

عوامل کلیدی در کشت سه بعدی سلول‌های هیبریدوما و تولید آنتی‌بادی تک دودمانه: زمان، داربست‌های زیستی و بیوراکتورها

سجاد داودی‌مهد^۱، علیرضا جلالی^۱، جمیل زرگان^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۶۹۸۷۱۵۴۶۱، تهران، ایران

zargan44@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۳۰

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۷

چکیده

کشت سه بعدی کاربردهای بسیاری دارد که به اختصار می‌توان به پژوهش در حوزه سرطان، آنالیزهای سمیت، بررسی و توسعه محصولات نظیر واکسن، یا تولید آنتی‌بادی تک دودمانه و پروتئین‌های نو ترکیب اشاره کرد. یکی از روش‌های کارآمد در تولید آنتی‌بادی تک دودمانه، فناوری سلول‌های هیبریدوما است که در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است. آنتی‌بادی‌های تک دودمانه به دلیل اختصاصیت بالا، کاربردهای متنوعی از جمله در کیت‌های تشخیص بیماری و درمان سرطان دارند. بیوراکتورها با تأمین شرایط کنترل شده برای کشت سه بعدی سلول‌های هیبریدوما نظیر گازهای محلول، pH و مواد مغذی می‌تواند به ارتقای بازدهی تولید آنتی‌بادی تک دودمانه کمک کند. همچنین، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که بهره‌گیری از داربست‌های زیستی و بیوراکتورها، می‌تواند به ایجاد مدل‌های کارآمدتر برای تحقیقات دارویی و پزشکی منجر شود. استفاده از رویکردهای طولانی‌تر کشت سلول، می‌تواند منجر به تولید مقادیر بیشتر آنتی‌بادی شود، حتی اگر شیب تولید ملایم‌تری نسبت به روش‌های سریع‌تر داشته باشد. بنابراین، با صرف نظر از سایر عوامل موثر، "زمان" مهمترین عاملی است که باید با توجه به آن، رویکرد مناسب را برای کشت سلول‌های هیبریدوما و تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانه اتخاذ کرد.

کلید واژگان: کشت سه بعدی سلول، آنتی‌بادی تک دودمانه، داربست زیستی، سلول هیبریدوما

۱- مقدمه

در این مقاله، به معرفی داربست‌های زیستی که در کشت سلول‌های هیبریدوما به کار رفته‌اند خواهیم پرداخت. کشت سلول به روش سه بعدی و بر پایه داربست، با مفهوم بیوراکتور (شکل ۲) به عنوان سامانه‌ای بزرگتر و سه بعدی، گره خورده است که شرایط کشت سلول را مبتنی بر داربست زیستی فراهم می‌کند. بنابراین، در این مطالعه، چند نمونه از بیوراکتورهای طراحی شده که در مقالات با موفقیت استفاده شده‌اند، نیز بررسی شده‌اند.

به طور کلی عملکرد بیوراکتورها، با آنچه در دیگر روش‌های کشت سلول رقم می‌خورد متفاوت است. حتی دیگر روش‌های کشت سه بعدی سلول‌های هیبریدوما و یا روش‌هایی که اغلب با هدف ایمپلنت بافتی، از داربست‌های زیستی برای وارد کردن سلول‌های مختلف به شرایط *in-vivo* استفاده می‌کنند، با این روش متمایز هستند.

مقالاتی از دهه ۷۰ میلادی در رابطه با سلول‌های هیبریدوما منتشر شده‌اند که به نوعی می‌توان آنها را مقالات اصیل یا اولیه‌ی این موضوع دانست. اگرچه مرسوم است که مقالات قدیمی‌تر به تدریج کنار گذاشته شوند و نویسندگان، در صدد استفاده‌ی بیشتر از مقالات جدیدتر باشند، اما در سیر مطالعاتی دریافتیم کنار گذاشتن مقالات قدیمی‌تر، در این مقاله که با هدف نگاهی بر موضوعات یاد شده در عنوان نگاشته شده است، بسیاری نکات مهم و کاربردی را از پیش چشم دور نگاه می‌داشت. علیرغم این انتظار که در کتاب‌های مرجع، چنین نکاتی باید به تفصیل آورده شوند، اما همچنان نیاز به بررسی این مقالات لازم و ضروری به نظر می‌رسید.

داربست‌های زیستی مجموعه‌ای از مواد موجود در ساختار خارج سلولی [۱] یا موادی هستند که به تقلید از آنها سنتز شده‌اند [۲]. این داربست‌ها نقش‌های مختلف فیزیولوژیکی را ایفا می‌کنند.

به طور کلی، نقش‌های داربست‌های زیستی را می‌توان در

چند جنبه دسته‌بندی کرد [۳]:

۱. تقویت کارایی ترانسسانی سلولی: داربست‌ها می‌توانند کارایی ترانسسانی سلولی را تقویت کنند.

۲. صحت ترانسسانی پیام: آنها راهی مطمئن برای اطمینان از صحت ترانسسانی پیام فراهم می‌کنند.

۳. افزایش حساسیت ترانسسانی: داربست‌ها می‌توانند حساسیت ترانسسانی را افزایش دهند، به این معنی که پیام‌های مخابره شده حتی در فواصل دورتر از سلول یا ناحیه مبدأ، با کیفیت بهتری به سلول یا ناحیه مقصد می‌رسند.

۴. هماهنگی مسیرهای ترانسانش پیام: این پروتئین‌ها با تشکیل مجموعه‌هایی به نام *signalosome* یا *transducisome*، نقش‌های مختلفی را ایفا می‌کنند. به طور کلی، داربست‌های زیستی نقش مهمی در فرایندهای سلولی و ترانسسانی پیام دارند.

رشد سلول‌ها در شرایط مصنوعی و تحت کنترل، و متمایز از شرایط طبیعی به عنوان کشت سلول تعریف می‌شود [۴]. از کاربردهای وسیع آن می‌توان به مطالعه در حوزه‌ی زیست شناسی سلولی و مولکولی، سنجش داروها و آنالیزهای سمیت، ردگیری نقش ژنی خاص در یک بیماری و پژوهش در حوزه سرطان اشاره کرد. همچنین، با توجه به فرصت‌های منحصر به فردی که کشت سلول برای محققان فراهم می‌آورد، در بررسی و توسعه محصولات نظیر واکسن‌ها و پروتئین‌های نو ترکیب نیز کاربرد دارد [۵ و ۶]. فرایند توسعه داروها زمانبر است و نیازمند مراحل متعددی مانند شناسایی هدف، انتخاب کاندیدهای مناسب، آزمایش‌های پیش‌درمانی و سنجش‌های درمانی است؛ کشت سلول می‌تواند در این فرایندها نقش مهمی ایفا کند [۶ و ۷].

این مسئله بسیار حائز اهمیت است که پژوهشگر نسبت به فعل و انفعالات زیستی، سازوکارهای بیوشیمیایی، سمیت و نتایج غیر منتظره اشراف پیدا کند. رویکردهای سلولی در

شرایط آزمایشگاهی (*in-vitro*) کمک شایان ذکری به درک تاثیرات دارویی بر سلول‌ها عرضه داشته که این خود، احتمال توسعه داروهایی با کارایی و ضریب سلامت مطلوب را فراهم کرده است [۶ و ۷]. از محاسن اصلی کشت سلول اصولی، تحصیل داده‌های همگون و تکرار پذیر می باشد [۷ و ۵].

