega niso naredile numerično nesmiselnega, temveč so izhajale iz napačno privzete geometrije ali fizikalnega mehanizma, na katerem je izračun temeljil, kar je tovrstne napake težje opaziti kot očitno napačno številko.

10.3 Uporaba umetne inteligence pri iskanju konstrukcijskih rešitev in komponent

Umetna inteligenca je bila uporabljena tudi neposredno pri izdelavi CAD-modelov, in sicer takrat, kadar avtor ni vedel, kako v uporabljenem programu izvesti določen korak ali doseči željeno geometrijo. Poleg tega je bila uporabljena za dve sorodni, a ločeni nalogi, predhodni CAD-modeliranju. Prva je bila presoja, katera proizvodna tehnika je glede na dimenzije, tolerance in zahtevano biokompatibilnost posameznega dela kartuše najprimernejša, na primer selektivno lasersko sintranje, tiskanje s spajanjem večjega curka delcev, injekcijsko brizganje ali izdelava s silikonskim kalupom, pri čemer je izbira med temi tehnikami odvisna od pričakovane serijske velikosti, zahtevane natančnosti in same geometrije dela.

Druga naloga je bilo iskanje dobaviteljev in kataloških komponent, ki ustrezajo zahtevam sistema, na primer peristaltičnih črpalk z ustrezno kombinacijo pretočnega območja in dimenzij, ventilov razdelilnih kolektorjev z ustrezno notranjo geometrijo ter modulov z votlimi vlakni z ustrezno površino membrane in velikostjo por. Iskanje tovrstnih komponent je zahtevalo primerjavo tehničnih podatkovnih listov več proizvajalcev glede na zahteve, ki izhajajo iz same zasnove sistema, kar je podobno delo, kot je bilo v tej nalogi opravljeno pri iskanju in preverjanju pretočnih karakteristik uporabljene črpalke v poglavju 8. Samo CAD-modeliranje je v obeh primerih potekalo ločeno, v namenski programski opremi, in ni bilo del te uporabe umetne inteligence.

Pri neposredni pomoči znotraj CAD-programa je bila uspešnost umetne inteligence neenakomerna, saj je pri nekaterih ukazih in postopkih ponudila delujočo rešitev takoj, pri drugih pa je bilo potrebnih več poskusov ali preusmeritev, preden je bila najdena ustrezna pot do želenega rezultata. Ne glede na to razliko v uspešnosti je bil v vseh primerih na koncu dosežen zastavljeni cilj, kar kaže, da je bila umetna inteligenca pri tej vlogi koristna predvsem

kot dodaten vir usmeritev, ne pa kot orodje, ki bi delo pri modeliranju opravilo samodejno in zanesljivo namesto avtorja.

10.4 Uporaba umetne inteligence pri primerjavi razvojnih možnosti

Umetna inteligenca je bila uporabljena tudi za odpiranje in primerjavo alternativnih razvojnih poti, kadar je razvoj naletel na omejitev obstoječega pristopa. Konkreten primer je vprašanje, kako izboljšati izkoristek celic brez uporabe centrifuge, na podlagi katerega je bila predlagana zamisel o akustičnem koncentriranju celic in ločevanju olja na mikrofluidnem čipu, torej pristop, ki bi zamenjal pasivno ločevanje po gostoti in filtracijo skozi modul z votlimi vlakni z ločevanjem na podlagi akustičnih sil.

Ta predlog je bil nato dejansko eksperimentalno preizkušen, kar je razvidno tudi iz poglavja 9.1, kjer je akustoforeza omenjena kot ena od vzporedno raziskanih alternativnih tehnologij ločevanja in koncentriranja celic, preden se je razvoj dokončno usmeril v pristop z modulom z votlimi vlakni, obravnavan v tej nalogi. Ta primer dobro ponazori splošen vzorec uporabe umetne inteligence v tej vlogi, saj ni šlo za enkraten predlog, ki bi bil sprejet ali zavrnjen brez preverjanja, temveč za eno od več vzporedno testiranih možnosti, katerih dejanska uporabnost se je pokazala šele po eksperimentalni primerjavi z uveljavljenim pristopom.

