



Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych.

I. Hodowle komórek rosnących na nośnikach

Włodzimierz Grajek
Dariusz Łukaszyński
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

Wstęp

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił gwałtowny wzrost zainteresowania kulturami komórkowymi i tkankowymi ssaków. Decydującymi czynnikami stymulującymi rozwój tej dziedziny biotechnologii było:

- 1) opanowanie technik hodowlanych w dużej skali,
- 2) uzyskanie efektywnych linii komórkowych,
- 3) zdefiniowanie i uproszczenie pożywek, a przede wszystkim
- 4) ogromny wzrost zapotrzebowania na szczepionki antywirusowe, przeciwciała, hormony wzrostowe, interferony i enzymy metaboliczne dla celów medycznych, weterynaryjnych i diagnostycznych.

Duży wpływ na rozwój hodowli komórkowych ssaków ma również postęp w technikach rDNA. W tab. 1 przedstawiono główne produkty hodowli komórkowych ssaków mające znaczenie użytkowe.

TABELA 1
 PRODUKTY HODOWLI KOMÓRKOWYCH SSAKÓW O ZNACZENIU UŻYTKOWYM

Biomasa komórkowa	Produkty
sztuczne organy	przeciwciała monoklonalne
sztuczna skóra	interferony
limfocyty	czynniki wzrostowe
szpik kostny	szczepionki antywirusowe
	składniki krwi
	hormony
	enzymy

W hodowlach komórek ssaków stosowane są ich dwa podstawowe typy, tj. komórki rosnące swobodnie w zawieszynie oraz komórki zdolne do wzrostu tylko po przyczepieniu się do powierzchni nośnika. Do pierwszego typu należą m.in. komórki limfoidalne, przykładem komórek drugiego typu jest większość fibroblastów. Oba typy komórek wymagają stosowania odmiennych technik hodowlanych i odpowiednich bioreaktorów. Konieczność hodowli komórek na nośnikach stanowi poważny problem przy powiększaniu skali hodowli. W literaturze specjalistycznej można spotkać szereg różnorodnych propozycji zmierzających do przełamania istniejących trudności i opracowania ekonomicznych i technicznie dostępnych rozwiązań.

Systemy hodowli komórek zwierzęcych rosnących na nośnikach

Wiele komórek *Eukaryota* rozwija się tylko w stanie związanym, tj. po przyczepieniu się do nośnika. W normalnych warunkach rolę nośnika spełnia naturalna tkanka. Współdziałanie komórki z tkanką, w której rośnie, jest ważnym czynnikiem determinującym jej rozwój i funkcje. W warunkach hodowli w dużej skali unieruchomienie komórek stanowi poważny problem technologiczny. Komórki żyjące w stanie unieruchomienia rozwijają się tak długo, dopóki mogą zajmować nową powierzchnię nośnika i po zajęciu całej powierzchni rozwój populacji ustaje. Biorąc pod uwagę wysokie koszty pożywek ważne jest, aby stosunek powierzchni zajętej przez komórki do objętości pożywki był możliwie jak największy. Jest to jeden z podstawowych warunków, które należy spełnić przy powiększaniu skali hodowli. Jednocześnie jest to poważne utrudnienie technologiczne (11).

Adhezja między powierzchnią ciał stałych (nośnika, ścian naczyń hodowlanych, itp.), a obdarzoną odwrotnym ładunkiem ścianą komórkową jest utrzymywana przez jony dwuwartościowe, głównie Ca^{++} , oraz zasadowe białka produkowane przez komórki. Przykładem takiego białka może być fibronekty-

na wykazująca silne powinowactwo do wielu nośników, szczególnie kolagenu. W większości przypadków rolę „lepiszcza” spełnia szereg niespecyficznych białek poprzez oddziaływania elektrostatyczne i siły van der Waalsa.

Obok przyczepienia komórek do powierzchni musi być także spełniony drugi ważny warunek, a mianowicie wystarczająco szybka wymiana masy w obrębie warstwy rosnących komórek. Wymiana ta obejmuje dostarczenie pożywki i tlenu do komórki oraz usunięcie z ich otoczenia CO_2 i toksycznych metabolitów. Oba wymienione warunki są wzajemnie zależne; większa powierzchnia nośnika sprzyja wzrostowi ilości komórek, a to pociąga konieczność zwiększenia szybkości wymiany masy.

Na uwagę zasługują szczególnie problemy związane z dyfuzją. W przypadku komórek rosnących na powierzchni nośnika stałego, np. szkła, wszystkie procesy dyfuzyjne zachodzą między komórką a fazą ciekłą i gazową od strony pożywki. Im grubsza jest warstwa komórek, tym trudniejsza jest wymiana masy w obrębie dolnych warstw komórek. W takim układzie utrzymaniu wysokiej szybkości wymiany będzie sprzyjało zapewnienie możliwie dużej powierzchni wymiany przy cienkiej, najlepiej pojedynczej warstwie komórek. Jensen (11) przedstawia dane dotyczące stężeń poszczególnych składników pożywki na powierzchni warstwy komórek oraz w pożywce w odległości 1 mm od komórek, wskazując, że główny problem stanowi powolna dyfuzja tlenu oraz wolny odpływ mleczanu i dwutlenku węgla.

