

ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

Uzgoj stanica ovarija kanalskog soma (CCO) na neporoznim mikronosačima u uvjetima smanjenog udjela seruma

Cultivation of CCO cells on non-porous microcarriers in low-serum conditions.

Igor Slivac, Kristina Radošević, Bogdanka Dukić, Višnja Gaurina Srček*

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

U ovom radu ispitan je uzgoj stanične linije ovarija kanalskog soma (CCO) na mikronosačima tipa Cytodex1 s ciljem proizvodnje biomase te određivanja uvjeta uzgoja u Cell-spin bioreaktoru. Tijekom uzgoja od 312 h praćena je dinamika prihvaćanja CCO stanica na mikronosače, broj stanica i utrošak glukoze u dva medija s 5% i 2% seruma. Uzgoj CCO stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma rezultirao je većim prinosom stanica i specifičnom brzinom rasta u odnosu na preporučeni medij za uzgoj. Dobiveni rezultati ukazuju da ispitani UltraCulture medij predstavlja dobar odabir u slučaju kad je potrebno vršiti uzgoj CCO stanica u uvjetima smanjenog udjela seruma.

Ključne riječi: CCO cells, Cell-spin, cell yield, microcarriers, serum

Summary

In this study Cytodex 1 microcarriers were used for Channel Catfish Ovary (CCO) cell cultivation and biomass production in Spinner-flask. Cell attachment, cell number and glucose consumption were determined during 312 h cultivation in two media with 5% and 2% of serum. CCO cell cultivation in medium with lower serum concentration resulted in higher cell yield and specific growth rate when compared to standard growth medium. Obtained results showed that tested UltraCulture medium was good choice when cultivation of CCO cells in reduced serum conditions is demanded.

Keywords: CCO cells, Cell-spin, cell yield, microcarriers, serum

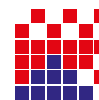
1. Uvod

Posljednjih godina stanične linije riba imaju sve veću ulogu u temeljnim i primijenjenim istraživanjima pa se tako koriste u proizvodnji cjepiva, laboratorijskim istraživanjima fiziologije riba, molekularnoj biologiji, a posebno je značajna njihova primjena u području ekotoksikologije (Fent, 2001). Adherentna stanična linija CCO, dobivena iz ovarija mladih ženki kanalskog soma, uspostavljena je prije više od 30 godina i od tada se koristi u proizvodnji cjepiva za virus kanalskog soma (CCV) (Bowser i Plumb, 1980). Važnu primjenu ima i u istraživanjima toksičnih učinaka različitih farmaceutskih i kemijskih proizvoda koji mogu biti prisutni kao onečišćivači u okolišu i time utjecati na zdravlje ljudi i životinja (Tan i sur., 2008; Radošević i sur., 2011 i 2013).

U laboratorijskim uvjetima, adherentne stanične linije uzgajaju se u posudama poput T-boca i roller boca koje karakterizira relativno ograničena površina za rast stanica (Butler, 2004). U cilju povećanja raspoložive površine za rast adherentnih stanica razvijeni su mikronosači, odnosno čestice izrađene od različitih materijala poput dekstrana, polistirena, kolagena, želatine, celuloze i stakla koje karakterizira visok omjer površine i volumena, čime omogućuju uzgoj adherentnih stani-

ca u sustavima s miješanjem (Kadouri, 1994). Također, rast adherentnih stanica u homogenim uvjetima omogućuje lakše praćenje i kontrolu parametara uzgoja poput temperature, koncentracije otopljenog kisika i pH vrijednosti. Mikronosači mogu biti neporozni odnosno glatki što znači da se stanice mogu prihvatiti na njihovu površinu i prerastati ju, dok je kod poroznih mikronosača rast stanica omogućen u šuplinama i porama mikronosača. Tehnika primjene mikronosača omogućuje postizanje visokih prinosa adherentnih stanica jer se zbog zakrivljenosti površine raspoložive za rast, proces može odvijati u relativno ograničenom prostoru klasičnih bioreaktora. Također, kinetika rasta stanica na mikronosačima ne razlikuje se od kinetike rasta na standardnim površinama poput stakla ili plastike pa stanice koje rastu na mikronosačima zadržavaju svoju karakterističnu morfologiju, vrijeme udvostručenja kao i ostala svojstva (Amersham Pharmacia Biotech, 2005).