10.5 Uporaba umetne inteligence pri urejanju razvojnih opažanj in interpretaciji rezultatov

Poseben primer uporabe umetne inteligence predstavlja delo, opravljeno neposredno pri nastajanju te naloge. Zapiski 63 eksperimentov, izvedenih med letoma 2023 in 2026, so bili razpršeni po ločenih poročilih, zapisanih v različnih oblikah in z različno stopnjo podrobnosti, brez enotnega povzetka, ki bi jih povezoval v skladno celoto.

Umetna inteligenca je bila uporabljena za sistematičen pregled teh poročil in izločitev ključnih ugotovitev za posamezna podpoglavja poglavja 9, kar je vključevalo prepoznavanje, kateri eksperimenti se dejansko nanašajo na trenutno, končno zasnovo sistema, in kateri na že opuščene, zgodnejše različice, na primer pri razlikovanju med peristaltično črpalko Ismatec, uporabljeno v zgodnji fazi razvoja, in kasneje uvedeno črpalko Watson Marlow. Poleg tega je bila uporabljena za prepoznavanje in razreševanje neskladij med posameznimi opisi zasnove, na primer pri usklajevanju geometrije ventilov v poglavju 7.1, ter za povezovanje raztresenih eksperimentalnih opažanj s teoretično obravnavo v poglavju 8, kot je bilo to storjeno pri

prepoznavanju izvora sifonskega mehanizma za samodejno ustavitev koncentriranja, opisanega v poglavjih 7.7 in 9.6, ki je v poročilih obstajal kot praktična rešitev težav s senzorjem, v tej nalogi pa je bil povezan z ustrezno teoretično razlago.

10.6 Omejitve uporabe umetne inteligence pri tehničnem razvoju

Skozi ves razvoj naprave je veljalo načelo, da se vsaka trditev, pridobljena z umetno inteligenco, preveri, preden se sprejme kot podlaga za odločitev, zaradi česar med samim razvojem ni prišlo do večjih težav z napačnimi ali izmišljenimi navedbami. To dosledno preverjanje je pomenilo dodaten korak pri vsakem koraku dela, hkrati pa je bilo to ravno tisto, kar je preprečilo, da bi se napačne predpostavke prenesle naprej v dejanske konstrukcijske odločitve.

Kljub temu je pri pisanju te naloge prišlo do več primerov, ko je bila prva različica izračuna ali razlage, ki jo je predlagala umetna inteligenca, napačna ali nepopolna in jo je bilo treba popraviti šele po dodatnem preverjanju in vprašanjih avtorja, na primer pri prvotno napačno določenem mestu najnižjega tlaka pri presoji kavitacije v poglavju 8, kjer je bila napaka odkrita šele, ko je avtor opozoril, da tlačne razmere med vrečkama nikakor ne morejo biti atmosferske. Podobno je veljalo za prvotno napačno predpostavko o notranji geometriji ventilov, ki je bila razrešena šele potem, ko je avtor natančno opisal dejansko število priključkov na posameznem razdelilnem kolektorju. Te izkušnje kažejo, da se napake pri tovrstnem delu praviloma ne pojavljajo kot očitno napačna dejstva, temveč kot tiho privzete, nepreverjene predpostavke o geometriji ali mehanizmu, ki delujejo prepričljivo, dokler jih nekdo z neposrednim poznavanjem sistema izrecno ne izpodbije. Vrednost umetne inteligence pri tovrstnem delu zato ni v tem, da bi odpravila potrebo po lastnem kritičnem preverjanju avtorja, temveč v tem, da pospeši iskanje virov, izvedbo izračunov in urejanje obsežnega gradiva, končno presojo pravilnosti pa mora vedno opraviti človek, ki sistem, ki ga opisuje, dejansko pozna iz prve roke.

11 RAZPRAVA IN OVREDNOTENJE HIPOTEZ

11.1 Ovrednotenje zasnove zaprtega fluidnega sistema

Prva hipoteza je predvidevala, da zasnova zaprtega fluidnega sistema s kartušo za enkratno uporabo omogoča nadzorovan potek izolacije stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva z manj ročnimi posegi v primerjavi s klasičnim ročnim postopkom. Prehod od začetne zasnove, temelječe na ročno upravljanih brizgah, k zaprtemu sistemu z vrečkami, razdelilnimi kolektorji in peristaltičnimi črpalkami, opisan v poglavjih 3 in 9.9, je bil predpogoj za to, da lahko celoten postopek, od predhodnega polnjenja do pridobitve končnega produkta, poteka brez ročnega posega med samim potekom cikla. Testiranje tesnjenja, opisano v poglavju 9.5, je dodatno potrdilo, da sistem tudi pod podtlakom ostaja zaprt, kar je predpogoj za nadzorovan, ponovljiv potek postopka, ne le za zmanjšanje števila ročnih korakov.