در دهه‌های گذشته، کشت سلول دو بعدی (2D)، به عنوان رویکردی کم هزینه، رایج و در دسترس برای نظارت بر اثر دارو بر سلول اصلی ترین رویکرد کشت سلول در زمینه‌های متعدد بوده است. اگرچه نیاز به شبیه سازی و قرابت به شرایط *in-vivo*، کاربرد آن را با محدودیت مواجه می سازد [۹ و ۸]. در این رویکرد، سلول‌های زنده و زایا به صورت تک لایه‌ای بر یک محیط کشت مسطح، نظیر فلاسک‌های شیشه‌ای یا پلی استیرنی رشد می کنند و سلول‌های مرده از سطح جدا می شوند [۱۰]. در نتیجه، با یکپارچه شدن توزیع مواد مغذی و عوامل رشد در محیط کشت، سلول‌ها دسترسی و نرخ تقسیم بیشتری نسبت به شرایط *in-vivo* خواهند داشت (دست کم برای بازه‌های ابتدایی کشت که نسبت مواد مغذی و فضای در دسترس، بیش از شرایط معمول است). اما ریخت شناسی سلول‌ها با آنچه در شرایط *in-vivo* مشاهده می کنیم کاملاً متفاوت است و با پهنا و کشیدگی بیشتر ظاهر می شود [۴]. اما کمی بعد، گام‌های شاخصی به سوی اجرای کشت سلول سه بعدی (3D) در پژوهش‌های زیست پزشکی و توسعه دارویی، متناظر با صحت و کارایی آن در نمونه‌های آزمایشگاهی برداشته شد. رویکردی که به دلیل شبیه سازی شرایط *in-vivo*، به وفور برای درک شکل سلول، میانکنش‌های بین سلولی و محیط اطراف آنها استفاده شده است [۱۰]. سلول‌ها در چنین شرایطی به صورت دسته‌ها یا خوشه‌هایی موسوم به اسفروئید^۱، با استفاده از داربست یا بدون آن رشد می کنند [۴]. بنابر آنچه ذکر شد، پژوهشگران قادر هستند با

استفاده از ویژگی‌های منحصر به فرد داربست‌ها، برای بهبود کارایی کشت سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی (*in-vitro*) و به شکل سه بعدی (3D) بهره ببرند. کشت‌های سه بعدی بر پایه داربست، یا از طریق رونشاندن سلول‌ها بر روی یک داربست عاری از سلول و یا پخش سلول‌ها در یک داربست مایع انجام می شود که سپس، قوام بخشی و پلیمریزاسیون پیش ماده (ها)ی داربست را در پی خواهد داشت [۱۱]. اینکه ممکن است مراحل پلیمریزاسیون با رونشاندن سلول‌ها همزمان باشد و یا بعد از آن اتفاق بیفتد، در ادامه خواهد آمد. معمول ترین داربست‌ها، یا منشا زیستی دارند و یا سنتزی هستند [۱۲]؛ که برای استفاده در کشت سلول سه بعدی، باید شاخصه‌هایی مانند، عدم تحریک ایمنی (در درمان مبتنی بر ایمپلنت مطرح می شود)، عدم سمیت برای سلول‌ها (این مسئله در درمان‌های مبتنی بر ایمپلنت، بیشتر مورد بحث قرار می گیرد) و به طور کلی، خواص فیزیکی-شیمیایی مناسب داشته باشند [۱۱]. همانطور که در ابتدای مقاله نیز اشاره شد، استفاده از داربست‌ها در کشت سلول‌های هیبریدوما، مسیر پژوهش را به سمت طراحی و راه اندازی بیوراکتورها و یا سامانه‌های سه بعدی سوق می دهد. در زیر، خلاصه‌ای از برخی نواقص سامانه‌های کشت 3D آمده است [۱۳].

سامانه‌های حاضر به جای الگوبرداری از پویایی بیوشیمیایی حاکم در بافت‌ها، شرایطی ایستا فراهم می کنند. این روش‌ها با چالش‌هایی همچون، خطر انتقال آلودگی/بیماری از مواد مشتق از انسان یا حیوان برای آماده سازی داربست، نبود روشی جامع در کشت سلول بر پایه داربست (به ویژه با وجود تفاوت رویکردها بسته به انواع سلول) و یا نیاز به دستورالعملی برای جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها از محیط کشت 3D سلول‌ها همراه هستند. (در ادامه خواهد آمد که برخی داربست‌ها، آنتی بادی‌های تک دودمانه را درون خود محبوس می کنند)، همچنین، برخی داربست‌ها ممکن است

^۱ Spheroids

برای میانکنش با سلول‌ها چندان مناسب نباشند، از جمله داربست‌های سنتزی مانند PEG-basedها، که به‌طور طبیعی بی‌اثر (inert) هستند و برای فراهم کردن شرایط مطلوب رشد سلول‌ها، نیازمند مدیفیکیشن پیش از افزودن سلول‌ها هستند. بنابراین، به‌دلیل وجود میانکنش‌های حائز اهمیت بین داروها/مولکول‌ها و مواد مختلف برای آماده‌سازی داربست‌ها، به بررسی بیشتری در سامانه‌های کشت 3D بر پایه داربست نیاز است.

سلول‌های هیبریدوما از ادغام سلول‌های میلوما (مانند Sp2/0-Ag14) با سلول‌های طحال از حیوان ایمن شده (مانند موش) نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر حاصل می‌شوند که معمولاً با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (fusion agent) انجام می‌شود [۱۴]. سپس، سلول‌های هیبریدوما حاصل را می‌توان با استفاده از روش‌هایی مانند الایزا برای غربالگری کلون‌های مولد آنتی‌بادی اختصاصی، گزینش کرد [۱۵]. از خصوصیات این سلول‌ها می‌توان به ظرفیت تقسیم سلولی و ترشح آنتی‌بادی اشاره کرد که از این جهت، درجات گوناگونی دارند و اغلب در شرایط *in-vitro* کشت می‌شوند [۱۴]. بکار بردن روش‌های پیشرفته‌ای مانند، غربالگری آنتی‌بادی تک دودمانه بر روی سلول^۱ (OCMS™) امکان سنجش سریع و مستقیم میزان اتصال اختصاصی آنتی‌بادی و شدت بیان آن را از روی سلول هیبریدوما فراهم می‌کند [۱۶]. سلول‌های هیبریدوما با هدف تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانه برای کاربردهای گوناگونی نظیر کیت‌های تشخیص بیماری، استفاده می‌شوند [۱۷]. همچنین، در زمینه‌ی توسعه‌ی درمانی، برای تهیه‌ی آنتی‌بادی‌هایی با اختصاصیت و پایداری بالا، نقش ایفا می‌کنند [۱۸]. آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط سلول‌های هیبریدوما، اختصاصیت و عملکرد طبیعی که در پاسخ‌های ایمنی از خود نشان می‌دهند، حفظ می‌کنند که این موضوع، آنها را در حوزه‌های گوناگون، بسیار کارآمد می‌سازد [۱۹].

فناوری هیبریدوما علیرغم ظهور روش‌های جایگزین، به‌دلیل توان تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی همچنان پرکاربرد است [۱۹]. پیشرفت‌های اخیر، امکان استفاده از سلول‌های هیبریدوما برای مورد هدف قرار دادن چندین آنتی‌ژن را فراهم کرده است و کاربرد آنها در تحقیقات و درمان سرطان را ارتقا بخشیده است [۲۰].

در این مقاله تلاش شده است مهمترین داربست‌هایی که در کشت موفقیت‌آمیز سلول‌های هیبریدوما بکار رفته‌اند، معرفی شود. همچنین، به توضیح پارامترهای زمان و بیوراکتورها در راستای معرفی این داربست‌ها پرداخته خواهد شد.