Mediji za uzgoj životinjskih stanica su kompleksne smjese ugljikohidrata, aminokiselina, soli, vitamina, hormona i faktora rasta, a za *in vitro* uzgoj životinjskih stanica kroz duži vremenski period, medij se mora dopuniti različitim sastojcima (Butler, 2004). Serum životinjskog ili humanog porijekla uobičajen je dodatak za tu svrhu. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum (FBS), supernatant zaostao nakon koagulacije proteina



krvi fetusa goveda. To je složena smjesa velikog broja sastojaka - faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona itd., esencijalnih za rast i održanje stanica u kulturi koji se u medij za uzgoj dodaje u rasponu 5-20% (v/v) (van der Valk i sur., 2010). Serum je ujedno i najskuplja komponenta medija za uzgoj životinjskih stanica, a obzirom na svoj izvor postoji mogućnost prijenosa bakterija, virusa i priona kao i određenih razlika u sastavu koje ovise o seriji proizvodnje. Kako bi se prevladali nedostaci uporabe seruma, razvijaju se različite formulacije medija bez seruma tzv. *serum-free* mediji (SFM) kojima se u čistom obliku dodaju hormoni, faktori rasta i ostale komponente sadržane u serumu. Međutim, SFM su općenito specifičniji nego mediji sa serumom pa ih je stoga potrebno posebno razvijati za određene tipove stanica i primjene (Butler, 2004). Također, uzgoj stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma ili SFM mediju predstavlja značajan iskorak u smanjivanju troškova procesa s kulturama stanicama odnosno utječe na povećanje sigurnosti proizvoda dobivenih ovom tehnologijom (van der Valk i sur., 2010). S druge strane, kako bi se zadržale karakteristike rasta i proizvodnosti te morfološka svojstva tijekom uzgoja u SFM, stanice se prethodno moraju prilagoditi na rast u takvim uvjetima (npr. postupnim smanjivanjem udjela seruma) što ponekad može biti dugotrajan i ne nužno uspješan proces.

Tijekom postupka prilagodbe rasta stanica CCO u komercijalnom *UltraCulture* (UC) mediju bez seruma, metodom postupnog smanjivanja udjela seruma od 5-0% (v/v), određene su karakteristike rasta stanica CCO u UC mediju s 2% seruma. Također, korišteni su mikronosači tipa *Cytodex 1* koji sadrže matriks poprječno povezanih molekula dekstrana supstituiranog pozitivno nabijenim N,N-dietilaminoetilnim grupama te su pogodni za uzgoj većine adherentnih staničnih linija. U cilju proizvodnje biomase CCO stanica, ispitat će se njihov rast na neporoznim mikronosačima *Cytodex 1* u UC mediju s 2% seruma u sustavu *Cell spin* te usporediti s rastom stanica na mikronosačima u preporučenom DME (*Dulbecco's Modified Eagle*) mediju s 5% seruma. Tijekom uzgoja pratit će se kinetika prihvaćanja stanica na mikronosače, broj stanica te utrošak glukoze u mediju za uzgoj. Morfologija i rast CCO stanica na mikronosačima pratit će se i svjetlosnom mikroskopijom budući prozirnost mikronosača omogućuje pregledavanje prihvaćenih stanica.

2. Materijali i metode

Stanična linija CCO

Stanična linija CCO nabavljena je iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje na -80°C, a smrzavaju se u koncentraciji od 1×10^7 stanica/mL. Ampula sa stanicama se prvo odmrzne naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30°C. Nakon odmrzavanja stanica slijedi centrifugiranje 3 minute na 1000 okr/min. Supernatant se ukloni, a zaostali talog stanica se resuspendira u 10 mL preporučenog DME medija za uzgoj (Gibco, SAD) koji sadrži 5% FBS (Invitrogen, Škotska). Stanice se potom prebace u T-bocu koja se stavlja u inkubator na 30°C i u odgovarajuću atmosferu koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂. Brojnost stanica, njihovo opće stanje i morfologija se svakodnevno promatraju pod inverznim mikroskopom.

