

Hodowla komórek zwierzęcych *in vitro*

Aleksander Chmiel

Samodzielna Pracownia

Biosyntezy Środków Leczniczych

Akademia Medyczna

Łódź

Hodowla komórek zwierzęcych odgrywa istotną rolę w badaniach podstawowych w zakresie biologii komórkowej i molekularnej, umożliwia tworzenie nowych modeli doświadczalnych i pozwala na prowadzenie badań, których wykonanie na całym organizmie byłoby niemożliwe. Hodowle komórkowe są używane m.in. w badaniach wirusologicznych, skринingu leków przeciwnowotworowych, testach toksykologicznych oraz w metodach analitycznych. W tym opracowaniu omówione zostaną wybrane aspekty technologiczne hodowli komórkowych. Wstępna charakterystykę komórek zwierzęcych, w porównaniu z komórkami roślinnymi i drobnoustrojowymi omówiono we wcześniejszej pracy (1). Przedstawione zostaną sposoby hodowli komórek zwierzęcych w procesach biotechnologicznych, w których wytwarzane są produkty stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt (tab. 1).

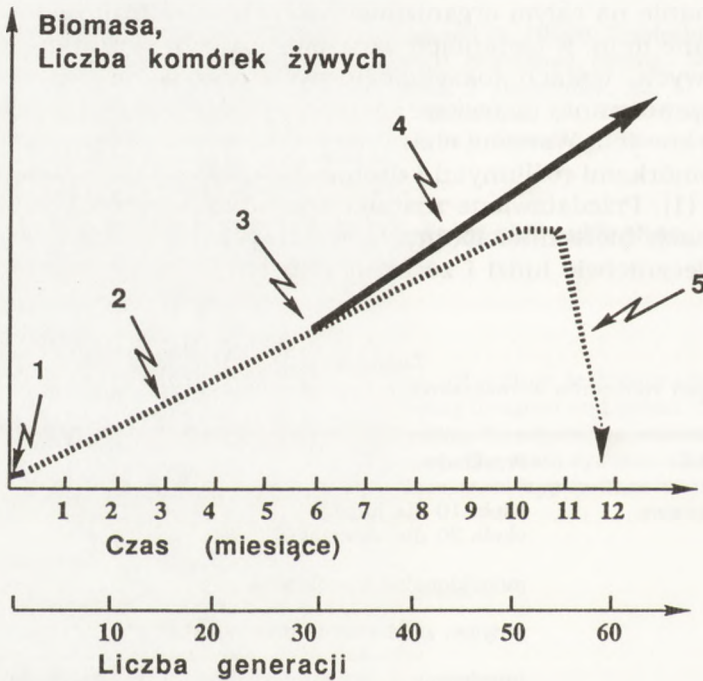
TABELA 1

PRZYKŁADY PRODUKTÓW WYTWARZANYCH W HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH *IN VITRO*

Grupy produktów	Przykłady
szczipionki wirusowe	około 10 dla ludzi około 30 dla zwierząt
przeciwciała	monoklonalne i poliklonalne
antygeny	antygen zgodności tkankowej, H2K
cytokiny	Interferony α , β i γ , interleukina 2, czynnik nekrozy nowotworów
hormony peptydowe	insulina, ludzki hormon wzrostu, erytropoietyna, gonadotropina
enzymy	białko C, czynnik VII i IX, tkankowy aktywator plazminogenu

1. Biologia komórek zwierzęcych *in vitro*

Możliwa jest hodowla *in vitro* bardzo wielu typów normalnych lub transformowanych komórek zwierzęcych, np. fibroblastowych, mięśni gładkich, nabłonkowych, szkieletowych oraz komórek nowotworowych różnych typów (2). W wielu hodowlach uzyskuje się namnażanie raczej komórek prekursorowych, gdyż komórki dojrzałe, w pełni wykształcone (zróżnicowane) najczęściej nie rozmnażają się (3). Do zainicjowania hodowli komórek zwierzęcych *in vitro* lepiej nadają się komórki zarodków, aniżeli organizmów dojrzałych, co wynika z braku lub niewielkiego poziomu specjalizacji komórek zarodkowych, obecności namnażających się komórek prekursorowych i komórek pnia (3). Szczególnie często wykorzystywane są zarodkowe linie fibroblastowe. Można je stosunkowo łatwo namnażać, jeżeli zachowa się małą ich gęstość, ok. 10^3 na 1 cm^2 . W praktyce technologicznej do hodowli *in vitro* używa się zarówno komórek normalnych, jak i biologicznie zmienionych, np. nowotworowych. Te ostatnie namnażają się znacznie łatwiej i są długowieczne; można



Rys. 1. Typy hodowli komórek zwierzęcych.