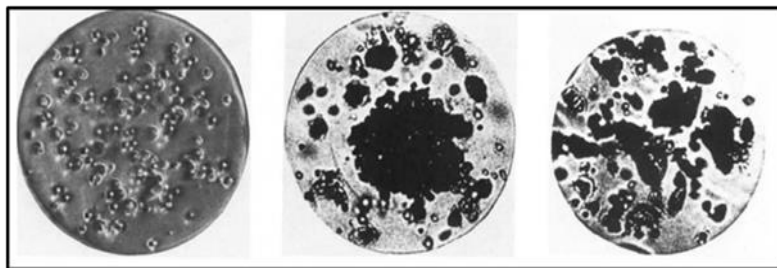
۲- مهم‌ترین داربست‌ها برای کشت هیبریدوما

۱. میکروبیدهای آگارز
۲. ذرات سخت شده‌ی آلزینات
۳. کیتوزان + گلوکوزامین β -1,4 آلزینات (غشا-پلیمر زیستی)
۴. اسفنج‌های پلی‌اورتان (PU)
۵. داربست پلی‌اتیلن ترفتالات (PET) فیروز شده
۶. سل-ژل سیلیکا
۷. پلی‌اتر اسفنجی

۲-۱ میکروبیدهای آگارز

سلول‌های هیبریدوما می‌تواند LSP21، به‌صورت معلق کشت می‌شوند اما در کشت با استفاده از میکروبیدهای آگارز (۲,۵ درصد؛ اندازه متوسط ۱۰۰-۸۰ میکرومتر)، نرخ رشد، زنده ماندن و تولید محصول توسط آنها افزایش یافت [۲۱]. این مسئله نشان می‌دهد میکروبیدهای آگارز، از منظر میانکنش با این سلول‌ها بسیار فعال هستند. به این معنا که سلول‌هایی که عملاً غیر چسبنده تلقی می‌شوند، به خوبی با این داربست‌ها رشد می‌کنند (شکل ۱).

^۱ On-Cell mAb Screening



شکل ۱ تصاویر میکروسکوپی کشت سلول‌های هیبریدوما در میکروبیدهای آگارز [۲۱]. سلول‌های منفرد در روز صفر (سمت چپ)؛ تشکیل کلاسترهای سلولی در روز ششم (سمت راست و وسط).

گزارش شده است که بررسی محلول رویی^۱ تا یک هفته، تمایز سامانه‌ی مبتنی بر داربست را نشان نداده و نتایج عملی تقریباً مشابه با نتایج حاصل از کشت سلول‌ها به صورت معلق بوده است [۲۱]. درصد آگارز، بسته به آزمون و خطا یا دید پژوهشگر، و یا موارد گزارش شده انتخاب می‌شود. در اینجا، باردیگر یادآوری می‌شود که نمی‌توان به دستورالعملی جامع در این باره دست یافت.

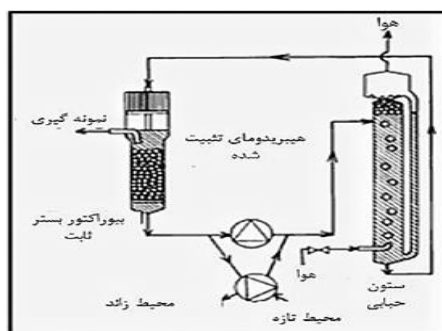
۲-۲ ذرات سخت شده‌ی آلزینات

در زمینه پژوهش بر روی کشت سلول‌های هیبریدوما به روش سه بعدی و مبتنی بر داربست زیستی، ژل‌های آلزیناتی به عنوان یکی از گزینه‌های مهم و کاربردی مطرح هستند. این مساله به‌ویژه در کشور ایران که از منابع ارزشمند گونه‌های متعدد جلبک‌های قهوه‌ای برخوردار است، بسیار پر رنگ‌تر است [۲۲]. بزرگترین چالش در استفاده از این داربست‌ها، واکنشی است که بین یون‌های فسفات موجود در محیط کشت و یون‌های فلزی پایدارکننده‌ی ژل اتفاق می‌افتد. به این صورت که یون‌های فسفات، کاتیون‌ها را از ساختار ژل بیرون کشیده و باعث سست شدن ساختار ژل می‌شوند [۲۳]. در طی سال‌ها، برای حل این معضل، رویکردهای گوناگونی در پیش گرفته شده است. به عنوان مثال، لیم و ماس [۲۴] از میکروکپسول‌های آلزینات پوشانده شده با پلی‌لازین، و یا ایجیما و همکاران

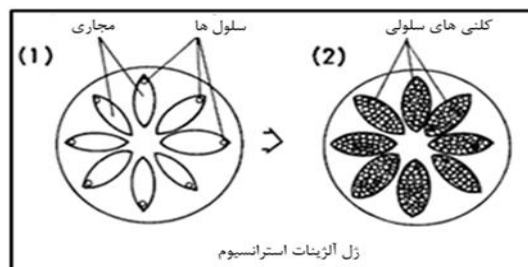
[۲۵]، از ژل پلیمر اورتان برای پوشاندن سطح ژل آلزیناتی در فلوئوروکربن استفاده کرده‌اند. تاناکا و آیری [۲۶] چنین گزارش کرده‌اند که ژل‌های آلزیناتی پایدار شده با یون‌های استراتیوم و باریوم نسبت به ژل‌های کلسیمی، محکم‌تر بوده و مقاومت بیشتری نسبت به یون‌های فسفات دارند. اما هر دوی این یون‌ها، به یون‌های فسفات متصل شده و دیر یا زود، مقاومت ژل از دست می‌رود. یون‌های فسفات برای رشد سلول‌ها ضروری هستند و از سویی، افزودن کاتیون‌های دو ظرفیتی به محیط کشت معمولی نیز کارساز نیست، چرا که در نهایت باعث ته‌نشینی کاتیون‌ها در پیوند با یون‌های فسفات می‌شود (رشد سلول‌ها ضعیف خواهد شد) [۲۳]. برای حل این مشکل، می‌توان از سوبستراهای فسفات استری مانند گلوکز-۱-فسفات (G1P) استفاده کرد که به کاتیون‌های دو ظرفیتی متصل نمی‌شوند و از طریق مسیرهای سوخت‌وساز متابولیزه می‌شوند. بنابراین، آنها جایگزین مناسبی برای سایر منابع فسفر می‌باشند و این امر باعث می‌شود کاتیون‌های دو ظرفیتی بدون ایجاد مشکل در محیط کشت وجود داشته باشند [۲۳]. هنگامی که محیط کشت معمولی RDF (مخلوطی از RPMI1640، DME و F12 و بدون سرم [۲۷]) به‌طور متناوب با محیط کشت حاوی G1P و یون‌های استرانسیم استفاده شوند، سلول‌های هیبریدومای تثبیت شده در ژل آلزینات (H11۴) (موش-
^۱ supernatant

باید به‌طور متناوب با محیط کشت حاوی RDF و GIP و یون استرانسیوم تعویض شود. چنانچه احتمالاً سوالی ذهن خواننده را درگیر کرده باشد، باید گفت استفاده از محیط کشت دوم برای ۱۰ روز، موجب مرگ سلول‌های تثبیت شده در ژل خواهد شد [۲۳]. علت احتمالی این اتفاق آن است که مرگ سلول‌ها به این دلیل رخ می‌دهد که سلول‌های هیبریدوما در کانال‌های دوکی نشان داده شده در شکل ۳ رشد کرده و آنها را در یک هفته اشغال کرده‌اند و سلول‌ها با فشار بر کانال‌ها، آنها را به بزرگ شدن وا می‌دارند تا جایی برای رشد بیشتر داشته باشند.