Szereg innowacji, które pojawiły się w ostatnim dziesięcioleciu miały na celu polepszenie stosunku powierzchni do objętości reaktora. Należy tutaj wymienić takie rozwiązania, jak:

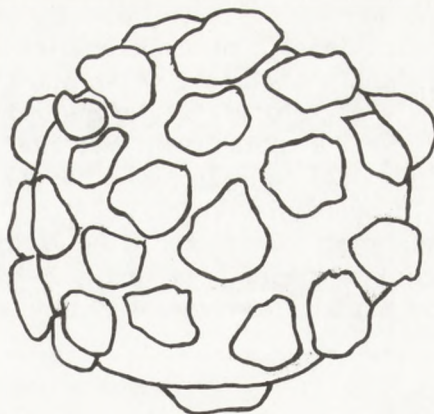
- 1) zastosowanie mikronośników,
- 2) hodowla komórek w kapilarach (bioreaktory membranowe typu *hollow-fiber*),
- 3) wprowadzenie porowatych nośników ceramicznych oraz
- 4) złoża z materiałów włóknistych (wata szklana).

Hodowle na mikronośnikach

Pierwsze hodowle w większej skali prowadzone były w obracanych butlach. Populacja komórek obrastała wewnętrzne powierzchnie butli, zaś jej obrotowy ruch pozwalał na ciągły kontakt komórek z pożywką i tlenem. Z uwagi na ograniczoną powierzchnię butli technika ta wymagała stosowania ogromnej liczby naczyń, a to pociągało za sobą wysokie koszty produkcyjne. Ponadto utrudniona była kontrola warunków hodowli, co prowadziło do dużego zróżnicowania jakościowego poszczególnych partii.

Kolejnym etapem rozwoju technik hodowli komórek ssaków było wprowadzenie mikronośników dla zwiększenia powierzchni osadzania komórek (rys. 1). Do hodowli kultur rosnących na mikronośnikach wykorzystywano na ogół klasyczne bioreaktory typu reaktora z mieszadłem mechanicznym lub pneumatycznym (*air-lift*).

Rys. 1. Komórki rosnące na mikronośniku.



Według Van Wezela (36) nośniki stosowane do hodowli komórkowych powinny spełniać następujące wymagania:

1. Mikronośnik powinien posiadać umiarkowany dodatni ładunek, co ułatwia przyczepianie się komórek. Niektóre komórki wymagają stosowania ujemnie naładowanego polimeru, np. karboksymetylocelulozy.

2. Korzystna jest niezbyt wysoka gęstość nośnika, najlepiej nieznacznie przekraczająca gęstość pożywki, a zatem w granicach $1,02 - 1,05 \text{ g/cm}^3$. Zapewnia to łatwe utrzymanie nośnika w zawieszynie.

3. Średnica mikrokulek powinna wynosić $150 - 250 \mu\text{m}$, co zapewnia zarówno dobrą homogenność medium hodowlanego, jak i korzystny stosunek powierzchni nośnika do objętości medium.

4. Powierzchnia kulek powinna być gładka, aby zapobiegać zniszczeniu komórek przy wzajemnym ocieraniu się w bioreaktorze.

5. Nośnik powinien być chemicznie neutralny i nie absorbować składników pożywki.

6. Korzystne jest, gdy nośnik jest przezroczysty, gdyż ułatwia to obserwację wzrostu komórek.

Dla powiększania skali hodowli najkorzystniejszy jest taki system, który zapewnia równomierne rozmieszczenie kulek nośnika w pożywce przy możliwie małych obrotach mieszadła. Stawia to odpowiednie wymagania zarówno przy wyborze rodzaju nośnika, jak i przy wyborze kształtu geometrycznego bioreaktora oraz typu mieszadła. W hodowlach z użyciem mikronośników efektywność przyczepiania się komórek do powierzchni nośnika zależy m.in. od częstotliwości kontaktów komórek z drobinami mikronośnika. W początkowej fazie hodowli komórki wprowadzane są do pożywki w formie zawiesziny. Zawiesina ta jest uzyskiwana z hodowli inoculum w butlach, po odczepieniu komórek z powierzchni szkła metodą tryptynizacji. Po wprowadzeniu komórek do bioreaktora i włączeniu mieszadła dochodzi do kontaktów między komórkami i kulkami nośnika. Im są one częstsze, tym większa jest szansa trwałego związania się komórki z mikronośnikiem. Ważnym czynnikiem jest przede wszystkim różnica w szybkości poruszania się obu ciał, gdyż determinuje to czas ich wzajemnego kontaktu podczas zetknięcia. Za idealną sytuację należy uznać tę, w której względna różnica szybkości komórek i nośnika jest zbliżona do zera. W tym rozumieniu wszelkie turbulencje w płynie hodowlanym w czasie zasiedlania nośnika przez komórki zakłócają ten stan i obniżają efektyw-

ność wiązania komórek. Obniżenie wielkości sił ścinających występujących w bioreaktorze może być osiągnięte przez zwiększanie lepkości pożywki, np. przez dodatek niewielkiej ilości agaru. Jednocześnie muszą być zapewnione jednakowe warunki mieszania w całej objętości pożywki (23).

W literaturze opisano zastosowania różnych materiałów jako nośników do hodowli komórkowych. Wymienić można pochodne dekstranu (6, 16, 35) i celulozy (26, 29, 32), pochodne dekstranu pokryte zdenaturowanym kolagenem (1), poliakrylamid (8), polistyren (12), żele agarozowe (3), szkło (7, 38) oraz materiały ceramiczne (18)(tab. 2). W praktyce większość wymienionych warunków spełniają tylko DEAE-żele. Inne materiały są albo zbyt ciężkie, lub za bardzo toksyczne, względnie za słabo wiążą komórki.