- 1 — hodowla pierwotna komórek diploidalnych
- 2 — hodowla(e) wtórna(e) komórek diploidalnych
- 3 — transformacja komórek
- 4 — ustalona (ciągła) linia komórek heteroploidalnych
- 5 — obumieranie hodowli wtórnej

odnawiać ich hodowlę *in vitro* przez dowolnie długi okres, a ponadto można je łatwo i tanio pasażować w organizmie odpowiedniego gospodarza.

Z biotechnologicznego punktu widzenia wyróżnia się trzy podstawowe typy hodowli komórkowych (4 – 7, rys. 1):

1. **Hodowle pierwotne** świeżo izolowanych normalnych komórek diploidalnych, które mogą być utrzymywane przez okres zaledwie kilku generacji, po czym następuje ich obumieranie.

2. **Hodowle wtórne** i linie komórek diploidalnych, określane również jako szczepy komórek diploidalnych, dające się utrzymać przez okres najwyżej do 40 – 70 generacji.

3. **Ustalone (ciągłe albo transformowane) linie komórek** heteroploidalnych, które otrzymuje się po okresie co najmniej 70 generacji — co daje gwarancję nieograniczonego pasażowania.

Liniami transformowanymi są m.in. hodowle **komórek nowotworowych** oraz **komórek mieszańcowych** (*hybrydoma*). Linie transformowane *in vitro* mają wiele cech wspólnych z komórkami nowotworowymi — transformowanymi *in vivo*. Obydwa typy komórek różnią się od normalnych komórek wyjściowych fizjologią oraz namnażają się ze zwiększoną szybkością, gdyż proces ten nie jest objęty mechanizmami regulacyjnymi istniejącymi w organizmie. Ważną technologicznie cechą wielu linii transformowanych, a w szczególności komórek nowotworowych jest zdolność do namnażania się w hodowli zawieszinowej, bez zakotwiczenia na powierzchni nośnika, czego wymagają normalne komórki diploidalne (adherentne). Te ostatnie, namnażając się, nie tworzą przestrzennego trójwymiarowego układu tkanki, lecz migrują na zewnątrz kolonii i zajmując coraz większą powierzchnię nośnika, tworzą jednolitą pojedynczą warstwę (tzw. monowarstwę).

Transformowane linie komórkowe charakteryzują się niezbyt ustabilizowanymi, odmiennymi niż w hodowli pierwotnej, właściwościami biologicznymi. W czasie wielokrotnego pasażowania *in vitro* komórki zwierzęce wykazują bowiem dużą zmienność (transformacje) w zakresie cech genetycznych, fizjologicznych i cytomorfologicznych (8), takich jak:

- zmiana liczby chromosomów (heteroploidalność);
- tendencja do nowotworzenia;
- utrata specyficznych markerów tkankowych;
- zmniejszenie wymiarów i bardziej zaokrąglony kształt;
- zmniejszenie adherencji i zwiększenie zdolności do namnażania w zawieszinie lub w układzie wielowarstwowym;
- zwiększenie szybkości namnażania (nawet dwukrotnie);
- redukcja zapotrzebowania na śladniki osocza krwi;
- zmiana zapotrzebowania na czynniki wzrostowe;
- zmieniona reakcja na czynniki regulatorowe;
- rozprężenie energetyczne przemian łańcucha oddechowego i zwiększone przyswajanie źródła węgla i energii, połączone zazwyczaj z akumulacją kwasu mlekowego w podłożu;
- zmiana efektywności syntezy pożądaných produktów.