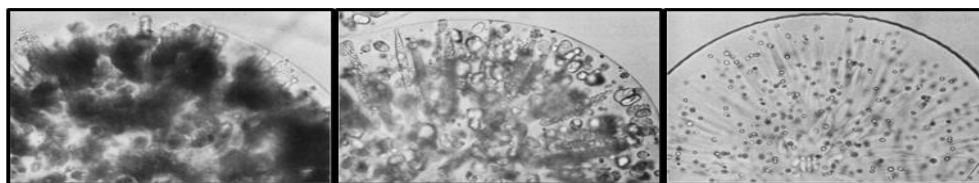
انسان؛ شکل ۲))، به مدت ۵۰ روز آنتی‌بادی تک دودمانه را با همان نرخ تولید سلول‌های کشت شده در محیط کشت معمولی تولید می‌کنند [۲۳]. طبیعتاً سلول‌های هیبریدومایی که در چنین ژلی کشت می‌شوند، مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌ها و ناملازمات درون سامانه سه بعدی از خود نشان می‌دهند. نکته‌ی بسیار مهم این است که پژوهشگر برای گزارش شفاف از کارایی سامانه‌ی خود، اصولاً نباید mAb هایی را که توسط سلول‌های نش‌ت شده به محیط کشت تولید می‌شوند، در محاسبات خود وارد کند و این موضوع، مستلزم شناخت رفتار سلول‌های هیبریدوما در کشت با این داربست است. پیش‌تر اشاره شد که محیط کشت معمولی



شکل ۲ شمایی از سامانه‌ی طراحی شده برای کشت سلول‌های هیبریدوما (H11۴) با استفاده از داربست‌های استرانسیوم آلزیناتی؛ (برگرفته از DOI: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18163.x) (۲۳)؛ بعد از تثبیت سلول‌های H11۴، ۲,۷ گرم از پارتیکل‌های ژل درون فرمانتور بارگذاری می‌شود. سپس، محیط کشت حاوی GIP و ۵ میلی‌مولار یون استرانسیوم، به‌صورت گردشی (۵۰ میلی‌لیتر/دقیقه) در سامانه، بین بخش ری‌اکتور و ستون حباب‌دار در جریان می‌افتد. نرخ شارش محیط کشت سطحی در فرمانتور، ۲۸ سانتی‌متر/دقیقه است. جریان گاز ورودی به ستون حباب‌دار با فیلتر غشایی ۰,۲ میکرومتر استریل می‌شود (۹۵ درصد هوا/ ۵ درصد کربن دی‌اکسید). سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تماس پیوسته با محیط کشت غنی از اکسیژن هستند. حجم کل سامانه در این طرح ۴۵ میلی‌لیتر و غلظت اولیه سلول‌ها در ذرات ژل ۳×۱۰۵ سلول/گرم ژل می‌باشد.



شکل ۳ موقعیت سلول‌ها در ذرات سخت شده‌ی ژل استرانسیوم آلزینات [۲۳]؛ به ساختار دوکی داربست توجه کنید.



ج

ب

الف

شکل ۴ وضعیت سلول‌های هیبریدوما در داربست ژل استرانسیوم آلژینات [۲۳]؛ الف) سلول‌های هیبریدوما بلافاصله پس از تثبیت؛ ب) سلول‌های هیبریدوما ۱ هفته پس از تثبیت؛ ج) سلول‌های هیبریدوما ۲ هفته پس از تثبیت

اکسیژن می‌باشد [۲۸]. با توجه به شکل ۵، عملکرد این داربست بهتر مشخص می‌شود.

۲-۴ اسفنج‌های پلی‌اورتان (PU)

برای کشت هیبریدوما موشی F12، از سامانه‌ای استفاده شده است که در آن، سلول‌ها درون مکعب‌های پلی‌استری-پلی‌اورتان (با اندازه‌ی ۵ میلی‌متر) به دام می‌افتند [۲۹]. برای ارتقای رشد سلول‌ها، از دو ماده‌ی Pluronic F68 و پریمتون RL^۲ استفاده شده است [۲۹]. ماده‌ی Pluronic F68 نوعی سورفکتانت غیر یونی (غیر باردار) است که به طور گسترده در صنایع مختلف از جمله داروسازی، غذایی و آرایشی استفاده می‌شود. این ماده به دلیل خواص امولسیفایری، حلالیت و زیست‌سازگاری بالا، شناخته شده است. نام کامل آن پلی‌اکسایتیلن-پلی‌اکس پروپیلن بلوک کوپلیمر است و به اختصار PEO-PPO-PEO نیز نامیده می‌شود. پریمتون RL نیز، یک هیدرولیزات پروتئینی است که از هضم آنزیمی گوشت به دست می‌آید. این ماده به عنوان یک منبع غنی از آمینواسیدها، پپتیدها، نمک‌های آهن و برخی ترکیبات دیگر با وزن مولکولی پایین شناخته می‌شود. پریمتون RL به دلیل خواص رشددهنده و مقرون به صرفه بودن، به طور گسترده‌ای در کشت سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود. در شکل ۶، سامانه طراحی شده مبتنی بر استفاده از این داربست آمده است.

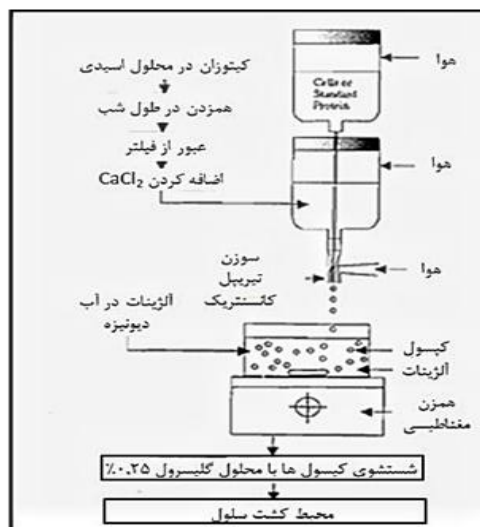
به این ترتیب، اگر ژل سختی داشته باشد و در برابر این فشار مقاومت نشان دهد، منجر به محدودیت سلول‌ها و مرگ آنها خواهد شد. در شکل ۴ (الف، ب و ج)، میزان رشد سلول‌های هیبریدوما در دوک‌های داربست ژل استرانسیوم آلژینات قابل مشاهده است.

۲-۳ کیتوزان + گلوکوزامین ۱,4-β آلژینات (غشا پلیمر زیستی)

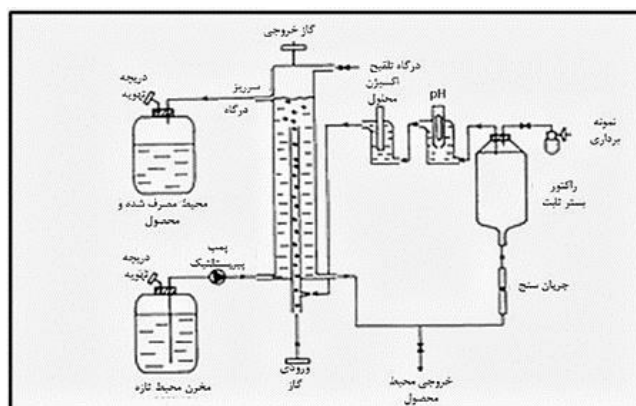
نکته‌ای حائز اهمیت درباره‌ی داربست‌های از نوع غشاپلیمر زیستی^۱، این است که اندازه‌ی حفرات تشکیل شده در این داربست‌ها را می‌توان با آزمون انتشار پروتئین‌های استاندارد و مبتنی بر برخی پارامترها نظیر pH تعیین کرد [۲۸]. اگر پژوهشگر تصمی بگیرد تا برای به دست آوردن اندازه‌ی حفرات به روش تست انتشار، از پارامتر pH استفاده کند (متغیر)، باید بازه‌ای را انتخاب کند که در آن، ته‌نشینی و رسوب از محلول داربست (فرضا کیتوزان) اتفاق نیفتد [۲۸]. همانطور که پیش‌تر مطرح شد، برای گزارش کارایی داربست، نباید داده‌های حاصل از سلول‌های نشتی محاسبه شوند. بدیهی است که یکی از راه‌ها برای چنین هدفی، نگه داشتن mAb ها درون داربست است تا به طور مفروض بتوان با تفکیک نمونه، اطلاعات معنادار به دست آورد. رده‌های هیبریدوما ATCC HB-8852 و ATCC CRL-1606 با موفقیت در این داربست کشت شده‌اند. عامل تولید بهتر mAb با استفاده از این داربست، بهبود نقل و انتقالات

^۲Primatone RL

^۱ Biopolymer membrane



شکل ۵ نمایش سامانه‌ی طراحی شده برای کشت سلول‌های هیبریدوما (ATCC HB-8852 و ATCC CRL-1606) با استفاده از کپسول‌های کیتوزان و ژل آلژینات [۲۸]. تعیین اندازه‌ی حفرات حاوی سلول در ژل آلژینات، به نوعی متاثر از اندازه‌ی کپسول‌های کیتوزان است. همانطور که مشاهده می‌شود، سلول‌های هیبریدوما با عبور از مخزن اولیه، وارد محلول کیتوزان شده و انکپسوله می‌شوند. سپس، کپسول‌ها وارد ژل آلژیناتی می‌شوند. کیتوزان، نقشی مشابه غشا در تامین اکسیژن، مواد مغذی و غیره برای سلول یا سلول‌های محبوس ایفا می‌کند.