Prilagodba stanica CCO na rast u mediju bez dodatka seruma provedena je u UC mediju (Lonza, Belgija) postupnim smanjivanjem udjela FBS s 5-0% (v/v). Kada je postignut stabilan rast pri 2% FBS, tako prilagođene CCO stanice upotrebljene su kao inokulum za proizvodnju biomase na mikronosačima.

Aktivacija *Cytodex 1* mikronosača

U tikvicu s PBS puferom stave se *Cytodex 1* mikronosači (Amersham Biosciences, Švedska) u omjeru 1 g mikronosača/5 mL pufera te se ostavi stajati na sobnoj temperaturi najmanje 3 sata pri čemu mikronosači hidratiziraju i bubre. Supernatant se potom ukloni i mikronosači se uz lagano miješanje ispiru u svježem PBS puferu (30-50 mL/g mikronosača). Cijeli sadržaj tikvice se potom prebaci u *Cell-spin* sustav (Integra Biosciences, Švicarska) koji se potom sterilizira u autoklavu (121°C/15 min). Nakon sterilizacije mikronosači se istalože, ukloni se supernatant (PBS pufer) te se na mikronosače sterilno dodaje UC medij s 2% FBS ili DME medij s 5% FBS koji je preporučeni medij za uzgoj CCO stanica. Tako pripremljeni mediji s mikronosačima se preko noći ostavljaju u CO₂ inkubatoru.

Nacjepljivanje i uzgoj stanica CCO na mikronosačima *Cytodex 1* u *Cell-spin* sustavu

Za 150 mL konačnog volumena kulture, na aktivirane mikronosače (0,3 g) u *Cell-spin* sustav dodaje se 30 mL inokuluma koncentracije 4×10^5 stanica/mL. Uzgoj je proveden u dva *Cell-spin* sustava, pri čemu se u jednom pratio rast stanica u UC mediju, dok se u drugom pratio rast u DME mediju. Prihvaćanje stanica se provodi uz konstantno miješanje od 30 okr/min te se pritom određuje kinetika prihvaćanja stanica na mikronosače tako da se svakih sat vremena uzima uzorak medija i određuje broj stanica koje se još nisu prihvale u Fuchs-Rosenthalovoj komorici za brojanje uz dodatak boje tripan-plavo. Brzina prihvaćanja stanica slijedi kinetiku prvog reda te se računa po formuli:

$$C_t = C_0 x e^{-kt} [1]$$

gdje je C_t koncentracija stanica u određenoj točki vremena, C_0 je početna koncentracija stanica, a k je specifična brzina prihvaćanja.

Nakon što se 90% stanica prihvati na površinu mikronosača, ukupni se volumen kulture nadopunjuje do konačnih 150 mL. Miješanje se u reaktoru postavlja na brzinu od 50 okr/min do kraja uzgoja.

Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo

Iz svakog *Cell-spin* sustava sterilno se uzme 1 mL suspenzije mikronosača te se ostavi u epruveti kako bi se istaložili mikronosači. Nakon taloženja ukloni se supernatant, doda se 1 mL tripsina (Gibco, SAD) i ostavi se 10 min da tripsin djeluje, tj. da se stanice odvoje od mikronosača. Nakon homogenizacije 20 μL uzorka pomiješa se s 20 μL 0,4% boje tripan-plavo (Invitrogen, Škotska) te se tako pripremljen uzorak nanosi na Fuchs-Rosenthalovu komoricu za brojanje. Pod mikroskopom se određuje broj živih stanica dok se mrtve stanice zbog oštećene membrane boje plavo.

Određivanje utroška glukoze u mediju za uzgoj

Sadržaj glukoze u mediju za uzgoj određivan je kolorimetrijsko-enzimskom metodom Glukoza-PAP (Herbos, Sisak) koja se koristi i za određivanje koncentracije glukoze u krvi, plazmi, serumu i likvoru.

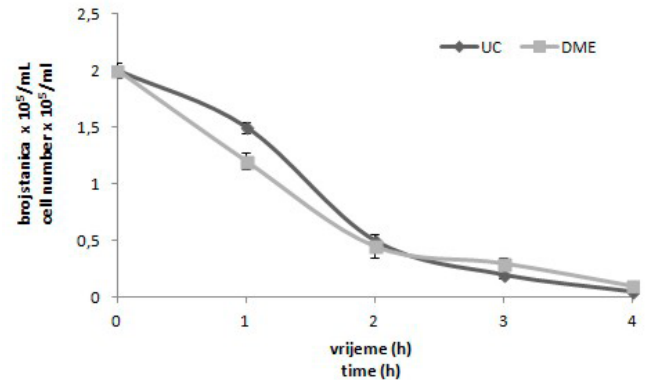
Statistička obrada rezultata

Sva mjerenja provedena su u triplicatima i prikazane vrijednosti su iskazane kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija (S.D.) Rezultati su obrađeni primjenom programa Statistica 7.1.