Jeżeli w wyniku selekcji lub klonowania uzyskuje się linię komórkową wyróżniającą się stabilnym markerem, np. enzymem, opornością na antybiotyki, czy obecnością określonego antygeny, wówczas mamy do czynienia z **heteroploidalnym szczepem komórkowym**.

Dzięki manipulacjom genetycznym biotechnologia wzbogaciła się o dwa bardzo ważne typy linii transformowanych — **komórki mieszańcowe** *hybrydoma* — produkty fuzji komórek nowotworowych i somatycznych wytwarzających przeciwciała oraz **komórki transformowane DNA zrekombinowanym** *in vitro* (8). Znacznie rozszerzają one produkcyjne możliwości komórek zwierzęcych.

W praktyce laboratoryjnej i produkcyjnej wykorzystywane są zarówno nowo zakładane za każdym razem hodowle pierwotne, jak i różnego typu linie komórkowe. Zastosowanie hodowli pierwotnych, np. do klasycznej metody produkcji szczepionek przeciwwirusowych, wymaga użycia dużej liczby naczyń i jest technologicznie kłopotliwe. Dlatego też dąży się do pracy z ustalonymi liniami komórkowymi.

Do produkcji leków przeznaczonych dla ludzi, wykorzystywane były początkowo (w latach pięćdziesiątych) wyłącznie normalne komórki diploidalne w hodowlach pierwotnych (9). Przy dużej zmienności komórek w hodowli wtórnej oraz ciągłych liniach komórkowych, brano pod uwagę zagrożenie zajścia niekontrolowanych transformacji, np. typu nowotworowego. Ponadto większość ciągłych linii komórkowych została wyprowadzona z tkanek nowotworowych, a wiedza o mechanizmach transformacji nowotworowej była skąpa, natomiast obawy zbyt duże. Od tego czasu opracowano, dobrze scharakteryzowano i wprowadzono do praktyki laboratoryjnej i biotechnologicznej zarówno hodowle wtórne, jak i różnego typu transformowane linie komórkowe. Znacznie ułatwia to opracowywanie i prowadzenie procesów technologicznych oraz zapewnia ich wysoką produktywność i odtwarzalność. Wszystkie linie komórkowe objęte są ścisłą kontrolą ich właściwości biologicznych, a wytwarzane przy ich użyciu produkty są dokładnie wydzielane i oczyszczane. Pierwszymi procesami z wykorzystaniem takich linii były: wytwarzanie wirusowej szczepionki przeciw pryszczycy w hodowli komórek BHK 21 oraz produkcja interferonu γ (limfoblastowego) w hodowli linii Namalwa (9).

Hodowla komórek zwierzęcych wymaga użycia specjalnych podłoży (5 – 7, 10 – 12). Wiele z nich przygotowywanych jest z wykorzystaniem osocza krwi zwierzęcej; dąży się jednak do opracowania podłoży z możliwie najniższą zawartością osocza oraz podłoży „syntetycznych”, bez udziału tego składnika. W podłożach bez osocza można hodować normalne komórki diploidalne różnych typów, linie transformowane, a także komórki mieszańcowe *hybrydoma* (13). Podłoża syntetyczne są bardziej selektywne, przeznaczone dla określonych typów linii komórkowych i procesów technologicznych. W wyniku optymalizacji ich składu można uzyskać wyższą wydajność pożądanego produktu. Podłoża takie mogą znacznie różnić się od podłoży optymalnych dla namnażania komórek. Z hodowli w podłożu syntetycznym łatwiej jest wyizolować czysty produkt, jednakże często komórki w takim podłożu rosną wolniej,

a ponadto, zastąpienie osocza szeregiem niezbędnych składników może znacznie podrażać koszty produkcji.

Produktywność hodowli komórkowych zależy w pierwszym rzędzie od genotypu i potencjału metabolicznego komórek, jednakże w procesie technologicznym istnieje szereg ograniczeń w wykorzystaniu tego potencjału. Należy do nich ograniczona ilość biomasy możliwa do uzyskania w hodowli.