شکل ۶ طرح سامانه‌ی کشت سلول‌های هیبریدوما (F12) با استفاده از اسفنج‌های پلی‌اورتان (برگرفته از [۲۹] DOI: 10.1007/BF00365078). یک سامانه پرفیوژن گردش‌ی بسته را مشاهده می‌کنید که شامل یک محفظه رشد با بستر ثابت (با حجم کل ۳۰۰ میلی‌لیتر) است که با مکعب‌های پلی‌استر PU به اندازه ۵ میلی‌متر پر شده است. محیط کشت به صورت صعودی توسط یک پمپ ایرلیفت که در مخزن محیط کشت بدون سلول (با حجم کل ۷۰۰ میلی‌لیتر) نصب شده است، گردش می‌کند. پمپ ایرلیفت، همچنین به عنوان اکسیژن‌رسان برای محیط کشت عمل می‌کند. فلوومتر نصب شده بین قسمت پایینی محفظه اسفنج (یا فوم) PU و محفظه بدون سلول، نقش نظارت بر سرعت گردش محیط کشت را ایفا می‌کند. مخزن محیط کشت تازه از طریق یک پمپ پرستالتیک به راکتور متصل است. مایع رویی بدون سلول مصرف شده، به طور مداوم در یک محفظه سرد، مجاور محفظه کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری می‌شود.

در توضیح شکل ۶، پرفیوژن^۱ به معنای جریان مداوم یک مایع از طریق یک سامانه است. در این طرح، محیط کشت به طور مداوم در گردش است تا مواد مغذی تازه به سلول‌ها برسد و مواد زائد از محیط حذف شود. بستر ثابت، محیط کشتی است در داخل یک محفظه ثابت قرار دارد و سلول‌ها بر روی یک بستر جامد (در این مورد، مکعب‌های پلی‌استر (PU) رشد می‌کنند. پمپ ایرلیفت، نوعی پمپ است که از حباب‌های هوا برای جابجایی مایع استفاده می‌کند. در این طرح، حباب‌های هوا در مخزن محیط کشت بدون سلول ایجاد می‌شوند و باعث بالا رفتن مایع در لوله می‌شوند. فلومتر، دستگاهی برای اندازه‌گیری سرعت جریان مایع است. پمپ پرستالتیک، نوعی پمپ است که با اعمال فشار بر یک لوله انعطاف‌پذیر، مایع را جابجا می‌کند.

۲-۵- داربست پلی‌اتیلن ترفتالات (PET) فیروز شده

در اینجا پیش از پرداختن به موضوع، توضیحاتی در رابطه با مسئله‌ی زمان مطرح می‌شود. چنانچه هدف پژوهشگر، کشت طولانی مدت سلول‌های هیبریدوما باشد، باید به سوی کشت سه بعدی حرکت کند خصوصاً که در مقایسه با روش کشت دو بعدی سلول، رویکرد کشت سه بعدی، فضای بیشتری برای رشد و تکثیر سلول‌ها در یک بازه‌ی زمانی طولانی‌تر ایجاد کرده و در شبیه‌سازی نسبت به شرایط طبیعی، بهتر عمل می‌کند [۳۰]. این موضوع بایسته‌هایی چون پایداری محیط کشت، کاهش مرگ سلولی، مقاومت سلول‌ها در برابر انواع ناملازمات و غیره دارد. در این راستا، طولانی کردن فاز G1 بدون افزایش نرخ مرگ سلولی از طریق آپوپتوز، کلید حفظ میزان بالای تولید آنتی‌بادی تک دودمانه توسط سلول‌های هیبریدوما در کشت‌های طولانی مدت است [۳۱]. خصوصیات الیاف ریسته نشده PET برای کشت رده‌ی هیبریدومای موشی AE6 [۳۱]: ضخامت، ۰٫۱۸ سانتی‌متر، قطر الیاف، ۲۰ میکرومتر، چگالی ماتریس، ۰٫۱۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب، تخلخل،

۹۲٫۵ درصد، سطح ویژه، ۱۹۰ سانتی‌متر مربع/سانتی‌متر مکعب. نکته‌ی اساسی در اینجا، آنست که مهم‌تر از خود بستر برای کشت سه بعدی (انتخاب داربست)، شرایط محیطی حاکم بر کشت سه بعدی است (3D). هر چه این شرایط محیطی، پایدارتر و بهینه‌تر باشد، روند تولید mAb بهبود خواهد یافت. استفاده از داربست برای سلول‌های هیبریدوما، نه تنها مهار ناشی از ارتباط سلول-سلول^۲ را به تاخیر می‌اندازد، بلکه زمینه‌ی بهتری برای ارتباطات سلول-سلول و میانکنش‌های مهم برای ممانعت از مرگ سلولی از نوع آپوپتوز فراهم می‌کند. توجه شود که PET به عنوان بستری ایده‌آل برای رشد سلول‌های هیبریدوما شناخته نمی‌شود و داربست‌های دیگری نیز وجود دارند که سطح بیشتری در اختیار سلول‌ها قرار می‌دهند. بنابراین، با کنترل بهتر موارد محیطی مانند گازهای محلول، pH و مواد مغذی موجود در سامانه، می‌توان به مقادیر حجمی بالاتری از mAb در سامانه‌های سه بعدی نظیر FBB ها (Fibrous Bed Bioreactor) دست یافت (سامانه‌ی مبتنی بر داربست فیبروزه مانند PET). تامین سطح توسط PET، علت عملکرد بهتر در سامانه‌ی سه بعدی FBB نیست، چراکه با یکسان بودن این متغیر در بین دیگر سامانه‌ها نیز، باز هم FBB عملکرد نسبی بهتری نشان می‌دهد [۳۱].

حرکت به سمت استفاده از سامانه‌های عاری از سرم، از دیگر بحث‌های بسیار قابل توجه است که در این بخش بدان اشاره می‌شود. برای دستیابی به شرایط کشت عاری از سرم، شاید به چندین ماه زمان یا بیشتر نیاز باشد تا سلول‌ها با این شرایط تطبیق پیدا کنند و بسته به نوع سلول، ممکن است هر چیزی نیاز به بررسی و تغییر داشته باشد [۳۲ و ۳۳]. مشاهده شده است که میزان تولید لاکتات به نسبت مصرف گلوکز در کشت‌های عاری از سرم کاهش می‌یابد. بنابراین، نیاز به گلوکز برای سنتز سایر متابولیت‌ها یا مواد مغذی که به طور معمول در سرم یافت می‌شوند، افزایش می‌یابد [۳۱].