11.2 Ovrednotenje izbire materialov, cevk, konektorjev, ventilov, črpalk in grelnih elementov

Drugo in tretjo hipotezo obravnavamo skupaj, saj obe zadevata izbiro komponent sistema. Druga hipoteza je predvidevala, da ustrezna izbira materialov, cevk, konektorjev, ventilov in tesnilnih mest vpliva na zanesljivo delovanje sistema, saj zmanjšuje možnost puščanja, nepravilnega pretoka in težav pri uporabi kartuše. Tretja hipoteza je predvidevala, da izbira črpalk in nastavitev pretočnih parametrov pomembno vplivata na enakomerno pretakanje vzorca skozi sistem ter na ponovljivost posameznih procesnih korakov.

Testiranje je pokazalo, da natančen notranji premer cevi neposredno določa dejansko pretočeni volumen pri danem številu vrtljajev črpalke, kar je bilo potrjeno v poglavju 9.3 ob primeru namenoma napačno vgrajene cevi. Pri razdelilnih kolektorjih se je izkazalo, da mora biti zasuk ventila natančno 45 stopinj, da je zagotovljeno popolno tesnjenje, sicer prihaja do počasnega uhajanja tekočine, kot je opisano v poglavju 9.5. Izbira poti med vrečkama A in B, kjer se je neposredna povezava izkazala za zanesljivejšo od posredne, speljane skozi razdelilni kolektor pod pravim kotom, prav tako podpira drugo hipotezo, saj gre za neposreden primer, kako izbira poti zmanjša tveganje zamašitve.

Pri črpalkah je testiranje pokazalo, da imata mešanje in koncentriranje nasprotujoči si zahtevi glede hitrosti: hitrejše mešanje celicam ne škoduje, medtem ko hitrejše koncentriranje poslabša učinkovitost filtracije skozi modul z votlimi vlakni, kot je opisano v poglavju 9.2. Prav ta

ugotovitev, da je bilo treba za dva dela istega sistema izbrati različni delovni hitrosti iste vrste črpalke, je neposreden dokaz, da nastavitev pretočnih parametrov ni poljubna, temveč mora biti prilagojena funkciji posameznega dela sistema.

Pri grelnih elementih je neposredna primerjava segrevanja in odsotnosti segrevanja med prebavo pokazala, da segrevanje ni pomembno le za skupni izkoristek celic, temveč tudi za kakovostno sestavo končnega produkta, saj je vzorec brez segrevanja vseboval višji delež celic krvnega izvora in nižji delež mezenhimskih matičnih celic, kot je opisano v poglavju 9.4. Vse tri komponente, torej cevke in konektorji, ventili ter grelni elementi, so torej izkazale merljiv vpliv na zanesljivost ali kakovost delovanja sistema, kar potrjuje obe hipotezi.

11.3 Ovrednotenje uporabe CAD-modeliranja pri razvoju kartuše

Četrta hipoteza je predvidevala, da uporaba CAD-modeliranja omogoča hitrejši razvoj in optimizacijo konstrukcijske zasnove kartuše, saj omogoča preverjanje geometrije, postavitve komponent, povezovalnih mest in možnosti sestavljanja že pred izdelavo prototipa. To hipotezo je mogoče potrditi posredno, prek zaporednih razvojnih različic kartuše, opisanih v poglavju 5.7, kjer je vsaka naslednja različica odpravljala konstrukcijske pomanjkljivosti prejšnje, ne da bi bilo treba za to vsakič izdelati in fizično preizkusiti povsem nov prototip. Ker pa neposredna primerjava med razvojem s CAD-orodjem in hipotetičnim razvojem brez njega ni bila izvedena niti ni izvedljiva, gre pri tej hipotezi za potrditev na podlagi posrednih dokazov iz razvojnega procesa, ne pa za neposredno izmerjen rezultat, kot je to mogoče pri drugih hipotezah tega poglavja.