TABELA 2
MIKRONOŚNIKI DOSTĘPNE NA RYNKU ŚWIATOWYM

Rodzaj	Nazwa handlowa	Kompozycja
dextran	Cytodex 1	DEAE-dekstran
	Cytodex 2	dekstran pokryty aminami czwartorzędowymi
	Dormacell	dimery DEAE-dekstran
żelatyna	Geli-heads	żelatyna
	Cytodex 3	żelatyna pokryta dekstranem
	Ventregel	żelatyna
	Cultispher-G	żelatyna
kulki szklane	Bioglas	szkło pokryte sztucznym tworzywem
	Ventreglas	szkło pokryte sztucznym tworzywem
	Siran	szkło porowate
sztuczne tworzywa	Bioplas	sieciowany polistyren
	Biocarrier	poliakrylamid/DMAP
	Cytospheres	polistyren
	Micarcel G	poliakrylamid pokryty warstwą kolagenu lub gliko-glikanu

Dekstran i jego pochodne

W 1967 r. Van Wezel (35) po raz pierwszy wprowadził do pożywki ciekłej nośnik w postaci mikrokulek dekstranu. Pierwsze eksperymenty zakończyły się umiarkowanym sukcesem. Stwierdzono, że nośnik stosowany w stężeniach powyżej 1 g dekstranu/l pożywki wywołuje hamujący efekt na wzrost komórek. Wada ta została usunięta przez Levina i in. (16, 17) po modyfikacji

dekstranu poprzez podstawienie dodatnio naładowanych grup N,N-etyloaminoetylowych. Dzięki temu możliwe było uzyskiwanie koncentracji komórek na poziomie 5×10^6 /ml, przy stężeniu DEAE-dekstranu dochodzącym do 5g/l. W zależności od metodyki obróbki dekstranu z DEAE-HCl możliwe jest uzyskanie zróżnicowanej siły jonowymiennej (34).

Clark i in. (5) poddali analizie parametry hodowli silnie determinujące wzrost różnych komórek zwierzęcych. Autorzy ci stosowali w badaniach ponad 60 typów komórek hodując je na mikronośniku typu Sephadex z niewielkim stopniem podstawienia (do 1,5 meq/g) przez grupy DEAE. Preparat ten jest produkowany przez firmę Pharmacia (Szwecja) pod nazwą Cytodex. Wśród krytycznych parametrów hodowli wymieniają zarówno czynniki biologiczne, takie jak jakość stosowanych surowic, sposób przygotowania inoculum i system buforowania pożywki, a także niektóre czynniki techniczne, szczególnie szybkość mieszania pożywek w czasie wszystkich faz rozwoju komórek. Szybkość wzrostu i wydajność kultury jest znacznie zmniejszona, gdy szybkość mieszania jest tak duża, że dochodzi do wymywania z kulek nośnika komórek gotowych do podziału mitotycznego. Redukcja szybkości mieszania jest także konieczna w większości kultur komórek linii transformowanych, które na ogół wykazują niższą przyczepność do nośnika. Należy jednak zaznaczyć, że w niektórych typach komórek w późniejszych stadiach kultury dochodzi do zlepiania się kulek nośnika. Zjawisku temu można zapobiec przez delikatne zwiększenie szybkości mieszania. Zwykle optymalna szybkość mieszania w klasycznych bioreaktorach nie przekracza 50 obr./min i zależy od typu komórek, reologii pożywki oraz objętości i kształtów bioreaktora.

Nośniki żelatynowe

Doskonałym nośnikiem wykonanym z modyfikowanej żelatyny jest Culti-Spher-G, odznaczający się strukturą makroporowatą. Duża powierzchnia, poszerzona o duże wewnętrzne kapilary, pozwala na dobry rozwój kultury. Nikalai i Hu (22) wykazali, że stosując ten nośnik przy niskiej szybkości przyczepiania się można uzyskać wysoką koncentrację komórek CHO i Vero. W pierwszej fazie obserwowano przyczepianie się komórek wyłącznie na powierzchni kulek nośnika, a następnie przemieszczanie się komórek w głąb makrokapilar.

Celuloza i jej pochodne

Reuveny i in. (26) wykonali badania z zastosowaniem mikronośników wykonanych z dodatnio naładowanej DEAE celulozy o różnej zdolności jonowymiennej, od 0,3 do 2 meq/g s.m. nośnika. Na tych nośnikach hodowali oni ustabilizowane linie komórkowe nerek młodych chomików (BHK) i nerek psich, linię fibroblastów mysich oraz fibroblasty embrionów kurzych. Autorzy stwierdzili, że kinetyka przyczepiania się komórek do nośnika była ściśle uza-

leźniona od zdolności jonowymiennych DEAE-celulozy. Minimalna zdolność jonowymienna niezbędna dla wiązania komórek na powierzchni nośnika została określona jako 0,31 – 0,5 meq/g. Stwierdzono przy tym, że kinetyka wiązania zależała także od typu hodowanej komórki. Największej zdolności jonowymiennej nośnika wymagały fibroblasty embrionów kurzych. Autorzy ci wykazali jednocześnie, że na kinetykę wiązania komórek decydujący wpływ ma nie tyle wielkość powierzchni, co jej ładunek. Jednocześnie obserwowano większą szybkość wiązania komórek na DEAE-celulozie niż na DEAE-dekstranie. Odklejanie komórek od nośnika można przeprowadzić za pomocą enzymu trypsyny, przy czym zregenerowane kulki mikronośnika mogą być z powodzeniem ponownie stosowane (10).