3. Rezultati i rasprava

Primjena mikronosača u uzgoju adherentnih stanica predstavlja značajan doprinos u strategiji i razvoju bioprocesne proizvodnje s ciljem dobivanja visokih koncentracija stanica i njihovih proizvoda postupcima koji time nalikuju suspenzijskom uzgoju. U ovom radu, s ciljem povećanja mjerila uzgoja stanica CCO, ispitani su uvjeti prihvaćanja i rasta stanica na mikronosačima *Cytodex 1* u sustavu *Cell-spin*. Najkritičniji korak procesa uzgoja stanica na mikronosačima je prihvaćanje stanica. Učinkovitost tog postupka ovisi najviše o vrsti stanične linije, a postoji cijeli niz čimbenika o kojima pritom treba voditi računa (Ng i sur., 1996). Većina njih ključna je upravo za uspostavu kontakta i zadržavanje stanica na površini mikronosača. Budući je vezanje adherentnih stanica na čvrstu površinu vrlo osjetljiv reverzibilni proces (Van der Velden-de Groot, 1995), način i brzina miješanja mogu pritom imati vrlo značajnu ulogu (Sun i sur., 2000). Prebrzo miješanje može onemogućiti uspostavu kontakta između stanice i mikronosača te tako spriječiti njihovo vezanje. Presporo miješanje dovodi pak do taloženja mikronosača što može izazvati hipoksiju kod stanica koje su u fazi prihvaćanja. Starost i fiziološko stanje staničnog inokuluma također su važni čimbenici učinkovitosti vezanja i zato se preporučuje korištenje stanica koje su u eksponencijalnoj fazi rasta. Pritom omjer broja stanica u inokulumu i broja raspoloživih mikronosača mora biti takav da svaki mikronosač bude zaposjednut s nekoliko stanica (Sun i sur., 1999). Za *Cytodex 1* mikronosače, prema uputama proizvođača, taj omjer iznosi 5:1.

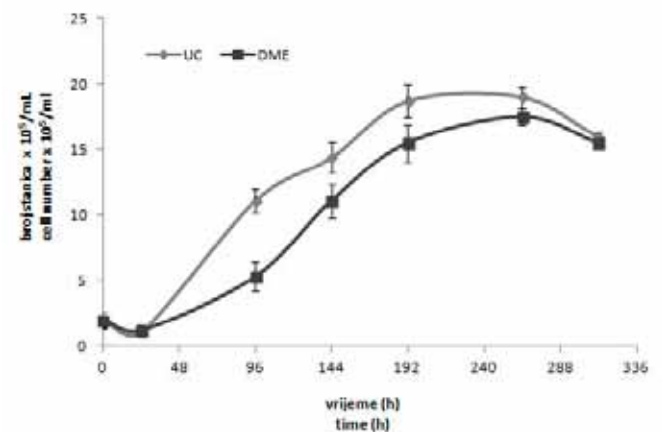
U našem istraživanju je istovremeno u dva medija za uzgoj, UC mediju s 2% FBS i DME mediju s 5% FBS, u *Cell-spin* sustavima proveden postupak prihvaćanja stanica CCO na *Cytodex 1* mikronosače. Pri tom je praćena brzina prihvaćanja stanica koja je definirana kao broj u mediju zaostalih (neprihvaćenih) stanica po jedinici vremena (Slika 1).