^۱ cell-cell contact inhibition

^۲ Perfusion

از آنجایی که، کمتر بودن میزان سرم به معنی کمتر بودن میزان فاکتورهای رشد است [۳۵ و ۳۴] و کمتر بودن فاکتورهای رشد، به معنای ورود سلول‌ها به فاز توقف رشد (Growth arrested) و مرحله‌ی تولید (G0/G1) است، عدم وجود سرم در هر دو سامانه‌های دو و سه بعدی منجر به افزایش مقادیر تولید شده‌ی mAb می‌شود [۳۱]. البته لازم به ذکر است که ورود سلول‌ها به فاز G0/G1، به معنای کُند شدن چرخه‌ی سلولی بوده و گرچه طبیعتاً نرخ تولید لحظه‌ای آنتی‌بادی توسط سلول‌ها کاهش می‌یابد، اما میزان تولید نهایی افزایش خواهد یافت که در کشت‌های با مدت زمان طولانی‌تر نمود می‌یابد [۳۶]. میزان تولید mAb در سامانه‌ی FBB، با کاهش سرم به میزان ۲٫۵ درصد و ۱ درصد، به ترتیب ۲٫۳ برابر و ۳ برابر می‌شود [۳۷]. اگرچه ممکن است کشت به صورت عاری از سرم از جنبه‌ی صرفه‌جویی در هزینه‌ها، مناسب باشد و یا بالعکس، هزینه‌های بالایی تحمیل کند [۳۲]، اما، احتمالاً بزرگترین چالش، وقوع آپوپتوز در چنین شرایطی است [۳۸]، که در هر دو کشت دو و سه بعدی افزایش می‌یابد. وجود فاکتورهای رشد و ابقا در سرم، موجب حفاظت سلول‌ها در برابر آپوپتوز شده و زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش می‌دهد [۳۹]. البته که استفاده از داربست، خود نوعی گزینش سلول‌های سالم است. به این ترتیب که سلول‌هایی در داربست محبوس می‌شوند که بتوانند برهمکنش بهتری با داربست و با دیگر سلول‌ها داشته باشند و از سویی اندازه‌ی بزرگتری دارند. چنین سلول‌هایی را می‌توان به عنوان غیرآپوپتوتیک^۱ در نظر گرفت. این موضوع بهتر از همه جا، در کشت‌های با بازه زمانی طولانی‌تر بر پژوهشگر هویدا خواهد شد.

۲-۶ سل-ژل سیلیکا

سل-ژل (Sol-gel) یک روش مقرون به صرفه و کاربردی برای سنتز و تولید مواد جامد یا مواد هیبریدی با خلوص بالا و ساختار کنترل شده، می‌باشد [۴۱ و ۴۰]. در این روش،

ذرات بسیار ریز (مانند نانوذرات) در یک فاز کلوییدی مایع (سل) پراکنده شده و با گذشت زمان، این ذرات به هم پیوسته و یک شبکه سه‌بعدی جامد (ژل) را تشکیل می‌دهند [۴۱ و ۴۰]. از آنجا که حلال در این روش معمولاً آب یا الکل است، گزینه‌ای سازگار با محیط زیست محسوب می‌شود [۴۱ و ۴۰]. سیلیکا داربست، شبکه سه‌بعدی ساخته شده از نانوذرات سیلیکا (SiNP) است که از واحدهای چهاروجهی دی‌اکسید سیلیسیم (SiO₂) تشکیل شده است [۴۳ و ۴۲]. بسته به روش تهیه، این داربست می‌تواند طیفی از درجات تخلخل را داشته باشد و به این ترتیب، خواص متمایزی پیدا کند [۴۴]. این روش شامل تشکیل سل از طریق هیدرولیز و الکل‌زدایی (مانند حذف اتانول؛ در ادامه بیشتر توضیح داده خواهد شد) است که منجر به تشکیل ژل و متعاقباً، خشک شدن می‌شود (تشکیل ماده جامد) [۴۵ و ۴۱]. با توجه به آنچه از منابع به دست آمد، می‌توان مراحل تشکیل داربست سل-ژل سیلیکا را به صورت هیدرولیز، پلیمریزاسیون، ژلاسیون و خشک کردن خلاصه کرد (شکل ۷).

در مرحله‌ی هیدرولیز، پیش‌ماده‌ی سیلیکایی (مانند تترا اتیل ارتوسیلیکات یا TEOS 46) با آب واکنش داده و گونه‌های واکنش‌پذیر هیدروکسیل تشکیل می‌دهند. در طی پلیمریزاسیون [۴۷]، گونه‌های هیدروکسیل در این مرحله با یکدیگر واکنش داده و زنجیره‌های پلیمری سیلیکا را تشکیل می‌دهند. با افزایش طول زنجیره‌های پلیمری، شبکه‌ای سه‌بعدی تشکیل شده و محلول به یک ژل تبدیل می‌شود. این مرحله ژلاسیون است [۴۷]. در مرحله خشک کردن، ژل حاصل خشک شده و در دمای بالا پخته می‌شود تا آب موجود در آن تبخیر شود [۴۸]. با این کار، پیوندهای سیلیکایی تقویت می‌شوند. داربست‌های سل-ژل، تراوایی کافی برای نقل و انتقال مواد و به‌ویژه اکسیژن تامین می‌کنند که بقا و زنده‌مانی سلول‌ها را تضمین می‌کند [۴۶]. از پیش

^۱ non apoptotic

ماده‌های این داربست می‌توان به TEOS (تترا اتیل اورتوسیلیکات یا تترا اتوکسی سیلان)، THEOS (تتراکسی (۲-اتوکسی اتیل) ارتوسیلیکات) و سدیم سیلیکات اشاره کرد [۴۶] که هر یک، ویژگی‌های خاص خود را دارند. داربست‌های TEOS بیشترین حجم منافذ کل و مساحت سطح ویژه را دارند، در حالی‌که داربست‌های THEOS و سیلیکاته، به ترتیب مقادیر متوسط و کمترین را برای هر دو پارامتر دارا می‌باشند [۴۶]. فعالیت متابولیک سلول‌های هیبریدوما در داربست‌های سیلیکاتی مبتنی بر THEOS و ژل‌های سیلیکاتی مایع بیشتر است [۴۶].

با توجه به زیست‌سازگاری فراورده‌های دی‌آل یا پلی‌آل، طی هیدرولیز سیلان‌های پلی‌آلی تغییر یافته، این سیلان‌ها بهترین گزینه برای تثبیت سلول‌های هیبریدوما (مانند C5A114 یا 163B6) در سنتز داربست‌های سل-ژل سیلیکا، هستند [۴۶]. احتمالاً مهمترین معضل در رابطه با استفاده از این داربست‌ها، به دام افتادن mAb به درون آنها باشد، که البته موجب دناتوراسیون و یا تغییر در عملکرد آنها نمی‌شود [۴۹]. آزمایش‌های الایزا نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های خارج شده از ژل، تاثیر منفی از فرایند ژلاسیون نگرفته و از منظر زیستی فعال هستند و قادر هستند آنتی‌ژن اختصاصی خود را تشخیص دهند [۴۶].

۲-۷ اسفنج پلی‌اتر

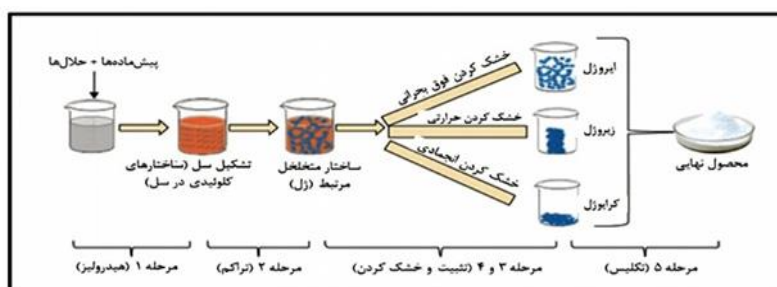
پیش‌تر، به کشت‌های با زمان طولانی‌تر اشاره شد. مسئله اصلی در اینجا این است که آیا نرخ تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAb) برای پژوهشگر اولویت دارد یا حجم نهایی تولید آن؛ به عبارت دیگر، زمان تولید، مهم‌ترین عامل در این رابطه است. اگر مورد دوم باشد، استفاده از داربست‌هایی نظیر این اسفنج‌ها طبق آنچه ذکر شد، مفید خواهد بود. این نکته حائز اهمیت است که رشد کندتر

سلول‌های هیبریدوما، لزوماً به معنای کاهش تولید نهایی محصول توسط آنها نیست. با کند شدن چرخه تقسیم، فرصت بیشتری برای ماندن سلول‌ها در فاز G0/G1 خواهد بود و بنابراین، تولید نهایی افزایش خواهد یافت. این موضوع با نرخ لحظه‌ای تولید متفاوت است.