11.4 Ovrednotenje vpliva pretoka, geometrije in načina pretakanja na celice

Peta hipoteza je predvidevala, da geometrija kartuše, hitrost pretoka in način pretakanja maščobnega tkiva vplivajo na obremenitev celic ter na rezultate izolacije stromalne vaskularne frakcije. Teoretična analiza v poglavju 8 je pokazala, da so strižne obremenitve v sistemu, tudi na najbolj kritičnih mestih, kot je reducirni nastavek med vrečkama A in B, dovolj nizke, da glede na literaturo za primerljiv laminaren cevni tok ne bi smele pomembno vplivati na viabilnost celic. Eksperimentalno testiranje v poglavju 9 je to sliko dopolnilo z nekoliko drugačnim poudarkom: hitrost črpalke sama po sebi ni bila škodljiva niti pri najvišjih testiranih vrednostih, medtem ko je bil način pretakanja, torej neprekinjeno proti mešanju s premori, tisti dejavnik, ki je na izkoristek in kakovost produkta pomembno vplival, saj je neprekinjeno mešanje dalo občutno slabše rezultate. Geometrija poti je nadalje vplivala na tveganje

zamašitve, kot je pokazala primerjava posredne in neposredne povezave vrečk v poglavju 9.3, pri največjem, 120-mililitrskem ciklu pa je prekratko dekantiranje glede na geometrijo kapalne komore povzročilo dejansko zamašitev sistema. Hipotezo je torej mogoče potrditi, z natančnejšo ugotovitvijo, da med naštetimi dejavniki način pretakanja in ustreznost geometrije glede na volumen vzorca vplivata na celice in na rezultat bolj neposredno kot sama hitrost pretoka.

11.5 Ovrednotenje iterativnega razvoja in izvedenih izboljšav

Šesta hipoteza je predvidevala, da iterativni razvoj, pri katerem se konstrukcijske in procesne rešitve prilagajajo na podlagi eksperimentalnih opažanj, omogoča izboljšanje delovanja sistema v primerjavi z nespremenjeno začetno zasnovo. To hipotezo podpira zbirni pregled sprememb v poglavju 9.9: prehod od brizg k vrečkam in črpalkam, zamenjava omejene črpalke Ismatec z zmogljivejšo Watson Marlow, prehod od modula Plasmart 25 na Plasmart 50, opustitev nezanesljivega senzorja v korist sifonskega mehanizma ter prehod od neprekinjenega k stopenjskemu mešanju so bile vse spremembe, uvedene izključno na podlagi opazovanega delovanja predhodne različice, in vsaka od njih je merljivo izboljšala bodisi zanesljivost bodisi izkoristek sistema.

11.6 Ovrednotenje uporabe umetne inteligence kot podpornega orodja

Sedma, dodatna hipoteza je predvidevala, da uporaba umetne inteligence kot podpornega orodja pri analizi razvojnih opažanj, primerjavi konstrukcijskih rešitev in interpretaciji rezultatov lahko prispeva k hitrejši optimizaciji zaprtega fluidnega sistema. Podrobna obravnava v poglavju 10 to hipotezo delno potrjuje. Umetna inteligenca je pospešila iskanje virov, izvedbo tehničnih izračunov, iskanje proizvodnih tehnik in komponent ter urejanje obsežnega, sicer razpršenega gradiva iz 63 eksperimentov. Hkrati pa je v poglavju 10.6 dokumentirano, da so prve različice izračunov in razlag, ki jih je predlagala umetna inteligenca, večkrat vsebovale napačne predpostavke o geometriji ali mehanizmu delovanja sistema, ki so bile odkrite šele z neodvisnim preverjanjem avtorja.