Nośniki syntetyczne — poliakrylamid, poliuretan

Do hodowli komórek ssaków w charakterze nośnika wykorzystywano także polimery syntetyczne. Przykładem takich zastosowań może być użycie poliakrylamidu do hodowli komórek BHK, MDCK, CEF i MRC-5 (27).

Niezwykle ciekawe rozwiązanie zaproponowali badacze japońscy. Zakładając, że ilość produktu końcowego będzie proporcjonalna do gęstości komórek w bioreaktorze, wprowadzili oni w charakterze nośnika spienioną piankę poliuretanową (19). Nośnik ten wykazywał dużą makroporowatość. Przeciętna średnica por wynosiła 500 μm , a gęstość właściwa nośnika sięgała zaledwie 0,012 g/cm^3 . W pierwszej wersji zastosowali oni bioreaktor kolumnowy z wypełnieniem nieruchomym. W reaktorze tym hodowali komórki nerek małych (Vero) rosnące na powierzchni i wewnątrz 4 mm kulek pianki poliuretanowej. W wyniku hodowli uzyskano wysoką gęstość komórek sięgającą $4,8 \times 10^7/\text{cm}^3$ poliuretanu, co w przeliczeniu na objętość roboczą bioreaktora dawało $2,4 \times 10^7$ komórek/ cm^3 . System ten nie zapewniał jednak dostatecznego transferu masy w obrębie kulek poliuretanowych. W związku z tym zaproponowano dwa znacznie ulepszone systemy bioreaktorów kolumnowych z łożem nieruchomym. Pierwszy z nich wyposażony był w cienkie płyty wykonane z poliuretanu o grubości 0,8 mm, ułożone w poprzek bioreaktora (20). Między płytami znajdowały się wolne kanały, którymi przepływała natleniona pożywka zaopatrując rosnące komórki w składniki pokarmowe. Samo natlenianie pożywki odbywało się na drodze dyfuzji w innym naczyniu, co zabezpieczało komórki przed uszkodzeniami mechanicznymi. W drugim wariantcie zastosowano reaktor kolumnowy wyposażony tylko w jeden dysk, co pozwalało na zredukowanie wolnych przestrzeni w bioreaktorze. Dysk ten zbudowany był w formie krawca, na którego zewnętrzne powierzchnie były nałożone z obu stron nylonowe membrany. Systemy te pozwalały na znaczne zwiększenie wydajności hodowli. Tak też, w bioreaktorze płytowym komórki Vero i CHO-K1 osiągnęły odpowiednio gęstość $1,1 \times 10^8$ i $4,2 \times 10^7$ komórek w przeliczeniu na 1 cm^3 poliuretanu. W reaktorze dyskowym gęstość komórek Vero osiągnęła wartość $5,57 \times 10^9/\text{g}$ poliuretanu, co odpowiadało $6,7 \times 10^7$

komórek/cm³ objętości roboczej bioreaktora. Jest to gęstość komórek 3-krotnie wyższa od uzyskiwanej w reaktorze wypełnionym kulkami poliuretowanymi.

Nośniki szklane

Do hodowli komórek rosnących na nośnikach są używane także szklane kulki o średnicy 2 – 3 mm (29, 38). Nośnik ten jest zalecany głównie do hodowli komórek osiągających umiarkowaną gęstość. W kulturach o dużej gęstości wymagana szybkość mieszania przekracza zwykle wartości uznane za bezpieczne dla komórek ssaków. Stosowanie kulek szklanych daje porównywalne wyniki do innych nośników. Ważną zaletą szkła jest możliwość jego powtórnego użycia, po odzepieniu komórek pod wpływem działania enzymów (np. trypsyny). Warto podkreślić, że odzepianie komórek od nośnika szklanego jest znacznie łatwiejsze niż przy nośnikach dekstranowych czy celulozowych. Metabolizm komórek unieruchomionych na kulkach szklanych jest bardzo zbliżony do metabolizmu komórek rosnących na powierzchni szkła w butlach hodowlanych.

Zebrane dotychczas doświadczenia praktyczne w dziedzinie hodowli komórkowych przyczepno-zależnych na mikronośnikach wskazują na poważne ograniczenia związane z trudnościami przy powiększaniu skali oraz z ograniczoną liczbą linii komórkowych rosnących w tych warunkach. W literaturze napotkać można tylko nieliczne opisy hodowli prowadzonych tą techniką w skali kilkuset litrów (37).

Materiały ceramiczne

W ostatnich latach czynione są wysiłki nad znalezieniem nowych, bardziej praktycznych nośników. Wydaje się, że duże perspektywy stoją przed materiałami ceramicznymi o silnie rozwiniętej porowatości.

Opis takiego nośnika został przedstawiony przez Lydersena i in. (18). Ma on postać cylindra posiadającego wewnątrz kwadratowe kanały o średnicy 1 mm biegnące wzdłuż cylindra. Liczba tych kapilar jest bardzo duża i wynosi 68/cm². Pozwala to na rozwinięcie 32 cm² powierzchni na 1 cm³ objętości nośnika. Dzięki dużej powierzchni i dobrej przyczepności możliwe jest osiągnięcie wysokiej gęstości komórek, przewyższającej w niektórych przypadkach (WI-38, HeLa, RPMI-1788, Vero, RTG-2) gęstość uzyskiwaną w kulturach rosnących w obracanych butlach.