Zainicjowanie hodowli komórek zwierzęcych wymaga odpowiedniej ich gęstości; dla hodowli na nośnikach stosuje się 10^4 kom./ cm^2 , natomiast w hodowli zawieszinowej 10^5 kom./ml. Końcowe namnożenie komórek zakotwiczonych na nośnikach osiąga 10^5 kom./ cm^2 oraz $1 - 3 \cdot 10^6$ /ml w hodowli zawieszinowej. W specjalnych układach sprzyjających dużemu zagęszczeniu komórek można uzyskać namnożenie $10^7 - 10^8$ /ml, a nawet ponad 10^8 /ml (tab. 2). W tkankach zwierzęcych najwyższe zagęszczenie komórek osiąga $1 - 2 \cdot 10^9$ /ml (14, 15). W warunkach *in vitro* jest to poziom praktycznie nieosiągalny. Teoretycznie, komórki sferyczne o wymiarze 12 μm mogą być upakowane do gęstości $5 \cdot 10^8$ /ml (14).

Komórki zwierzęce w hodowli *in vitro* mają wymiary w granicach 5 - 50 μm (najczęściej 10 - 20 μm) oraz okres generacji 10 - 60 godzin (najczęściej 15 - 20 godzin). Przy wyprowadzeniu hodowli z pojedynczej komórki, otrzymanie 1 l hodowli zawieszinowej o namnożeniu 10^6 kom./ml wymaga około 30 generacji, a uzyskanie 1000 l hodowli (do 1 kg wilgotnej biomasy) — około 40 generacji. Dla komórek o średnim okresie generacji 20 godzin daje to odpowiednio 25 oraz 33 doby hodowli (15).

TABELA 2

PRZYKŁADY NAMNOŻENIA KOMÓREK ZWIERZĘCYCH W RÓŻNYCH URZĄDZENIACH DO ICH HODOWLI

Typ hodowli i urządzenia	Powierzchnia cm^2/ml	Liczba komórek/ml
Hodowla komórek adherentnych:		
butelki obrotowe	0,3 - 1	$0,2 - 1 \times 10^6$
zbiorniki z wkładem spiralnym	4 - 10	1×10^6
upakowane złożo kulek, $\phi = 3 \text{ mm}$	10 - 17	$2 - 3 \times 10^6$
wydrążone włókna	25 - 40	$10^7 - 10^8$
hodowla na mikronośnikach	95 - 150	$3 - 10 \times 10^6$
Hodowla zawieszinowa (klasyczna)		$1 - 3 \times 10^6$
Układ perfuzyjny:		
filtr obrotowy w bioreaktorze		7×10^6
bioreaktor membranowy		5×10^7
komórki w kapsułkach lub mikrosferach		$5 - 10 \times 10^7$
komórki pomiędzy wydrążonymi włóknami		$> 1 \times 10^8$

2. Warunki techniczne hodowli komórek zwierzęcych *in vitro*

Ogólnie można przyjąć, że istnieją cztery sposoby hodowli komórek zwierzęcych *in vitro*:

1) namnażanie komórek zakotwiczonych na powierzchni ścianek lub innych elementów naczynia hodowlanego;

2) hodowla w zawieszynie;

3) sposób mieszany — hodowla komórek na mikronośnikach, w kuleczkach żelowych, mikrokapsułkach, względnie w porowatych mikrosferach zawieszonych w pożywce;

4) hodowla komórek upakowanych pomiędzy półprzepuszczalnymi membranami (płaskimi lub rurkowymi), względnie w specjalnych matrycach ceramicznych.

Intensywne prace nad doskonaleniem techniki hodowli komórek adherentnych oraz w zawieszynie doprowadziły do opracowania licznych modyfikacji systemów klasycznych, umożliwiając zwiększenie zagęszczenia komórek i uzyskanie wyższej produktywności z jednostki objętości bioreaktora (16 – 20). Interesujące rozwiązania uzyskano przez połączenie dwóch technik: immobilizacji komórek i doprowadzania do hodowli świeżej pożywki przy równoczesnym odprowadzaniu produktów metabolizmu w układzie *perfusion*.