Slika 1. Kinetika prihvaćanja stanica CCO na *Cytodex 1* mikronosače u UC i DME mediju za uzgoj
Figure 1. CCO cell adhering kinetics on *Cytodex 1* microcarriers in UC and DME culture medium

Brzina miješanja tijekom prihvaćanja na mikronosače iznosila je 30 okr/min i odabrana je na temelju dostupnih literaturnih podataka (Sun i sur., 1999) budući su *Cytodex 1* mikronosači već duži vremenski period u širokoj primjeni u bioprocesima s kulturama životinjskih stanica. Tijekom prvog sata postupka u *Cell-spin* sustavu s UC medijem bilo je prihvaćeno 25% stanica, a u DME mediju 40% stanica. Nakon drugog sata, udio prihvaćenih stanica u oba sustava bio je približno jednak i iznosio je 75% u UC mediju odnosno 77,5% u DME mediju. U tom periodu stanice u *Cell-spin* sustavima vjerojatno su uspostavile dovoljno čvrste veze s mikronosačima da se zadrže na njihovoj površini. Konačna učinkovitost prihvaćanja nakon četiri sata u oba sustava bila je približno jednaka i iznosila je oko 98%. Brzina prihvaćanja stanica slijedi kinetiku prvog reda (Mukhopadhyay i sur., 1993) i tijekom četverosatnog postupka u oba *Cell-spin* sustava iznosila je 0,92 h⁻¹.

Nakon što se stanice prihvate na mikronosače, započinje se s njihovim uzgojem. Procesi sa staničnim kulturama na *Cytodex 1* mikronosačima najčešće se odvijaju u *spinner*-bocama ili bioreaktorima s mješalom (Amersham Pharmacia Biotech, 2005). U *Cell-spin* sustavu brzina miješanja je podešena na 50 okr/min i uzgoj je proveden tijekom 312 h odnosno 13 dana (Slika 2).



Slika 2. Usporedba rasta stanica CCO na mikronosačima *Cytodex 1* u *Cell-spin* sustavu u UC i DME mediju za uzgoj

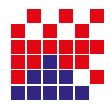


Figure 2. Comparison of CCO cell growth on Cytodex 1 microcarriers in Cell-spin bioreactor in UC and DME culture medium

Standardni raspon brzine miješanja kojom se u spinner-sustavima održava odgovarajuća suspendiranost mikronosača s istovremeno zadovoljavajućom brzinom prijenosa kisika i ne pretjerano invazivnim hidrodinamičkim stresom iznosi 50-60 okr/min (Kong i sur., 1998). Na temelju dobivenih krivulja rasta stanica CCO na mikronosačima u Cell-spin sustavima izračunati su specifična brzina rasta, vrijeme udvostručenja te prinos stanica (Tablica 1).

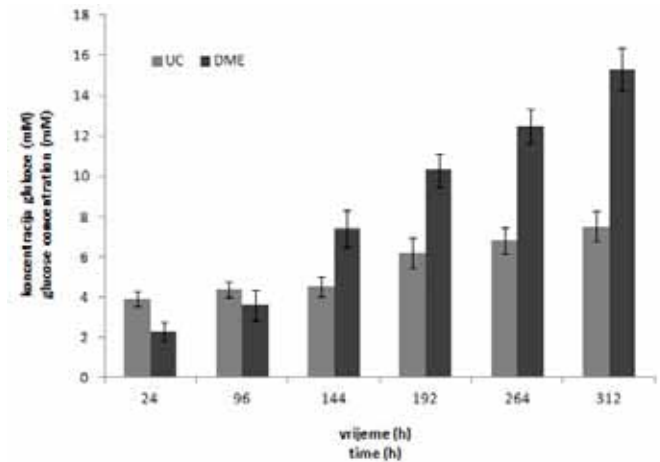
Iz dobivenih rezultata može se uočiti da je u UC mediju ostvaren prinos stanica od $17,0 \pm 0,8 \times 10^5$ st/mL u odnosu na prinos stanica od $15,5 \pm 0,6 \times 10^5$ st/mL u DME mediju. Također, u UC mediju je postignuta nešto veća specifična brzina rasta ($0,0214 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$) u odnosu na DME medij ($0,018 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$). Dobiveni rezultati su u korelaciji s podacima o karakteristikama rasta CCO stanica tijekom proizvodnji CCV virusa na Cytodex mikronosačima (Colyer i Boyle, 1985) kada je ostvarena maksimalna koncentracija stanica od 14×10^5 st/mL tijekom 13 dana uzgoja u dinamičkim uvjetima kao i s prethodnim istraživanjima uzgoja različitih staničnih linija riba na mikronosačima u statičkim i dinamičkim uvjetima koja su pokazala da mikronosači predstavljaju dobre supstrate za rast staničnih linija riba i proizvodnju virusa (Nicholson, 1980). Uzgoj u UC mediju s 2% FBS nije imao utjecaj na prihvaćanje i rast CCO stanica na mikronosačima za razliku od rasta Vero stanične linije na Cytodex 1 mikronosačima kada je smanjenje koncentracije seruma utjecalo na konačnu koncentraciju stanica (Souza i sur., 2005).

