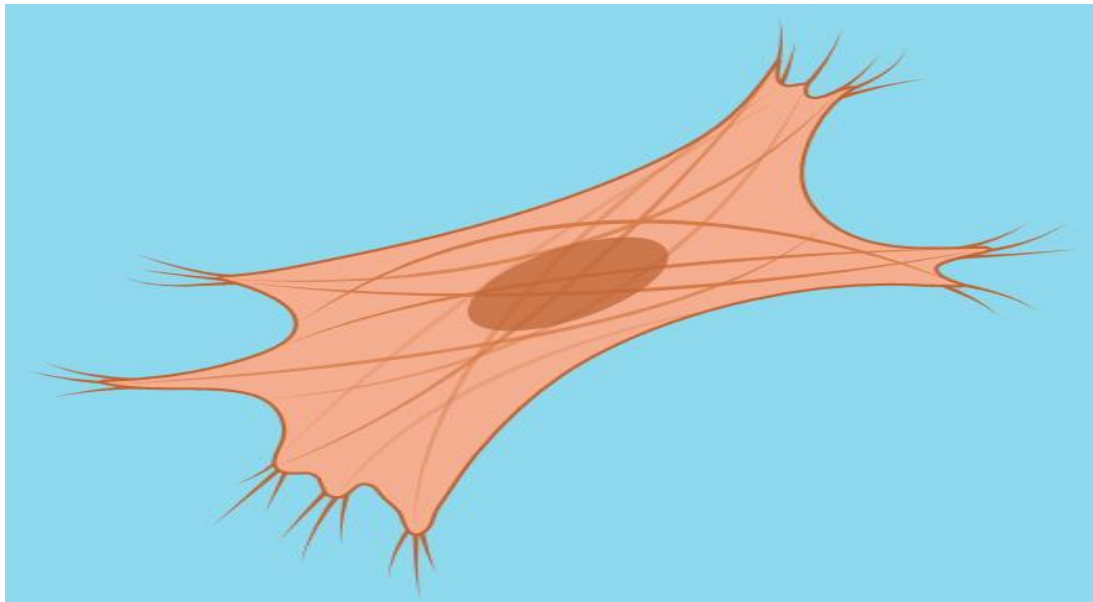




Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

«Βλαστικά κύτταρα στην δημιουργία τεχνητού κρέατος»



Χουλιάρας Δημήτρης

Επιβλέπων καθηγητής: **Τσάμης Κωνσταντίνος** επίκουρος καθηγητής
φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Ιωάννινων

Επιτροπή :**Βεζυράκη Πάτρωνά** καθηγήτρια φυσιολογίας

Ιατρικής Σχολής Ιωάννινων

Πέσχος Δημήτριος καθηγητης φυσιολογίας

Ιατρικής Σχολής Ιωάννινων

Περιεχόμενα

Πίνακας εικόνων.....	4
Εισαγωγή.....	5
Κεφάλαιο 1: Τεχνητό κρέας.....	7
1.1 Ορισμός.....	7
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	11
1.3 Ανάγκη για εναλλακτική πηγή κρέατος.....	14
1.4 πλεονεκτήματα μειονεκτήματα	22
Κεφάλαιο 2: Παραγωγή τεχνητού κρέατος.....	24
2.1 Είδη κυττάρων.....	25
2.1.1 Μυϊκά βλαστικά κύτταρα (Myosatellite Cells).....	26
2.1.2 ECM.....	29
2.1.3 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC's).....	31
2.1.4 Αποδιαφοροποιημένα κύτταρα (Dedifferentiated Cells).....	34
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας.....	37
2.2.1 Μέσο καλλιέργειας.....	38
2.2.2 Ορός.....	40
2.2.3 Αυξητικοί παράγοντες.....	40
2.2.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια.....	42
2.3 Τεχνικές καλλιέργειας.....	43
2.3.1 Τεχνική αυτοοργάνωσης (Self-Organising Technique).....	49