Komórki wymagające zakotwiczenia immobilizuje się na ściankach i elementach naczyń hodowlanych lub na mikronośnikach zawieszonych w pożywce. Jako mikronośniki stosuje się najczęściej modyfikowane polimery naturalne — np. dekstran lub żelatynę oraz syntetyczne — np. odpowiednio spreparowany, zwilżalny i naładowany ujemnie polistyren, a także plastik opłaszczony żelatyną, kolagenem lub polilizyną dla uzyskania dodatniego ładunku (16, 17). Ponieważ komórki mają na swojej powierzchni ładunki dodatnie i ujemne, zatem stabilna adhezja komórek jest możliwa przy obydwu typach ładunku na powierzchni nośnika.

Inny system hodowli polega na zamknięciu komórek wewnątrz żelowych kuleczek alginianowych, w mikrokapsułkach polilizynowych lub w mikrosferach kolagenowych. Zagęszczenie komórek w półprzepuszczalnych porowatych mikrosferach o średnicy około 500 μm , mających pory i kanały o wielkości 20 – 40 μm , osiąga $1 - 5 \cdot 10^8$ w 1 ml ich przestrzeni wewnętrznej, a w przeliczeniu na całkowitą objętość hodowli $5 - 10 \cdot 10^7$. Dobre wyniki w tym zakresie pozwala uzyskać hodowla komórek w przestrzeniach pomiędzy wiązką wydrążonych włókien (16), pomiędzy płaskimi membranami (21) oraz w matrycach ceramicznych (22). Swojego rodzaju immobilizacją jest również hodowla zawieszinowa w bioreaktorach wyposażonych w zewnętrzny system membranowy (18), pozwalający na zawrzenie komórek do bioreaktora po oddzieleniu roztworu. Mogą to być zarówno membrany płaskie (21), jak i rurkowe typu *hollow-fiber* (23).

Analizę porównawczą hodowli komórkowych różnych typów Czytelnik znajdzie w pracach (14, 16, 18, 20, 24). Poniżej omówimy dwa z trzech podstawowych w biotechnologii systemów hodowli: a) hodowlę komórek wymagają-

cych mechanicznego nośnika oraz b) układ typu *perfusion* z wydrążonymi włóknami, wyróżniający się maksymalnym zagęszczeniem komórek. Obydwa systemy stwarzają istotne ograniczenia w zakresie powiększania skali procesu jednostkowego. Zwiększanie skali produkcji polega na powiększeniu liczby urządzeń. Wady tej nie ma trzeci z podstawowych systemów, obejmujący bioreaktory do hodowli zawieszinowej, który będzie omówiony oddzielnie.

3. Hodowla komórek zakotwiczonych na powierzchni nośnika

Zależnie od przeznaczenia hodowli, komórki wymagające zakotwiczenia można namnażać w urządzeniach różnego typu i wielkości; mogą to być:

- 1) specjalne płytki (np. serologiczne) ze studzienkami o wielkości od kilku do kilkuset μl i powierzchni 1 – 30 mm^2 ;
- 2) płytki Petriego, kolby, butelki Roux (pow. 5 – 200 cm^2);
- 3) specjalne butelki obrotowe (pow. 600 – 1600 cm^2);
- 4) urządzenia z elementami wewnętrznymi, zwiększającymi powierzchnię hodowlaną;
- 5) bioreaktory do hodowli na mikronośnikach.

Klasycznym laboratoryjnym i produkcyjnym sposobem prowadzenia hodowli komórek zwierzęcych jest namnażanie ich na wewnętrznych ściankach plastikowych lub szklanych butelek, wypełnionych w 15 – 20% pożywką. Butelki są umieszczane w pozycji poziomej na rolkach i obracane z szybkością 2 – 10 obr./min. Ich powierzchnia wewnętrzna zasiedlana przez komórki, wynosi kilkaset do tysiąca kilkuset cm^2 (3, 15). Powiększanie skali procesu polega na zwiększaniu liczby butelek. Proces w butelkach można znacznie intensyfikować wymieniając w nich pożywkę.

Opracowano cylindryczne zbiorniki do hodowli komórek, zawierające wewnętrzne elementy o dużej powierzchni roboczej (3, 15). Wnętrze zbiornika hodowlanego może być wypełnione również materiałem ceramicznym (3, 15, 26) z kanalikami o średnicy około 1 mm, co również daje dużą powierzchnię i przestrzeń hodowlaną. Produktem handlowym tego typu jest wypełnienie „Opticell” (22). Uwalnianie komórek z takich układów wymaga użycia enzymów litycznych; najczęściej stosuje się trypsynę w połączeniu z EDTA.