Interesujące badania nad stosowaniem nośników ceramicznych do hodowli linii komórkowej L929 prowadzili Suzuki i wsp. (30,31). Autorzy ci do osadzenia komórek wykorzystali komponenty wchodzące w skład tkanki kostnej, tj. hydroksyapatyt i fosforan trójwapniowy. Są to materiały biokompatybilne z wieloma tkankami ssaków. Badania wykazały, że nośnik sporządzony z mieszaniny hydroksyapatytu (20%) i fosforanu trójwapniowego (80%) wykazuje przyczepność porównywalną z przyczepnością polistyrenu. Wykazano także, że korzystny wpływ na przyczepianie się komórek ma ich rosnąca gęstość

oraz pokrycie nośnika surowicą lub plazmą bydłą. Stwierdzono także, że przyczepność komórek do nośnika zależy od jego hydrofobowości oraz kąta kontaktu między komórką a powierzchnią nośnika.

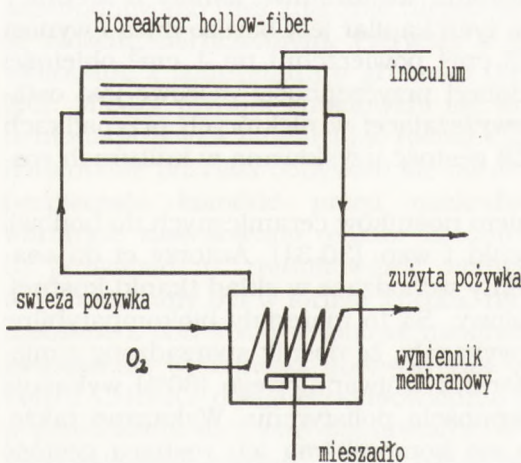
Hodowle w bioreaktorach membranowych

Alternatywę dla hodowli komórek przyczepionych do powierzchni kulek mikronośników stanowi hodowla komórek w bioreaktorze typu *hollow-fiber* (rys. 2) lub między warstwami płasko ułożonych membran (9).

Pierwsze doniesienia o hodowli komórek ssaków w bioreaktorach *hollow-fiber* pojawiły się w latach siedemdziesiątych (13). Autorzy ci przedstawili wyniki prac nad zastosowaniem typowych modułów ultrafiltracyjnych do hodowli linii komórkowych.

Ściany kapilar oraz ściany płaskich arkuszy membran zbudowane są z porowatych materiałów przepuszczających cząsteczki o określonej średnicy. Systemy te są analogiczne do urządzeń stosowanych do ultrafiltracji. Hodowane komórki przyczepiają się do powierzchni membran od strony zewnętrznej wiązki kapilar, podczas gdy we wnętrzu kapilar przepływa strumień świeżej pożywki zaopatrywany dodatkowo w powietrze. Dzięki porowatości ścian zachodzi transfer składników pokarmowych oraz tlenu, a jednocześnie usuwane są szkodliwe metabolity i dwutlenek węgla. W ten sposób wrażliwe komórki ssaków chronione są przed uszkodzeniami wywołanymi szybkim przepływem pożywki i intensywnym ruchem pęcherzyków gazów. Jednocześnie do powierzchni komórek dostarczane są wszystkie niezbędne substancje odżywcze. Należy zaznaczyć, że znane są także układy odwrotne, gdzie komórki są umieszczone wewnątrz kapilar.

Warunki hodowli oraz zastosowania bioreaktorów *hollow-fiber* do hodowli kultur komórkowych zostały syntetycznie przedstawione w pracy przeglądowej



Rys. 2. Bioreaktor membranowy typu *hollow-fiber* z zewnętrznym wymiennikiem gazowym.

Pireta i Cooneya (25). Autorzy ci wskazują na różnorakie korzyści płynące ze stosowania tego typu reaktorów. Wymieniają wśród nich ochronę komórek przed uszkodzeniami mechanicznymi, zredukowane potrzeby pożywkowe oraz możliwości prowadzenia procesu w sposób ciągły. Ponadto system ten nadaje się do hodowli zarówno komórek adherentnych, jak i rosnących w zawieszynie. Dużą wadę tego systemu stanowią jednak trudności z powiększaniem skali hodowli i należy stwierdzić, że system ten nadaje się wyłącznie do hodowli w małej skali, maksymalnie pilotowej.

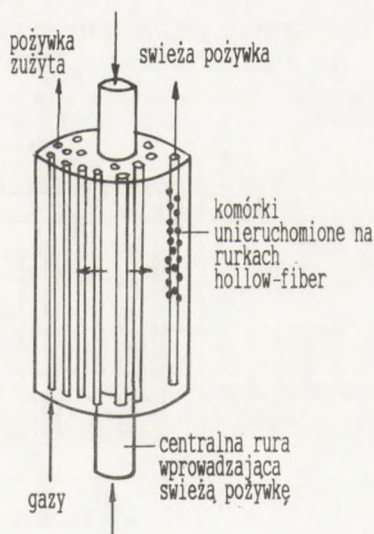
Dużą zaletą bioreaktorów membranowych jest możliwość uzyskania wysokiej gęstości komórek, mimo ich wolnego wzrostu w pierwszej fazie hodowli. Zwykle po osiągnięciu maksymalnej koncentracji wzrost komórek słabnie natomiast ich zdolność do produkcji metabolitów utrzymuje się jeszcze przez długi czas, często przez całe miesiące. Możliwość stosowania membran kapilarnych o małej porowatości pozwala na selektywne zagęszczanie wielko-cząsteczkowych metabolitów, na przykład antyciał, hormonów lub wirusów. Stosując zdefiniowane pożywki możliwe jest bezpośrednie wydzielanie przeciwciał z bioreaktora wyposażonego w kapilary przeznaczone do ultrafiltracji. Uzyskuje się przy tym koncentrację białek na poziomie powyżej 10 g/l i indeks czystości produktu powyżej 95%.