11.7 Potrditev oziroma zavrnitev hipotez

Tabela 7: Povzetek potrditve oziroma zavrnitve zastavljenih hipotez

Hipoteza	Status	Kratka utemeljitev
H1	Potrjena	Zaprt sistem z vrečkami in črpalkami omogoča izvedbo celotnega postopka brez ročnega posega, kar je s testom tesnjenja pod podtlakom tudi neposredno potrjeno (9.5)
H2	Potrjena	Natančen premer cevi, pravilen zasuk ventilov in ustrezna geometrija poti med vrečkama merljivo vplivajo na zanesljivost delovanja in tveganje zamašitve (9.3, 9.5)
H3	Potrjena	Nastavitev hitrosti črpalke je izkazano različna za mešanje in koncentriranje, kar potrjuje, da pretočni parametri vplivajo na ponovljivost procesnih korakov (9.2)
H4	Potrjena posredno	Zaporedne, s CAD-orodjem razvite različice kartuše, so odpravljale konstrukcijske pomanjkljivosti, neposredna primerjava z razvojem brez CAD-orodja pa ni bila izvedena (5.7)
H5	Potrjena	Način pretakanja in geometrija glede na volumen vzorca vplivata na obremenitev celic in rezultat izolacije bolj neposredno kot sama hitrost pretoka (8, 9.3, 9.4, 9.7)
H6	Potrjena	Vsaka od dokumentiranih iterativnih sprememb je izhajala iz eksperimentalnega opažanja in merljivo izboljšala zanesljivost ali izkoristek sistema (9.9)
H7	Delno potrjena	Umetna inteligenca je pospešila delo, a je zahtevala dosledno človeško preverjanje zaradi občasnih napačnih predpostavk (10.6)

Vir: (Lastni vir)

11.8 Omejitve razvite rešitve

Kljub potrditvi večine zastavljenih hipotez razvita rešitev ohranja več pomembnih omejitev. Najpomembnejša zadeva sam izkoristek koncentriranja. Po mešanju in dekantiranju iz vrečke odvzamemo le omejen volumen tekočinske plasti, v katerem je ujeta približno le ena tretjina celic, ki bi jih bilo teoretično mogoče zajeti iz te plasti znotraj vrečk, saj sistem brez centrifugalne sile nima načina, da bi celice iz preostale, neodvzete tekočine dodatno

skoncentriral ali pritegnil proti mestu odvzema. Modul z votlimi vlakni na že tako zmanjšani količini nato doda še svojo lastno izgubo pri koncentriranju, kot je opisano v poglavju 9.6. Ti dve izgubi, torej nepopoln zajem tekočinske plasti same in dodatna izguba pri filtraciji, sta ločeni od izgube celic v oljni in vezivnotkivni plasti, obravnavani v poglavju 9.7, in skupaj pojasnjujeta, zakaj je absolutni izkoristek celic pri tem sistemu nižji od tistega pri centrifugiranju.

Trajanje dekantiranja se je izkazalo za občutljivo na volumen vzorca, saj je pri največjem, 120-mililitrskem ciklu enak čas, ustrezen za manjše cikle, v enem primeru privedel do zamašitve kapalne komore. Zanesljivost senzorja za zaznavanje konca filtracije se je izkazala za nezadostno za samodejno delovanje, kar je bilo rešeno šele s prehodom na časovno in geometrijsko pogojen sifonski mehanizem, ta pa je zaradi nizke hitrosti in ozkega dopustnega odstopanja od predvidenih razmer manj prilagodljiv na spremembe v vhodnem vzorcu, kot bi bilo aktivno zaznavanje. Nazadnje ostaja odprto vprašanje, ali je nižja viabilnost pri mehanski izolaciji brez encima posledica dejanske mehanske poškodbe celic ali le njihove ujetosti znotraj še nerazgrajenih koščkov tkiva, kar iz obstoječih podatkov ni mogoče dokončno razločiti.

11.9 Možnosti nadaljnjega razvoja sistema

Na podlagi ugotovljenih omejitev je mogoče opredeliti več smeri nadaljnjega razvoja. Prva je podaljšanje ali prilagoditev trajanja dekantiranja glede na izbrani cikel, s čimer bi se izognili tveganju zamašitve, opaženemu pri največjem volumnu. Druga je uvedba ločenih programov za mehansko in encimsko izolacijo, s čimer bi se izognili nepotrebnemu dodatnemu izpiranju modula z votlimi vlakni pri mehanski poti, kot je bilo omenjeno že v poglavju 7.7. Tretja smer je nadaljnje raziskovanje alternativnih tehnologij ločevanja in koncentriranja celic, na primer akustičnega koncentriranja na mikrofluidnem čipu, omenjenega v poglavju 10.4, ki bi lahko dolgoročno presegel omejitve pasivnega, na gostoti temelječega dekantiranja. Nazadnje bi natančnejša karakterizacija mehanizma, odgovornega za nižjo viabilnost pri mehanski izolaciji, omogočila bolj utemeljeno odločitev o tem, ali je mehansko pot sploh smiselno obdržati kot samostojno možnost izolacije.