2.3.2 Ικρίωμα (Scaffold).....	50
2.3.3 Βιοαντιδραστήρες (Bioreactors).....	51
2.3.4 Διέγερση των κυττάρων (Stimulation of cells).....	52
2.3.5 3D εκτύπωση οργάνων ή βιοεκτύπωση/ 3D Bioprinting.....	53
Κεφάλαιο 3: Εξέλιξη στην παραγωγή τεχνητού κρέατος.....	54
3.1 Κοινωνικές και οικονομικές πτυχές των συστημάτων παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια.....	54

3

3.2 Τεχνικές προσεγγίσεις για την παραγωγή κρέατος με καλλιέργεια.....	57
3.3 Νομοθεσία.....	61
3.4 Ηθική.....	63
3.5 Μελλοντικές προσεγγίσεις.....	64
Συμπεράσματα.....	65
Βιβλιογραφία.....	71

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ταξινόμηση του τεχνητού κρέατος

Εικόνα 2: Μπιφτέκι εργαστηριακής καλλιέργειας που δημιουργήθηκε από τον Mark Post στο Πανεπιστήμιο του Μάαστριχτ.

Εικόνα 3: Διαδικασία παραγωγής καλλιεργημένου κρέατος.

Εικόνα 4: Ροή εργασίας της καλλιέργειας μυϊκών κυττάρων με τη χρήση τεχνικής ικριώματος.

Εικόνα 5: Βλαστικά κύτταρα.

Εικόνα 6: Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.

Εικόνα 7: Η τεχνική Scaffolding.

Εικόνα 8: Μονοπάτι μυογενετικής διαφοροποίησης δορυφορικών κυττάρων μυών με δείκτες έκφρασης.

Εικόνα 9: Βαθμός κοινωνικής-θεσμικής και τεχνολογικής αλλαγής που απαιτείται για εναλλακτικές λύσεις κρέατος.

Εισαγωγή

Ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, πράγμα που σημαίνει ότι απαιτείται πιο σταθερή προσφορά πρωτεϊνών για να καλυφθούν οι διατροφικές ανάγκες. Παρά τη διαθεσιμότητα εναλλακτικών πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης, το ζωικό κρέας παραμένει μια δημοφιλής, υψηλής ποιότητας πηγή πρωτεΐνης. Οι ερευνητικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο τεχνητό κρέας, κρέας που καλλιεργείται *in vitro*, ως μια ασφαλή και πιο αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι του παραδοσιακού κρέατος.

Εκτός από τη μείωση των αναγκών σε ζώα, η υιοθέτηση του τεχνητού κρέατος έχει τεράστια περιβαλλοντικά οφέλη. Το τεχνητό κρέας παράγεται με *in vitro* μυογένεση, η οποία περιλαμβάνει την επεξεργασία μυϊκών δορυφόρων και ώριμων μυϊκών κυττάρων.

Τα τελευταία χρόνια έχουν επινοηθεί τεχνικές όπως η απομόνωση βλαστικών κυττάρων, η *ex vivo* κυτταροκαλλιέργεια και η μηχανική ιστών που επιτρέπουν τη δημιουργία MSCs και μεσεγχυματικών ιστών. Για παράδειγμα, διερευνώνται βιο-τεχνητοί μύες που προέρχονται από MSCs ως πιθανά χειρουργικά εμφυτεύματα. Επιπλέον, οι μύες που παράγονται από καλλιέργεια MSC θεωρούνται εξαιρετική πηγή ζωικής πρωτεΐνης. Τα δομικά μυϊκά κύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή κρέατος *in vitro*. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, μυοβλάστες και MSC έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τεχνητού κρέατος.

Η μυϊκή ανάπτυξη ξεκινά *in vivo* κατά την πρώιμη εμβρυογένεση με τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό μονοπύρηνων μυοβλαστών, οι οποίοι στη συνέχεια συντήκονται και διαιρούνται σε μη πολλαπλασιαζόμενες πολypύρηνες μυοΐνες ή μυϊκές ίνες. Τα MSCs είναι τα μεταγεννητικά αντίστοιχα των εμβρυϊκών μυοβλαστών, πολλαπλασιάζονται και διαιρούνται για να σχηματίσουν νέες μυϊκές ίνες αφού ενεργοποιηθούν από μυογενετικούς παράγοντες.