W hodowlach komórkowych stosuje się najczęściej membrany o punkcie odcięcia 30 – 100 kD. Doświadczenia wskazują, że większa porowatość membran pozwala na uzyskanie wyższej wydajności produkcji przeciwciał.

Transport tlenu i niskocząsteczkowych składników pokarmowych odbywa się na drodze dyfuzji molekularnej. Dla uniknięcia uszkodzeń komórek i lepszego transferu tlenu do fazy ciekłej stosowane są układy, w których tlen wtłacza się oddzielnie do wybranych kapilar. Zwykle stosunek ilości kapilar przewodzących tlen do ilości kapilar przewodzących świeżą pożywkę wynosi 3 : 1.

Usprawnienie działania reaktora kapilarnego, szczególnie w zakresie zwiększenia szybkości wymiany masy, może być osiągnięte poprzez wprowadzenie centralnej rury zasilającej, otoczonej wiązkami cienkich kapilar z komórkami unieruchomionymi na ich zewnętrznej powierzchni (rys. 3) (33). System taki eliminuje tworzenie się gradientu stężenia pożywek i metabolitów po obu stronach kapilar, co ma miejsce w klasycznych bioreaktorach typu *hollow-fiber*.

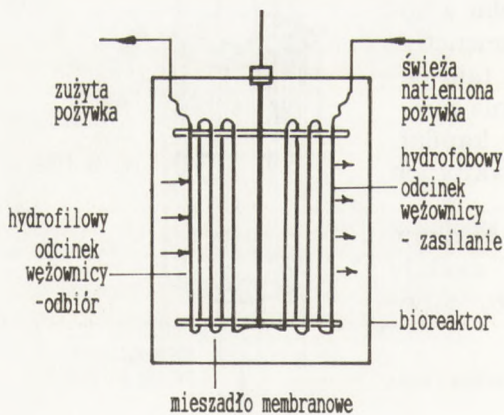
Ku i in. (14) opracowali ciekawy i wydajny bioreaktor membranowy oparty o moduły zawierające zestaw membran płaskich. W ho-



Rys. 3. Bioreaktor *hollow-fiber* z centralną rurą do wprowadzania świeżej pożywki.

hodowlach linii komórkowych WI-38 uzyskali oni gęstość komórek na poziomie ok. $1,35 \times 10^6/\text{cm}^2$. Dla porównania warto podać, że w hodowlach prowadzonych w butlach dla tych samych komórek uzyskano gęstość na poziomie $1 - 4 \times 10^5/\text{cm}^2$. System membran płaskich stwarza wyjątkowo duże możliwości w powiększaniu skali hodowli. Autorzy przeprowadzili badania porównawcze nad hodowlą komórek WI-38, HeLa, MK2 i SV3T3 w systemie reaktorów membranowych kapilarnych i płaskich, wskazując na wyższość bioreaktora z membranami płaskimi. Istotnym czynnikiem wpływającym na działanie reaktora płaskomembranowego jest równomierne dostarczanie świeżej pożywki na całej szerokości arkusza membrany.

Ciekawy zestaw aparaturowy do hodowli ciągłej komórek zwierzęcych opisał Lehmann i wsp. (15). Jego najistotniejszą część konstrukcyjną stanowi oryginalny typ mieszadła membranowego (rys. 4). Składa się ono z dwuczęściowej węzownicy nawiniętej pionowo na ramy mieszadła. Węzownica ta jest wykonana z hydrofobowego polipropylenu o grubości ścianki 0,4 mm i porowatości sięgającej aż 75% powierzchni tworzywa. Materiał jest produkowany przez firmę Enka (Wuppertal) pod handlową nazwą Accurel. Tworzywo moczone w etanolu ulega modyfikacji i nabiera właściwości hydrofilnych. Cecha ta została wykorzystana w konstrukcji reaktora w ten sposób, że część węzownicy, przeznaczona do wtłaczania powietrza do pożywki, jest hydrofobowa, natomiast część służąca do wymiany pożywki ma charakter hydrofilny i pracuje jako ultrafiltr. Wymiana cieczy jest na tym odcinku dwukierunkowa i przebiega w cyklu 20 min; raz wprowadzana jest świeża pożywka, a następnie odciągana jest ta zużyta, zawierająca produkt. Wał mieszadła wykonuje ruchy wahadłowe, co wystarcza do dobrego wymieszania zawartości bioreaktora. System ten odznacza się bardzo dobrymi parametrami wymiany masy. Przy prowadzeniu procesu metodą perfuzji (ciągła hodowla: wymiana pożywki z zatrzymaniem komórek) reaktor ten jest podłączony do zewnętrznego ultrafiltra spełniającego rolę separatora komórek. Przedstawiona aparatura może być wykorzystana zarówno do hodowli komórek rosnących w zawiesinie, jak i na mikronośnikach. W tym ostatnim przypadku do ram mieszadła mem-



Rys. 4. Bioreaktor z dwusekcyjnym mieszadłem membranowym.