Do hodowli „pseudozawieszinowej” komórek wymagających zakotwiczenia opracowano specjalne mikronośniki (17, 27, tab. 3) o średnicy 100 – 200 μm i gęstości 1,03 – 1,05 g/cm^3 , co jest ważne dla utrzymania ich w zawieszynie. Najczęściej stosowane są mikrokuleczki z modyfikowanego dekstranu (Cytodex firmy Pharmacia, Szwecja; Dormacell — Pfeifer und Langen, Niemcy). Dostępne są również mikronośniki poliakryloamidowe (Biocarier — Bio Rad, USA), polistyrenowe (Cytospheres — Lux, USA; Biosilon — Nunc, Dania), celulozowe (DE — Whatman, W.B.). Stosując 1 – 5 g mikronośnika dekstranowego w 1 litrze podłoża, otrzymuje się 1 – 5 m^2 powierzchni hodowlanej oraz końcowe namnożenie komórek na poziomie 1 – 5 $\cdot 10^6$ w 1 ml. Nowym rozwiązaniem są plastikowe kuleczki (Solohill Engineering, USA) o gęstości

1,02 – 1,04 g/cm³. Mogą być one opłaszczone trwałą warstwą, np. kolagenową, wówczas uzyskują ładunek elektrostatyczny na swojej powierzchni. Proponowane są również kolagenowe mikronośniki makroporowate (Verax Corp., USA), dzięki czemu komórki zasiedlają nie tylko powierzchnię, ale również przestrzeń wewnętrzną. Mikrosfery tego typu mają gęstość 1,6 – 1,7 g/cm³ i są stosowane do procesów w bioreaktorach ze złożem fluidalnym (28, 29).

TABELA 3
MIKRONOŚNIKI DO HODOWLI KOMÓREK ZWIERZĘCYCH (WG 17)

Nośnik (Producent)	Struktura chemiczna	Grupa czynna, ładunek, powierzchnia	Wymiary (μm)
Biocarrier (Bio-Rad, USA)	poliakryloamid	dimetylo-aminopropyl	120 – 180
Bioglas (Solohill Eng., USA)	plastik	płatcz szklany	90 – 212
Bioplas (Solohill Eng., USA)	polistyren	(płatcz kolagenowy)	90 – 212
Biosilon (Nunc., Dania)	polistyren	ładunek ujemny	160 – 300
DE-52/53 (Whatman, Anglia)	celuloza mikrogranulowana	DEAE	40 – 50 x 80 – 400
Cytodex 1	dekstran	DEAE	131 – 220
Cytodex 2	dekstran	Trimetylo-2-hydroxyaminopropyl	114 – 198
Cytodex 3 (Pharmacia, Szwecja)	dekstran	płatcz kolagenowy	133 – 215
Cytospheres (Lux, USA)	polistyren	ładunek ujemny	160 – 150
Dormacel Pfeifer and Langen, Niemcy	dekstran	dimer DEAE	140 – 240
Gelibeads (KC Biological, USA)	żelatyna	sieciowana żelatyna	115 – 234
Microdex (Dextran Products, Kanada)	dekstran	DEAE	150
Superbeads (Flow Labs, USA)	dekstran	DEAE	135 – 205
Ventregel (Ventrex, USA)	żelatyna	sieciowana żelatyna	150 – 250