12 SKLEP

V okviru diplomskega dela je bil razvit zaprt fluidni sistem s kartušo za enkratno uporabo, namenjen avtomatizirani izolaciji stromalne vaskularne frakcije iz maščobnega tkiva. Delo je zajelo celoten razvojni lok, od izhodiščne naprave, temelječe na brizgah in ročnem rokovanju, prek konstrukcijskega razvoja kartuše in izbire njenih komponent do podrobne obravnave procesnih sklopov izolacije v končni, avtomatizirani obliki. Zasnova je bila nato ovrednotena z dveh dopolnjujočih se strani: teoretično, prek mehanike tekočin, ki je obravnavala hitrost pretoka, viskoznost, strižne obremenitve, geometrijo cevi in tveganje zamašitve, ter eksperimentalno, prek pregleda 63 razvojnih poskusov, izvedenih med letoma 2023 in 2026. Posebna pozornost je bila namenjena tudi vlogi umetne inteligence kot podpornega orodja pri samem razvoju in pri nastajanju tega dela.

Teoretična analiza je pokazala, da je tok skozi sistem pri vseh obravnavanih pogojih laminaren, z zadostno rezervo tudi glede tveganja kavitacije, strižne obremenitve pa ostajajo pod ravnjo, pri kateri bi po dostopni literaturi pričakovali pomembno poslabšanje viabilnosti celic. Eksperimentalno testiranje je to sliko dopolnilo z ugotovitvijo, da sama hitrost črpalke celicam ne škoduje niti pri najvišjih testiranih vrednostih, medtem ko način pretakanja, torej razporeditev mešanja v sklope s premori namesto neprekinjenega prečrpavanja, na izkoristek in kakovost produkta vpliva odločilno. Enako se je pokazalo, da morajo biti procesni parametri, kot je hitrost črpalke, prilagojeni funkciji posameznega dela sistema, saj je bila za mešanje in za koncentriranje z modulom z votlimi vlakni ugotovljena nasprotujoča si optimalna hitrost.

Primerjava s kontrolnim postopkom centrifugiranja je pokazala, da je viabilnost celic, pridobljenih z razvitim sistemom, primerljiva ali rahlo boljša, absolutni izkoristek pa nižji. Ta nižji izkoristek izhaja predvsem iz tega, da sistem brez centrifugalne sile iz vrečk odvzame le del tekočinske plasti, v katerem je ujeta približno tretjina teoretično razpoložljivih celic, dodatno pa k temu prispeva še izguba pri filtraciji skozi modul z votlimi vlakni, ne pa poškodba celic med samim pretakanjem. Iterativni razvoj, voden z eksperimentalnimi opažanji, se je izkazal za nujen pogoj za dosego delujoče končne zasnove, uporaba umetne inteligence kot podpornega orodja pa je razvoj in nastanek tega dela pospešila, a je zahtevala dosledno neodvisno preverjanje vsake pomembnejše trditve ali izračuna.

Razvita zasnova je zaprt sistem, sestavljen iz kartuše za enkratno uporabo z dvema vrečkama, dvema razdelilnima kolektorjema, tremi peristaltičnimi črpalkami, kapalno komoro z zaščitno

mrežico in modulom z votlimi vlakni, pri čemer celoten postopek, od predhodnega polnjenja do pridobitve končnega produkta, poteka samodejno, brez ročnega posega. Sistem podpira tri cikle, prilagojene volumnu 40, 100 in 120 mililitrov lipoaspirata, pri čemer končni volumen produkta pri vseh treh ostaja v podobnem, klinično uporabnem razponu med približno 6 in 9,5 mililitra. Viabilnost pridobljenih celic pri zrelejših različicah sistema dosledno presega 80 odstotkov, test tvorbe kolonij pa v vseh uspešno izvedenih poskusih potrjuje prisotnost funkcionalno sposobnih matičnih celic.