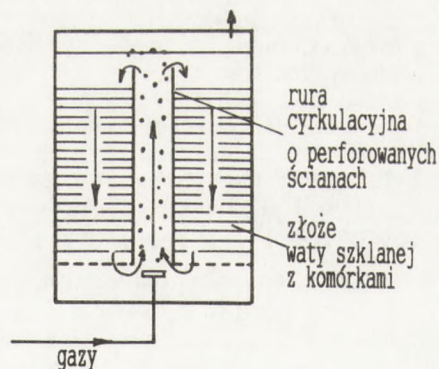
branowego przymocowane są paski materiału usuwające z węzownicy przyklejające się do niej kulki mikronośnika. Autorzy przeprowadzili badania nad powiększeniem skali tego bioreaktora od 20 l do 150 l w hodowlach komórek mysich L, CHO i BHK. Studia porównawcze nad reaktorem z mieszałem membranowym oraz bioraktorem typu *hollow-fiber* pracujących w systemie perfuzyjnym wykazały zdecydowaną wyższość tego pierwszego (28).

Systemy kapilarne mają bardzo szerokie zastosowania w hodowli komórek przyczepno-zależnych. Używa się ich m.in. do produkcji prolaktyny, ludzkiej gonadotropiny oraz insuliny. Ponadto system ten był stosowany do studiów nad rakiem sutków *in vitro* i do ciągłej produkcji zarodkowych rakotwórczych antygenów.

Hodowle w złożach włóknistych

Innym alternatywnym rozwiązaniem jest hodowla komórek w złożu z waty szklanej. Metoda ta została z dobrym skutkiem zastosowana do hodowli rekombinowanych komórek jajników chomika chińskiego (rCHO) wykorzystanych przy produkcji γ -interferonu (24). Stosowane włókna szklane miały średnicę ok. 80 μm .

Nowy typ bioreaktora typu *air-lift* został opisany przez Chiou i in. (4) oraz Murakamiego i in. (21). Wyposażony on jest w wewnętrzną rurę cyrkulacyjną oraz w nieruchome złożo z waty szklanej, umieszczone między rurą cyrkulacyjną a ścianami bioreaktora (rys. 5). Natlenianie pożywki odbywa się poprzez wprowadzanie powietrza od dołu do rury cyrkulacyjnej za pośrednictwem aeratora, wywołując ruch wznoszący cieczy. Jest to sposób bardzo skuteczny i stosowany często w bioreaktorach do hodowli mikroorganizmów. U góry rury cyrkulacyjnej następuje uwolnienie pęcherzyków powietrza po czym natleniona pożywka spływa w dół przez złożo z waty szklanej, w którym unieruchomione są hodowane komórki. Kontrola systemu hodowlanego polega na utrzymywaniu stężenia rozpuszczalnego tlenu na poziomie powyżej 20% nasycenia. Czynnikiem regulacyjnym jest szybkość napowietrzania. Autorzy ci podają, że pod koniec hodowli szybkość wprowadzania powietrza osiągnęła wartość 0,8 vvm, a zatem była bardzo wysoka. System ten jest bardzo skuteczny. Osiągnięto w nim 230-krotne zwiększenie gęstości inoculum, a końcowa gęstość komórek γ -CHO dochodziła do $6,8 \times 10^7/\text{ml}$. Dalsze badania autorów wykazały bardzo duże możliwości powiększania skali tego systemu, teoretycznie nawet do 76 000 l, przy gęstości komórek $1,2 \times 10^7/\text{ml}$.



Rys. 5. Bioreaktor *air-lift* ze złożem stałym z waty szklanej.

Wnioski końcowe

Kultury komórek ssaków są szeroko wykorzystywane przez współczesną biotechnologię do produkcji białek o złożonej strukturze oraz do wytwarzania szczepionek. Znaczna część stosowanych linii komórkowych rośnie wyłącznie w formie warstwy pojedynczych komórek przyczepionych do powierzchni stałej. Stanowi to poważne ograniczenie w zwiększaniu ich gęstości w pożywce. Konsekwencją tego jest ograniczona produktywność bioreaktorów. Dla zwiększenia powierzchni hodowlanej stosuje się powszechnie mikronośniki. Muszą one sprostać wysokim wymaganiom; powinny one być fizjologicznie neutralne dla komórek, wytrzymałe mechanicznie, posiadać rozwiniętą powierzchnię oraz mieć gęstość zbliżoną do gęstości stosowanych pożywek. W ostatnich latach obserwuje się wyraźną tendencję do stosowania nośników z materiałów sztucznych, jak szkło, ceramika i tworzywa sztuczne. Aktualnie oferowane są przez producentów tanie nośniki tego typu przeznaczone do hodowli komórkowych.

Hodowle komórek przyczepno-zależnych mają długą tradycję i techniki ich hodowli można uznać za dobrze opanowane. Głównym czynnikiem ograniczającym stosowanie poszczególnych technik jest brak możliwości powiększania skali hodowli. Spośród opisanych w literaturze systemów hodowlanych najbardziej przydatne wydają się systemy hodowli na mikronośnikach przy użyciu bioreaktorów z mieszaniem pneumatycznym. W mniejszej skali dominują obecnie bioreaktory membranowe typu *hollow-fiber*.