Διάφοροι τύποι κυττάρων έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητά τους να ξεκινούν την παραγωγή καλλιεργούμενου κρέατος και τα MSCs έχουν αναδειχθεί ως τα πιο υποσχόμενα από αυτά. Τα MSCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μυϊκή

αναγέννηση μετά από τραυματισμό, επειδή διαφοροποιούνται αποτελεσματικά σε μυοσωλήνες, οι οποίοι στη συνέχεια μετατρέπονται σε μυϊκές ίνες.

Μόλις τα MSC πολλαπλασιαστούν *in vitro* στη βέλτιστη ποσότητα για την επεξεργασία καλλιεργούμενου κρέατος, πρέπει να διαφοροποιηθούν σε πολυπύρηνες, μεταμιτωτικές μυϊκές ίνες μέσω κυτταρικής σύντηξης. Η μετάβαση των MSCs σε μέσο διαφοροποίησης ξεκινά το πρώτο στάδιο διαφοροποίησης σε μυοσωλήνες *in vitro*, το οποίο διαρκεί περίπου 3 έως 5 ημέρες.

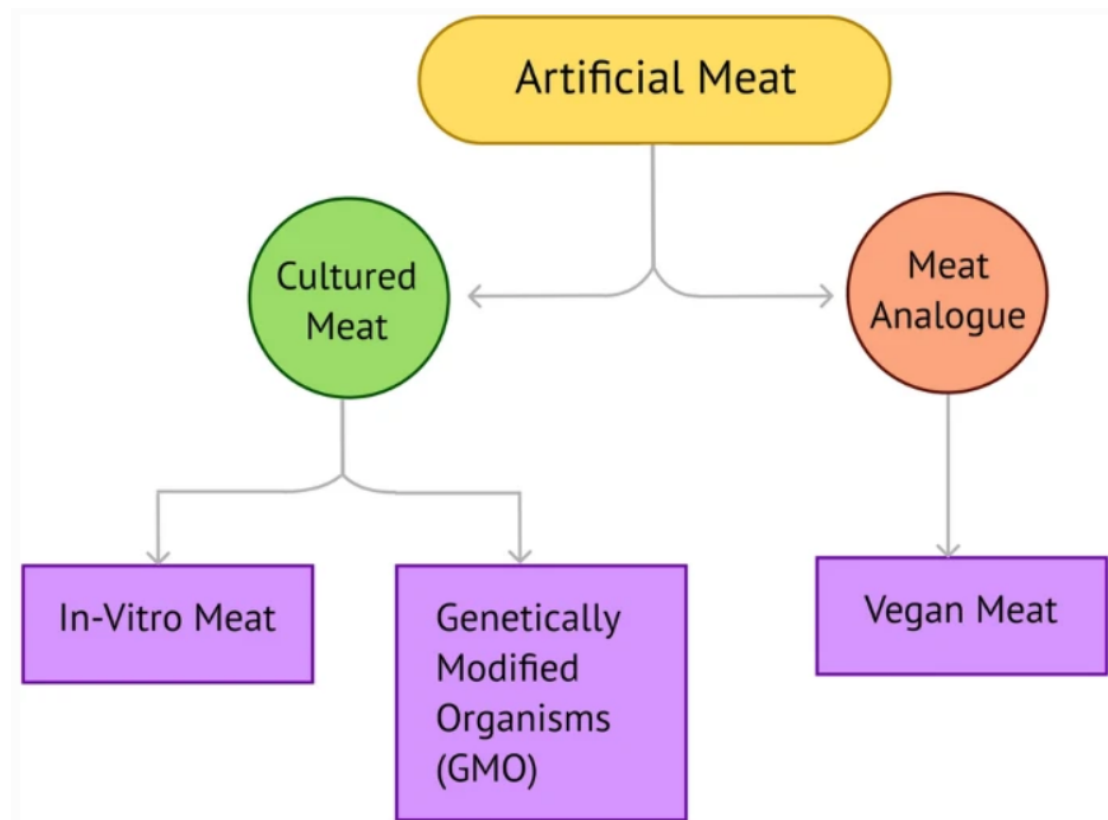
Η αποτελεσματικότητα της καλλιέργειας κρέατος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας, όπως ο τύπος κυττάρων και το μέσο καλλιέργειας κυττάρων που χρησιμοποιείται και η βιομοριακή σύνθεση.