Nadaljnji razvoj bi moral prednostno nasloviti izkoristek koncentriranja, ki ostaja glavna omejitev razvite rešitve, bodisi s prilagoditvijo trajanja dekantiranja glede na izbrani cikel bodisi z raziskavo dodatnega mehanizma za zajem celic iz tekočinske plasti, ki trenutno ostane neizkoriščena znotraj vrečk. Smiselna je tudi uvedba ločenih programov za mehansko in encimsko izolacijo ter nadaljnja proučitev alternativnih tehnologij koncentriranja, kot je akustično ločevanje na mikrofluidnem čipu, ki bi lahko dolgoročno presegle omejitve, ki jih prinaša odsotnost centrifugalne sile v tem sistemu.

13 VIRI, LITERATURA

Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A. in Hakakian, C. S. (2015). Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*, *4*, 713. https://doi.org/10.1186/s40064-015-1509-2

ATCC. (n.d.). *Animal cell culture guide*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide

Blue-White Industries. (n.d.). *Understanding Wear Factors for Peristaltic Pump Tubes and Other Components*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.blue-white.com/article/understanding-wear-factors-for-peristaltic-pump-tubes-and-other-components/

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K. in Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells. *Cytotherapy*, *15*(6), 641–648. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006

Budde, D. in Jurkiewicz, E. (2021). Risk analysis of leachables in cell and gene therapy using a CAR-T model process. *International Journal of Pharmaceutics*, *607*, 121015. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121015

Çengel, Y. A. in Cimbala, J. M. (2024). *Fluid mechanics: Fundamentals and applications*. McGraw-Hill Education.

Chisti, Y. (2001). Hydrodynamic damage to animal cells. *Critical Reviews in Biotechnology*, *21*(2), 67–110. https://doi.org/10.1080/20013891081692

Cleveland, E. C., Albano, N. J. in Hazen, A. (2015). Roll, spin, wash, or filter? Processing of lipoaspirate for autologous fat grafting: An updated, evidence-based review of the literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *136*(4), 706–713. https://doi.org/10.1097/prs.0000000000001581

Cole-Parmer. (n.d.). *How to Choose the Right Pump for Your Lab*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.coleparmer.com/blog/peristaltic-vs-syringe-pumps/

Connolly, S., McGourty, K. in Newport, D. (2020). The in vitro inertial positions and viability of cells in suspension under different in vivo flow conditions. *Scientific Reports, 10*, 1711. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58161-w

Covestro. (2018). *Makrolon® Rx2530: ISO Datasheet*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://solutions.covestro.com/en/products/makrolon/makrolon-rx2530_000000000057535354

Cremona, M., Gallazzi, M., Rusconi, G., Mariotta, L., Gola, M. in Soldati, G. (2025). State of the Art in the Standardization of Stromal Vascular Fraction Processing. *Biomolecules, 15*(2), 199. https://doi.org/10.3390/biom15020199

Dykstra, J. A., Facile, T., Patrick, R. J., Francis, K. R., Milanovich, S., Weimer, J. M. in Kota, D. J. (2017). Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Translational Medicine, 6*(4), 1096–1108. https://doi.org/10.1002/sctm.16-0337

Eigenberger, A., Felthaus, O., Bartsch, A., Schimanski, T., Utpatel, K. in Prantl, L. (2025). The Influence of Sedimentation on the Composition of the Lipoaspirate and the Effects on Further Mechanical Processing. *Cells, 14*(8), 601. https://doi.org/10.3390/cells14080601

European Commission. (2022). *The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products.* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf

Ferretti, P., Pagliari, C., Montalti, A. in Liverani, A. (2023). Design and development of a peristaltic pump for constant flow applications. *Frontiers in Mechanical Engineering, 9*, 1207464. https://doi.org/10.3389/fmech.2023.1207464

Hahn, O., Ficht, P.-K., Bergmann-Ewert, W., Meyer, J., Wolff, A. in Peters, K. (2026). Influence of Donor Age, Donor Body Mass Index, and Harvesting Site on Cell Preparations from Human Adipose Tissue. *International Journal of Molecular Sciences, 27*(3), 1351. https://doi.org/10.3390/ijms27031351

Hampson, B. (1. maj 2014). *Closed Processing for Cell Therapies*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.genengnews.com/insights/closed-processing-for-cell-therapies/

Horne, D. C., Torrance, I., Modine, T. in Gourlay, T. (2009). The effect of priming solutions and storage time on plasticizer migration in different PVC tubing types: implications for wet storage of ECMO systems. *The Journal of ExtraCorporeal Technology, 41*(4), 199–205. https://doi.org/10.1051/ject/200941199

HP Development Company. (2018). *HP 3D High Reusability PA 12: Technical data sheet (4AA6-4895ENA)*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://hp.com/go/3DMaterials

International Organization for Standardization. (2016). *ISO 13485:2016 – Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes.* ISO.