4. Hodowla w urządzeniach z wydrążonymi włóknami

Szeroko rozwijane są badania w zakresie hodowli komórek zwierzęcych w innym heterogenicznym układzie, w którym przestrzeń hodowlana jest wypełniona wiązką mikroporowatych, pustych wewnątrz (wydrążonych) włókien o średnicy wewnętrznej rzędu 200 – 350 μm , grubości ścianek ponad 50 – 75 μm i porach rzędu kilku μm (30). Rozwiązanie to zapewnia maksymalne rozwinięcie powierzchni zasiedlanej przez komórki namnażające się na zewnętrznej powierzchni włókien, w przestrzeni pomiędzy włóknami i ewentualnie wewnątrz kieszeni makroporowatych w strukturze włókien. Stosowano włókna o różnej porowatości, wykonane z polipropylenu, kopolimerów polisulfonowych lub akrylowych, octanu celulozy, kopolimeru octanu celulozy i azotanu celulozy. W niektórych rozwiązaniach stosowano powlekanie włókien polilizyną. Opracowano różne warianty wprowadzania pożywki i fazy gazowej, łącznie lub oddzielnie. Pory we włóknach umożliwiają przechodzenie przez nie cząsteczek o masie kilkudziesięciu tysięcy daltonów, co pozwala na prowadzenie procesów typu perfuzyjnego (30, 31).

W wielu układach tego typu występuje szereg trudności wynikających z oporów dyfuzyjnych i tworzenia się gradientu stężenia substratów i produktów, powstawania zróżnicowanych mikrośrodków oraz miejsc niedotlenienia w miarę wzrostu gęstości biomasy. Konstrukcja bioreaktorów z wiązkami włókien nie sprzyja standaryzacji, kontroli, regulacji, automatyzacji procesów i powiększaniu ich skali. Wydaje się, że problemy te rozwiązano (przynajmniej w pewnym stopniu) w bioreaktorach ACUSYST z wiązką mikroporowatych włókien opracowanych przez firmę Endotronics Inc., USA (32). System składa się z dwóch niezależnych sekcji; każda z nich może zawierać do 6 jednostek — indywidualnych układów z wiązkami włókien. Każda jednostka składa się z tysięcy gęsto upakowanych pojedynczych wydrążonych włókien o średnicy zewnętrznej 256 μm , wewnętrznej 200 μm oraz porach przepuszczalnych dla cząsteczek o masie rzędu 6000 daltonów. Całkowita powierzchnia włókien w 1 jednostce wynosi 1,4 m^2 . Tworzą one układ kapilar o bardzo dużej powierzchni, ponad 100 cm^2 na 1 ml przestrzeni międzykapilarnej. Układ ten, przez który przepływa pożywka, symuluje system dystrybucji składników odżywczych i tlenu (krwiobieg) oraz usuwania produktów metabolizmu w żywym organizmie. Komórki zasiedlające przestrzeń pomiędzy włóknami namnażają się do gęstości 10^8 kom./ml, tworząc „pseudotkanę”. W układzie mierzone i regulowane są następujące parametry: pH, natlenienie, temperatura, zużycie glukozy i tlenu, uzupełnianie świeżą pożywką o optymalizowanym składzie. W sposób ciągły odbierane są produkty metabolizmu. Hodowla może być utrzymywana przez wiele tygodni w fazie stacjonarnej (fazie produkcji) z zachowaniem wysokiej aktywności produkcyjnej.

W całym urządzeniu można uzyskać namnożenie biomasy na poziomie $1 - 2 \cdot 10^{10}$ lub $4,8 \cdot 10^{11}$ komórek, zależnie od modelu (ACUSYST-Jr lub ACUSYST-P). Odpowiada to ilości komórek w klasycznej hodowli zawieszinowej o objętości — odpowiednio: 100 – 500 litrów i 500 – 1000 litrów. System ten

jest wyposażony w aparaturę kontrolną i sterowany komputerem. Wewnątrz bioreaktorów symulowane są warunki podobne do istniejących *in vivo* w organizmach żywych. W odróżnieniu od innych układów typu *hollow-fiber* bioreaktory ACUSYST wyróżniają się dwoma przeciwnymi obiegami pożywki (w przeciwnych kierunkach) przy regulowanym nadciśnieniu, co zapewnia stabilną pracę układu i dobre przemywanie „pseudotkanki”. Zaletą jest również wysoki stopień kontroli procesu sterowanego komputerowo.

Opisany system może być stosowany zarówno do procesów z użyciem komórek adherentnych, jak i nie wymagających nośnika. Przykładem pierwszych jest m.in. produkcja przeciwciał monoklonalnych w hodowli komórek *hybrydoma*, drugich — wytwarzanie polipeptydowego antygeny wirusa zapalenia wątroby typu B w hodowli zrekombinowanych komórek mysich (32).