Tablica 1. Parametri rasta stanica CCO na mikronosačima u UC i DME mediju za uzgoj

Table 1. Parameters of CCO cells growth on microcarriers in UC and DME medium

Medij / Medium	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d \text{ (h)}$	Prinos $\times 10^5 \text{ (st/mL)}$ Yield $\times 10^5 \text{ (cells/mL)}$
UC	$0,0214 \pm 0,008$	$32,4 \pm 1,3$	$17,0 \pm 0,8$
DME	$0,0185 \pm 0,005$	$37,5 \pm 0,95$	$15,5 \pm 0,6$

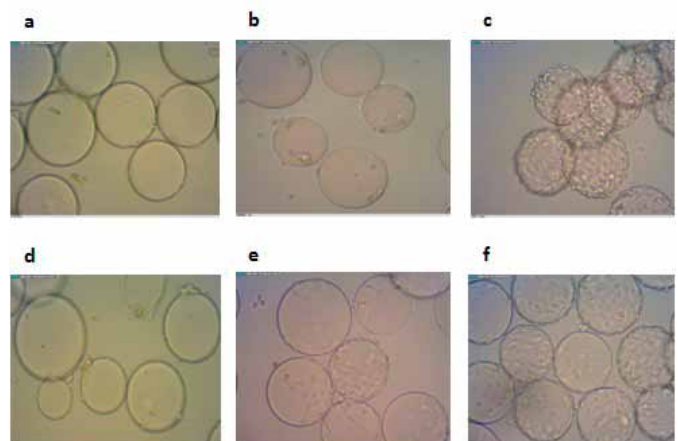
Analiza utroška glukoze u oba medija za uzgoj (Slika 3) pokazala je da je utrošak glukoze tijekom 312 h uzgoja u DME mediju stalno rastao i na kraju uzgoja iznosio je 15,3 mM glukoze, dok je u UC mediju ukupno utrošeno 7,5 mM glukoze. Nakon 312 h uzgoja u oba medija, glukoza nije bila u potpunosti utrošena za rast stanica. To je u korelaciji s našim prethodno objavljenim rezultatima učinka glukoze na metabolizam CCO stanica (Slivac i sur., 2008) kada je utvrđeno da glukoza ne predstavlja limitirajući faktor rasta ukoliko su u mediju za uzgoj prisutni glutamin i druge aminokiseline. Potrošnja glukoze nakon 144. sata uzgoja u UC mediju bila je relativno konstantna što ukazuje da CCO stanice za rast najvjerojatnije troše ostale sastojke medija, čiji sastav nije javno dostupan i predstavlja proizvođačku tajnu.



Slika 3. Utrošak glukoze u UC i DME mediju tijekom uzgoja na mikronosačima Cytodex 1 u Cell-spin sustavu

Figure 3. Glucose consumption in UC and DME culture medium during CCO cell growth on Cytodex 1 microcarriers in Cell-spin bioreactors

Razvoj staničnog monosloja na mikronosačima i konfluentnost tijekom uzgoja u UC i DMEM mediju redovito su praćeni pod inverznim mikroskopom (Slike 4 a-f).



Slika 4. Svjetlosna mikroskopija CCO stanica na Cytodex 1 mikronosačima u UC mediju a) 4 sata nakon nacjepljivanja, b) 48 sati nakon nacjepljivanja i c) nakon 144 h uzgoja te u DME mediju d) 4 sata nakon nacjepljivanja stanica, e) 48 sati nakon nacjepljivanja stanica i f) nakon 192 sata uzgoja u Cell-spin bioreктору (povećanje 400x).