International Organization for Standardization. (2019). *ISO 14971:2019 – Medical devices – Application of risk management to medical devices.* ISO.

International Organization for Standardization. (2025). *ISO 10993-1:2025 – Biological evaluation of medical devices – Part 1: Requirements and general principles for the evaluation of biological safety within a risk management process.* ISO.

Laminated Plastics. (n.d.). *Technical data sheet: ABS (acrylonitrile-butadiene-styrene)*. Pridobljeno 30. september 2026 iz https://laminatedplastics.com/abs.pdf

Medica S.p.A. (n.d.). *Plasmafilters: Membrane Specifications and Data*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://uk.medica-spa.com/storage/app/media/prodotti/AFERESI%20-%20PLASMAFILTRI%20ADULTI/M27308_REV08_PLASMAFILTRI.pdf

Oberbauer, E., Steffenhagen, C., Wurzer, C., Gabriel, C., Redl, H. in Wolbank, S. (2015). Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regeneration, 4*, 7. https://doi.org/10.1186/s13619-015-0020-0

Pak, J. (2011). Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *Journal of Medical Case Reports, 5*, 296. https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-296

Professional Plastics. (n.d.). *Typical properties of polypropylene.* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.professionalplastics.com/professionalplastics/content/Polypro.pdf

Saint-Gobain Performance Plastics. (2011). *TYGON® ND 100-65 Medical Tubing.* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.usplastic.com/catalog/files/specsheets/TYGON_ND_100-65.pdf

Saint-Gobain Performance Plastics. (n.d.). *TYGON® 3350 Sanitary Silicone Tubing.* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.professionalplastics.com/professionalplastics/Tygon-SiliconeTubing-3350.pdf

Stepperonline. (n.d.). *Brushless DC Motor vs. Stepper Motor*. Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.omc-stepperonline.com/support/brushless-dc-motors-vs-stepper-motors

Tong, Y., Liu, P., Wang, Y., Geng, C., Han, X., Ma, J., Li, F. in Cai, L. (2018). The effect of liposuction cannula diameter on fat retention, based on a rheological simulation. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open, 6*(11), e2021. https://doi.org/10.1097/gox.0000000000002021

VitaCyte. (n.d.). *What are the optimal temperatures for maximal collagenase and protease activity?* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.vitacyte.com/faq/optimal-temperatures-maximal-collagenase-protease-activity-2/

Watson-Marlow. (n.d.). *114 ST Pump Datasheet.* Pridobljeno 29. september 2026 iz https://www.wmfts.com/siteassets/catalog/products/corporate/watson-marlow-pumps/panel-mount-pumps/7250/literature/wd-wm-114st-en.pdf

Yanina, I. Y., Dyachenko, P. A., Abdurashitov, A. S., Shalin, A. S., Minin, I. V., Minin, O. V., Bulygin, A. D., Vrazhnov, D. A., Kistenev, Y. V. in Tuchin, V. V. (2023). Light distribution in fat cell layers at physiological temperatures. *Scientific Reports, 13*, 1073. https://doi.org/10.1038/s41598-022-25012-9

Yehl, C. J. in Zydney, A. L. (2020). Single-use, single-pass tangential flow filtration using low-cost hollow fiber modules. *Journal of Membrane Science, 595*, 117517. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117517

Zalazar, D., Feng, J., Banyard, D. A., Aliaghaei, M., Widgerow, A. D. in Haun, J. B. (2025). Integrated Fluidic Platform for Washing and Mechanical Processing of Lipoaspirate for Downstream Fat Grafting and Regenerative Applications. *Bioengineering, 12*(9), 918. https://doi.org/10.3390/bioengineering12090918

Zinger, G., Gronovich, Y., Lotan, A. M. in Sharon-Gabbay, R. (2024). Pilot Study for Isolation of Stromal Vascular Fraction with Collagenase Using an Automated Processing System. *International Journal of Molecular Sciences, 25*(13), 7148. https://doi.org/10.3390/ijms25137148