Literatura

1. Chmiel A., (1992), *Biotechnologia* PI, 4/92.
2. European Collection of Animal Cultures, Catalogue, 3rd edition, (1988), PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, UK.
3. Freshney R. I., (1986), *Animal Cell Culture*, ed. Freshney R.I., 1-11, IRL Press, Oxford.
4. Hayflick L., Moorhead P.S., (1961), *Exp. Cell Res.*, 27, 585 – 621.
5. Katinger H.W.D., Scheirer W., (1982), *Acta Biotechnologica*, 1, 3 – 41.
6. Harakas N.K., (1984), *Annual Reports on Fermentation Processes*, 5, 159 – 211.
7. Propst C.L., von Wedel R.J., Lubiniecki A.S., (1989), *Fermentation Process Development of Industrial Organisms*, ed. J.O. Nevey, 221 – 276, Marcel Dekker Inc., New York.
8. Leist C.H., Meyer H.-P., Fiechter A., (1990), *J. Biotechnol.*, 15, 1 – 46.
9. Finter N.B., Garland J.M., Telling R.C., (1990), *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, 1 – 14, Marcel Dekker Inc., New York.
10. Jayme, D.W., Blackman K.E., (1985), *Advances in Biotechnological Processes*, 5, 1 – 30.
11. Williams J., (1988), *Biotechnology*, 6, 575 – 581.
12. Maurer H.M., (1986), *Animal Cell Culture*, ed. Freshney R.I., 13-31., IRL Press, Oxford.
13. Guk S., (1991), *BioTec*, 3, 6 – 11
14. Griffiths B., (1986), *Animal Cell Culture*, ed. Freshney R.I., 33 – 68, IRL Press, Oxford.
15. Griffiths B., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 179 – 220, Academic Press, London.
16. Adamson S.R., Schmidli B., (1986), *The Can. J. Chem. Engin.*, 64, 531 – 539.
17. Reuveny S., (1990), *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, 271 – 342, Marcel Dekker Inc., New York.
18. Merten O.-W., (1987), *Tibtech*, 5, 230-237.
19. Scheirer W., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 263 – 281, Academic Press, London.
20. Kearns J. M., (1990), *Biotechnology*, 8, 409-413.
21. Klement G., Scheirer W., Katinger H.W.D., (1987), *Develop. Biol. Standard*, 66, 221-226.
22. Lydersen B.K., Pugh G.G., Paris M.S., Sharma B.P., Noll L.A., (1985), *Bio/Technology*, 4, 63 – 67.
23. Pinton H., Rabaud J.N., Engasser J.M., Marc A., (1991), *BFE*, 8, 344 – 347.
24. Handa-Corrigan A., (1988), *Bio/Technology*, 6, 784-786.
25. Katinger H., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 340 – 350, Academic Press, London.
26. Berg G.J., Bodeker B. G. D., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 321-335, Academic Press, London.

27. Butler M., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 283 – 303, Academic Press, London.
28. Verax Corporation, (1986), *Continuous Cell Culture with Fluidized Sponge Beads for Large-scale Production of Medical Proteins*. Verax TM-184A, Lebanon, NH 03766, USA.
29. Runstadler P.W., Jr, Cernek S.R., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 305 – 320, Academic Press, London.
30. Tolbert R. Srigley W.R., Prior C.P., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 373 – 393, Academic Press, London.
31. Schonherr O.T., van Gelder P.T.J.A., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 338 – 355, Academic Press, London.
32. Tyo M.A., Bulbulian B.J., Menken B. Z., Murphy T., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, ed. Spier R.E., Griffiths J.B., 357 – 371, Academic Press, London.

Animal cell biotechnology. Cell culture *in vitro*

Summary

Biology of animal cell *in vitro* is discussed. Technical conditions for animal cell cultivation are presented. Special attention to two culture systems is given: one is the use of microcarriers for anchorage-dependent cells cultivation, the other concerns the ACUSYST (*hollow-fiber*) technology.

Key words:

anchorage-dependent, cell culture, hollow-fiber.

Adres dla korespondencji:

Aleksander Chmiel, Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych, Akademia Medyczna w Łodzi, ul Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.