Figure 4. Light microscopy of CCO cells grown on Cytodex 1 microcarriers in UC medium a) 4 h post-inoculation, b) 48 h post-inoculation and c) after 144 h of cultivation and in DME medium d) 4 h post-inoculation, e) 48 h post-inoculation and f) after 192 h of cultivation in Cell-spin bioreactor (magnification 400x).

Na prikazanim fotografijama može se uočiti kako se s vremenom trajanja uzgoja površina nosača prekriva stanicama, da bi u 192. satu uzgoja površina mikronosača u oba medija bila skoro u potpunosti prekrivena, a što korelira i s najvišom postignutom koncentracijom CCO stanica u oba sustava.

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da *Cytodex 1* mikronosači načinjeni od dekstrana predstavljaju pogodan supstrat za rast adherentnih CCO stanica. Prihvaćanje stanica na mikronosače odvijalo se u prvih 4 sata inokulacije, a tijekom uzgoja od 312 h stanice su rasle prihvaćene na mikronosačima tvoreći uniforman i potpun monosloj. Na temelju izračunatih parametara rasta i morfoloških karakteristika stanica CCO tijekom uzgoja na *Cytodex 1* mikronosačima u *Cell-spin* sustavu može se zaključiti da UC medij predstavlja dobar odabir u slučaju kad je potrebno vršiti uzgoj stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma jer se postiže veći prinos i specifična brzina rasta CCO stanica nego u preporučenom DME mediju za uzgoj.

Zahvala

Zahvaljujemo Ministarstvu znanosti, tehnologije i sporta RH na financiranju ovog istraživanja kroz projekt 058-0582184-2414.

Literatura

- Amersham Pharmacia Biotech (2005) Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods. GE Healthcare, Uppsala, Sweden.
- Bowser P.R., Plumb J.A. (1980) Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In Vitro*, 16, 365-368.
- Butler M. (2004) Animal Cell Culture and Technology. Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York, USA.
- Colyer T.E., Boyle J.A. (1985) Optimization of conditions for production of channel catfish ovary cells and channel catfish virus DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1025-1028.
- Fent K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 12, 477-488.
- Kadouri A. (1994) Cultivation of anchorage-dependent mammalian cells and production of various metabolites. *Colloid Surface B-Biointerfaces*, 2, 265-272.
- Kong D., Gentz R., Zhang J. (1998) Long-term stable production of monocyte-colony inhibition factor (M-CIF) from CHO microcarrier perfusion cultures. *Cytotechnology*, 26, 131-138.
- Ng Y.C., Berry J.M., Butler M. (1996) Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on porous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 627-635.
- Mukhopadhyay A., Mukhopadhyay S.N., Talwar G.P. (1993) Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of Vero cells to Cytodex microcarriers. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56, 369-374.
- Nicholson B.L. (1980) Growth of fish cell lines on microcarriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 394-397.
- Radošević K., Tonković T., Slivac I., Kniewald Z., Gaurina Srček V. (2011) Comparison of cytotoxicity induced by 17 α -ethynylestradiol and diethylstilbestrol in fish CCO and mammalian CHO-K1 cell lines. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 252-257.
- Radošević K., Cvjetko M., Kopjar N., Novak R., Dumić J., Gaurina Srček V. (2013) *In vitro* cytotoxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Biological effects in fish Channel Catfish Ovary (CCO) cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 112-118.
- Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K., Porobić I., Bilić K., Fumić K., Kniewald Z. (2008) Growth characteristics of Channel Catfish Ovary cells-influence of glucose and glutamine. *Cytotechnology* 57, 273-278.
- Souza M.C, Freire M.S, Castilho L.R. (2005) Influence of culture conditions on Vero cell propagation on non-porous microcarriers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 71-77.
- Sun X., Tan W., Zhang Y., Hua P., Zhou Y. (1999) Effect of the seeding density on the growth of Vero cells on microcarrier. *Journal of East China University of Science and Technology*, 25, 367-370.
- Sun X., Zhang Y., Zhou Y., Hua P. (2000) Attachment kinetics of Vero cells onto CT-microcarriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 32-36.
- Tan F., Wang M., Wang W., Lu Y. (2008) Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four metals *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 22, 164-170.
- van der Velden-de Groot C.A.M. (1995) Microcarrier technology, present status and perspective. *Cytotechnology*, 18, 51-56.
- van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Fex Sverningsson Å., Gstraunhaler G., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M.L. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*, 24, 1053-1063.