W ostatnich latach obserwowana jest tendencja do stosowania większych reaktorów, wyposażonych w specjalne systemy służące do ochrony komórek przed mechanicznymi uszkodzeniami. Wśród nich należy wymienić przede wszystkim reaktory ze złożem stałym.

Literatura

1. Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, (1981), Sweden, 27.
2. Butler M., (1991), Mammalian Cell Biotechnology. A Practical Approach. ed. Butler M., 1 - 25, Oxford Univ. Press.
3. Cadic C., Dupuy B., Pianet I., Merle M., Margerin C., Beziau J. H., (1992), Biotechnol. Bioeng., 39, 108 - 112.
4. Chiou T.-W., Murakami S., Wang D. I. C., (1991), Biotechnol. Bioeng., 37, 755 - 761.
5. Clark J., Hirstenstein H., Gebb C., (1980), Develop. Biol. Standard., 46, 117 - 124.
6. Crespi Ch. L., Imamura T., Leong P.-M., Fleischaker R. J., Brunengraber H., Thilly W. G., (1981), Biotechnol. Bioeng., 28, 2673 - 2689.
7. Griffiths J. B., Thornton B., McEntee I., (1982), Dev. Biol. Standard., 50, 103 - 110.
8. Hirstenstein M., Clark J., Lindgren G., Vretblad P., (1979), Dev. Biol. Standard., 46, 109 - 116.
9. Hopkinson J. (1985), Bio/Technol., 3, 225 - 230.
10. Hu W.-S., Giard D. J., Wang D. I. C., (1985), Biotechnol. Bioeng., 27, 1466 - 1476.
11. Jensen M. D., (1981), Biotechnol. Bioeng., 28, 2703 - 2716.
12. Johansson A., Nielsen V., (1980), Dev. Biol. Standard., 46, 125.

13. Knazek R. A., Guilliono P. M., Kohler P. O., Dedrick R. L., (1972), *Science*, 178, 65 – 66.
14. Ku K., Kuo M. J., Delente J., Wildi B. S., Feder J., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 79 – 95.
15. Lehmann J., Vorlop J., Buntmeyer H., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, ed. Spier R. E., Griffiths J. B., Academic Press, 3, 221 – 237.
16. Levine D. W., Wong J. S., Wang D. I. C., Thilly W. C., (1977), *Som. Cell Gen.*, 3, 149 – 155.
17. Levine D. L., Wang D. I. C., Thilly W. G., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 821 – 845.
18. Lydersen B. K., Pugh G. G., Paris M. S., Sharma B. P., Noll L. A., (1985), *Bio/Technol.*, 3, 63 – 67.
19. Matsushita T., Ketayama M., Kamihata K., Funatsu K., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 287 – 290.
20. Matsushita T., Hidaka H., Kamihata K., Kawakubo Y., Funatsu K., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 159 – 164.
21. Murakami S., Chiou T.-W., Wang D. I. C., (1991), *Bieng. Biotechnol.*, 37, 762 – 769.
22. Nikolai T. J., Hu W.-S., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 203 – 208.
23. Nilsen V., Johansson A., (1980), *Develop. Biol. Standard*, 46, 131 – 136.
24. Perry S. D., (1987), Master's Thesis. MIT, Cambridge, MA, USA.
25. Piret J. M., Cooney C. L., (1990), *Biotech. Adv.*, 8, 763 – 783.
26. Reuveny S., Silberstein A., Shahar A., Freeman E., Mizrahi A., (1982), *In Vitro*, 18, 92 – 98.
27. Reuveny S., Mizrahi A., Kotler M., Freeman A., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 469 – 480.
28. Ryll T., Jager V., Lucki-Lange M., Herbst D., Wagner R., (1990), *Biologicals from Recombinant Microorganisms and Animal Cells*, ed. White M. D., Reuveny S., Shafferman A., Balaban Publishers, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 137 – 153.
29. Spier R. E., Whiteside J. P., (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 659 – 667.
30. Suzuki T., Toriyama M., Kawamoto Y., Yokogawa Y., Kawamura S., (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 164 – 168.
31. Suzuki T., Toriyama M., Kawamoto Y., Yokogawa Y., Kawamura S., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 450 – 456.
32. Talbot P., Keen M.J., (1979), *Dev. Biol. Standard.*, 46, 147 – 149.
33. Tharakan J. P., Chau P. C., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 329 – 342.
34. Thilly W. G., Levine D. W., (1979), *Methods in Enzymology*, 58, 184 – 194.
35. Van Wezel A. L., (1967), *Nature (London)*, 216, 64 – 65.
36. Van Wezel A. L., (1976), *Develop. Biol. Standard.*, 37, 143 – 147.
37. Van Wezel A. L., Van der Velden de Groot C. A. M., (1978), *Process Biochem.*, March, 6 – 8.
38. Varani J., Dame M., Beals T. F., Wass J. A., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1359 – 1372.

Pilot plant and industrial systems for animal cell cultivation.

I. Anchorage-dependent cell cultures

Summary

Several methods used to cultivate anchorage-dependent animal cells on a large scale are presented. These methods include the cultures on microcarriers in stirred and *air-lift* bioreactors, the cultures in *hollow-fiber* and *flat-plate* membrane bioreactors as well as the cultures attached to porous or fiber solid supports. The critical parameter in anchorage-dependent cultures is the adhesiveness of the cells to the carrier materials and the surface proliferation rate.

Key words:

anchorage-dependent cell, animal cell, bioreactor, hollow-fiber.

Adres do korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.