اسفنج پلی‌اتر، تقسیم سلول‌ها را کند می‌کند، اما می‌تواند باعث افزایش مقدار ۳۰ درصدی حجم mAb تولیدی نسبت به سامانه‌های معلق^۱ شود [۳۶]. از مزایای طراحی سامانه کشت مبتنی بر این داربست، می‌توان به مواردی مانند کمک به پایداری بیشتر محیط کشت در پارامترهایی مانند pH، اسمولاریتی و غلظت اکسیژن محلول، کمک به تغلیظ ترکیبات اتوکراینی نظیر IL-6، محافظت از سلول‌های تثبیت شده در برابر بریدگی و آسیب و همچنین در دسترس بودن این داربست اشاره کرد [۳۶].

اگرچه استفاده از بیوراکتور مبتنی بر این داربست، برای بیش از ۱۵ تا ۲۰ روز توصیه نشده است، اما، امکان افزایش حجم نهایی mAb تا ۵۷ درصد وجود دارد [۳۶]. در پایان، مطالبی کوتاه در ارتباط با اصطلاحات Fed Batch Culture و Batch Culture ارائه شده است. اصطلاح اول را، کشت نیمه مستمر نیز می‌نامند. در این روش، مواد مغذی به تدریج و در طول فرایند کشت به محیط اضافه می‌شوند، اما محصولات نهایی یا سلول‌ها از محیط خارج نمی‌شوند [۵۰]. اصطلاح دوم که به کشت دسته‌ای نیز معروف است، روشی است که در آن تمام مواد مغذی مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسم‌ها در ابتدای فرایند به محیط کشت اضافه می‌شوند [۵۱]. مواردی که در این مقاله ارائه شدند، همگی از روش کشت نیمه مستمر پیروی می‌کنند که به تجهیزات پیشرفته‌تر و کنترل دقیق‌تری نیاز دارند.

^۱ stirred system



شکل ۷ خلاصه‌ای از مراحل تهیه سل-ژل [۴۸]. در مرحله‌ی آخر (کلسینه کردن)، ماده در حرارت نسبتاً بالایی قرار می‌گیرد تا مواد شیمیایی باقیمانده (ناخالصی‌ها) تجزیه شده و مواد فرآری مانند آب نیز از ساختار خارج شوند (برای اطلاعات بیشتر به مقالات دیگر رجوع شود).

۳-نتایج

مقاله یاد شدند، رفته و با بررسی‌های مورد نیاز، به گزینش داربست زیستی مناسب و طراحی سامانه‌ی سه بعدی (بیوراکتور) برای تحصیل بهترین نتایج اقدام کرد. طراحی سامانه‌هایی با قابلیت کنترل و نظارت آنی^۱ در سطوح جزء، و با بیشترین شباهت به شرایط فیزیولوژیک از اهداف پیش رو در این راستا خواهد بود.

۵-منابع

- [1] Costa A, Naranjo JD, Londono R, Badyalak SF. Biologic Scaffolds. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017; 7 (9).
- [2] Park JY, Park SH, Kim MG, Park S-H, Yoo TH, Kim MS. Biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. Biomimetic Medical Materials: From Nanotechnology to 3D Bioprinting. 2018:109-21.
- [3] Hata Y, Iida J. Scaffold Protein. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editors. Encyclopedia of Neuroscience. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 3613-6.
- [4] Ballav S, Deshmukh AJ, Siddiqui S, Aich J, Basu S. Two-dimensional and three-dimensional cell culture and their applications. Cell Culture—Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences. 2021.
- [5] Segeritz C-P, Vallier L. Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. Basic science methods for clinical researchers: Elsevier; 2017. p. 151-72.

بیوراکتورها با تأمین شرایط کنترل‌شده برای کشت سه بعدی سلول‌های هیبریدوما نظیر گازهای محلول، pH و مواد مغذی می‌توانند به افزایش بهره‌وری تولید آنتی‌بادی تک دودمانه کمک کنند. همچنین، نتایج حاصل از مطالعات نشان می‌دهد که بهره‌گیری از داربست‌های زیستی و بیوراکتورها، ضمن افزایش بهره‌وری تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانه، می‌تواند به ایجاد مدل‌های کارآمدتری برای تحقیقات دارویی و پزشکی منجر شود. علاوه بر موارد کلیدی یاد شده، به‌نظر می‌رسد زمان، از موثرترین عوامل در انتخاب رویکرد کشت سلول‌های هیبریدوما و تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانه باشد.

۴-نتیجه‌گیری

اگرچه تجربه، پژوهشگر را در انتخاب رویکرد پژوهشی هدایت می‌کند اما، به‌نظر می‌رسد مهمترین عامل در این انتخاب، "زمان" می‌باشد. پوشیده نیست که مواردی همچون نوع رده‌ی سلولی، شرایط آزمایشگاهی در دسترس، هدف پژوهشگر و یا آنتی‌ژن مورد نظر در تعیین این رویکرد نقش دارند، اما در نهایت همه‌ی موارد به زمان وابسته هستند. و اما بعد، چنانچه زمان تعیین شده برای تولید آنتی‌بادی تک دودمانه با استفاده از روش کشت سه بعدی سلول‌های هیبریدوما و مبتنی بر داربست زیستی کافی باشد، باید به سراغ تک تک عوامل موثر که برخی از آنها در این

^۱ instantaneous control and monitoring

- editors. Capture and display of antibodies secreted by hybridoma cells enables fluorescent on-cell screening. *MAbs*; 2019: Taylor & Francis.
- [17] Xiang Min CL, Hu Xiuzhong, Zhou Yuan, Yu Jie, Liu Xiaohua, Wang Dingfa, Xia Yu, Tao Bifei, inventorHybridoma cell strain, preparation method and application thereof, monoclonal antibody and application thereof. China2019.
- [18] Sun Guanru AX, Zhang Limin, inventorHybridoma cell strain, monoclonal antibody produced by hybridoma cell strain and application of hybridoma cell strain2019.
- [19] Trier NH, Friis T. Production of Antibodies to Peptide Targets Using Hybridoma Technology. *Peptide Antibodies: Methods and Protocols*: Springer; 2024. p. 135-56.
- [20] Singh G, Shiri T, Kumar A, Jain S. HYBRIDOMA TECHNOLOGY USED FOR THE SCANNING OF VARIOUS DISEASE & CURE WITH THE HELP OF MABS. 2021.
- [21] Nilsson K, Scheirer W, Merten O, Östberg L, Liehl E, Katinger H, Mosbach K. Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules. *Nature*. 1983; 302 (5909).
- [22] Panahi HKS, Dehghani M, Aghbashlo M, Karimi K, Tabatabaei M. Shifting fuel feedstock from oil wells to sea: Iran outlook and potential for biofuel production from brown macroalgae (ochrophyta; phaeophyceae). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019;112:626-42.
- [23] Hashimoto K, Shirai Y. Continuous Production of Monoclonal Antibody by Hybridoma Cells Immobilized in Hardened Alginate Gel Particles a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990; 613 (1):216-26.
- [24] Lim F, Moss RD. Microencapsulation of living cells and tissues. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1981;70(4):351-4.
- [25] Iijima S, Mano T, Taniguchi M, Kobayashi T. Immobilization of hybridoma cells with alginate and urethane polymer and improved monoclonal antibody production. *Applied microbiology and biotechnology*. 1988;28:572-6.
- [26] Tanaka H, Irie S. Preparation of stable alginate gel beads in electrolyte solutions using Ba²⁺ and Sr²⁺. *Biotechnology techniques*.
- [6] Ghanemi A. Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations. *Saudi Pharm J*. 2015;23(4):453-4.
- [7] Riss TL, Moravec RA, Duellman SJ, Niles AL. Treating cells as reagents to design reproducible assays. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*. 2021; 26(10):1256-67.
- [8] Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018; 14(4):910-9.
- [9] Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in molecular biosciences*. 2020;7:33.
- [10] Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77.
- [11] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
- [12] Campuzano S, Pelling AE. Scaffolds for 3D cell culture and cellular agriculture applications derived from non-animal sources. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2019; 3:38.
- [13] Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & translational medicine*. 2016;1(1):63-81.
- [14] Kuklina G, Ipatov S, Gorshkov A, Pechenkin D, Eremkin A, Kuznetsovsky A, et al. Obtaining and characterization of hybridomas producing monoclonal antibodies against coronavirus SARS-CoV-2. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 1:105-10.
- [15] WEBER E, MEDEK R, inventorsHybridoma cell lines and use thereof for producing a monoclonal antibody against the human cardiac myosin binding protein c (c-protein, mybpc3, cmybp-c or my-c). Germany2020.
- [16] Puligedda RD, Sharma R, Al-Saleem FH, Kouivaskaia D, Velu AB, Kattala CD, et al.,

- [37] Łabowska MB, Cierluk K, Jankowska AM, Kulbacka J, Detyna J, Michalak I. A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. *Materials* (Basel). 2021;14 (4).
- [38] Kulkarni GV, McCulloch CAG. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 1994; 107(5):1169-79.
- [39] Zanghi JA, Fussenegger M, Bailey JE. Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnology and bioengineering*. 1999; 64(1):108-19.
- [40] Merghes P, Ilia G, Maranescu B, Varan N, Simulescu V. The Sol–Gel Process, a Green Method Used to Obtain Hybrid Materials Containing Phosphorus and Zirconium. *Gels*. 2024; 10(10):656.
- [41] Subhayu C. A REVIEW OF THE SOL-GEL PROCESS AND ITS APPLICATION. *International Education and Research Journal (IERJ)*. 2024; 10 (7).
- [42] Yuan C, Wang M, Li M. Design and synthesis of silica- and silicate-based materials, and their application in the development and analysis of latent fingerprints. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023; 167:117278.
- [43] Andreani T, Silva AM, Souto EB. Silica-based matrices: State of the art and new perspectives for therapeutic drug delivery. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015; 62(6):754-64.
- [44] Björk EM, Militello MP, Tamborini LH, Coneo Rodriguez R, Planes GA, Acevedo DF, et al. Mesoporous silica and carbon based catalysts for esterification and biodiesel fabrication—The effect of matrix surface composition and porosity. *Applied Catalysis A: General*. 2017; 533:49-58.
- [45] Latif WA, AL-Owaidi MN. Sol-gel method, “synthesis and applications”. *World Journal of Advanced Engineering Technology and Sciences*. 2023;8(2):160-6.
- [46] Desimone MF, De Marzi MC, Alvarez GS, Mathov I, Diaz LE, Malchiodi EL. Production of monoclonal antibodies from hybridoma cells immobilized in 3D sol–gel silica matrices. *Journal of Materials Chemistry*. 2011; 21 (36):13865-72.
- 1988;2(2):115-20.
- [27] Murakami H, Masui H, Sato GH, Sueoka N, Chow TP, Kano-Sueoka T. Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79(4):1158-62.
- [28] Kim S-K, Son J-H, Yu S-H. Encapsulated animal cell culture for the production of monoclonal antibody (MAb). *Biotechnology and bioprocess engineering*. 1997; 2:73-6.
- [29] Lazar A, Silberstein L, Mizrahi A, Reuveny S. An immobilized hybridoma culture perfusion system for production of monoclonal antibodies. *Cytotechnology*. 1988;1: 331-7.
- [30] Łabowska MB, Cierluk K, Jankowska AM, Kulbacka J, Detyna J, Michalak I. A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. *Materials*. 2021;14(4):858.
- [31] Luo J, Yang ST. Effects of three-dimensional culturing in a fibrous matrix on cell cycle, apoptosis, and MAb production by hybridoma cells. *Biotechnology progress*. 2004;20(1):306-15.
- [32] Butler M. Serum and Protein Free Media. In: Al-Rubeai M, editor. *Animal Cell Culture*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 223-36.
- [33] Levesque MC, O'Loughlin CW, Weinberg JB. Use of serum-free media to minimize apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells during in vitro culture. *Leukemia*. 2001;15(8):1305-7.
- [34] Schepici G, Gugliandolo A, Mazzon E. Serum-Free Cultures: Could They Be a Future Direction to Improve Neuronal Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells? *Int J Mol Sci*. 2022;23. (12)
- [35] Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. Sorafenib suppresses the cell cycle and induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines in serum-free media. *Experimental and therapeutic medicine*. 2010;1(5):863-6.
- [36] Capiamont J, Legrand C, Dousset B, Belleville F, Nabet P. Hybridoma culture in polyether sponge with bovine whey. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 1995;31:412-4.

- [49] Kunarti E, Moran G. Entrapment of avidin in sol-gel derived silica glasses. *Journal of Physical Science*. 2008; 19(2):31-44.
- [50] Wang T, Wang L, Gong X, Chang Z, Yang S, Li J, Wang Z. An Optimized Fed-Batch Culture Strategy Based on Multidimensional Time Series Aggregation. *Applied Sciences*. 2023; 13 (11):6427.
- [51] Markov SM. Cell growth models using reaction schemes: batch cultivation. *Biomath*. 2013; 2(2): ID: 1312301-ID.:
- [47] Nasr Azadani R, Sabbagh M, Salehi H, Cheshmi A, Raza A, Kumari B, Erabi G. Sol-gel: Uncomplicated, routine and affordable synthesis procedure for utilization of composites in drug delivery: Review. *Journal of Composites and Compounds*. 2021; 3(6):57-70.
- [48] Bokov D, Turki Jalil A, Chupradit S, Suksatan W, Javed Ansari M, Shewael IH, et al. Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2021; 2021(1):5102014.

Pivotal operators in 3D Hybridoma cell culture and monoclonal antibody production: The time, Biological scaffolds and Bioreactors

Sajad Davoodi mahd¹, Alireza jalali, Jamil Zargan^{2*}

1. Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran;

2. Associate Professor, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

zargan44@gmail.com

Receipt: 2025/03/07

Accepted: 2025/07/21

Abstract

Three-dimensional culture has many advantages, which can be briefly mentioned in cancer research, toxicity analysis, investigation and development of products such as vaccines, or production of monoclonal antibodies and recombinant proteins. One of the applied methods in monoclonal antibody production is the cultivation of hybridoma cells, which has undergone significant progress in recent years. Monoclonal antibodies have a variety of applications due to their high specificity, which can be mentioned as use in disease diagnosis and cancer treatment kits. Bioreactors can help improve the efficiency of monoclonal antibody production by providing controlled conditions for three-dimensional cultivation of hybridoma cells, such as dissolved gases, pH, and nutrients. Also, investigations reveal that, the use of biological scaffolds and bioreactors can lead to the creation of more efficient models for pharmaceutical and medical research. Regardless of other determining factors in choosing a monoclonal antibody production approach, "time" seems to be the most important factor at the beginning; because, by exerting long-lasting approaches of Hybridoma cell culture, it is possible to achieve more antibody values, although in gentler rates in comparison with more quick methodes.

Keywords: Biological –scaffold, Hybridoma cell, 3D-cell culture, Monoclonal antibody