Η παραγωγή πρωτεϊνών μπορεί να ενισχυθεί με την παροχή των βέλτιστων βιοχημικών και φυσικών συνθηκών για την ανάπτυξη των σκελετικών μυϊκών κυττάρων, ενώ οι μυοβλάστες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την ανάπτυξη των σκελετικών μυών. Η παρούσα εργασία περιγράφει τους τύπους κυττάρων που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία τεχνητού κρέατος και πιο συγκεκριμένα διερευνά την χρήση των βλαστικών κυττάρων.

Κεφάλαιο 1: Τεχνητό κρέας

1.1 Ορισμός

Το τεχνητό κρέας είναι ένας ευρύς όρος που περιλαμβάνει τρεις κύριους τύπους υποκατάστατων: εναλλακτικά κρέατα που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα και μύκητες, καλλιεργημένο κρέας (ή εργαστηριακά παραγόμενο ή συνθετικό κρέας) που παράγεται *in vitro* μέσω μηχανικής ιστών ή που προέρχεται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και κλωνοποιημένα ζώα μέσω γενετικής μηχανικής (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση του τεχνητού κρέατος (Mateti, Laha & Shenoy, 2022).

Έχουν αποδοθεί διάφορες ονομασίες για το είδος αυτός κρέατος. Αρχικά ονομαζόταν «εργαστηριακό κρέας (*in vitro* meat)» και στη συνέχεια προτιμήθηκε ο όρος «καλλιεργημένο κρέας (*cultured* meat)». Άλλες ονομασίες περιλαμβάνουν τους όρους «καθαρό (*clean* meat)», «συνθετικό (*synthetic* meat)» και «τεχνητό (*artificial*

meat)», ενώ υπάρχουν και ονομασίες όπως «συνθετικές μυϊκές πρωτεΐνες (artificial muscle proteins)» που αποκλείουν τον όρο κρέας, θεωρώντας ως κρέας το προϊόν που θα πρέπει να έχει δημιουργηθεί εντός ενός ζώου . Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι όροι αυτοί είναι διαφορετικοί από τον όρο «υποκατάστατο κρέατος (simulated meat)», ο οποίος παραπέμπει στα φυτικής προέλευσης υποκατάστατα που απευθύνονται κυρίως σε χορτοφάγους.

Τα υποκατάστατα κρέατος με βάση τη ζύμωση (vegan meat) χρησιμοποιούν μη ζωικές πρωτεΐνες που προέρχονται από φυτά και μύκητες (Kumar et al., 2016). Για παράδειγμα, τα γεύματα σόγιας προσφέρουν υψηλό θρεπτικό περιεχόμενο, υφή και γεύση παρόμοια με το κανονικό κρέας. Το Quorn (που παρασκευάζεται από πρωτεΐνες μυκήτων) προσφέρει μπιφτέκια, μπιριζόλες και εναλλακτικές λύσεις κρέατος σε φέτες χωρίς χοληστερόλη και με χαμηλά κορεσμένα λιπαρά (Joshi & Kumar, 2015).

Η μηχανική ιστών επιτρέπει την *in vitro* παραγωγή με τη σπορά ενός ικριώματος με λίγα μυοκύτταρα, δηλαδή μυϊκά κύτταρα, και τον πολλαπλασιασμό τους μέσω κυτταροκαλλιέργειας.

Οποιαδήποτε πηγή κυττάρων μπορεί να δημιουργήσει προϊόντα (Stephens et al., 2018):

- Τα πρωτογενή κύτταρα που απομονώνονται από τον αρχικό ιστό ή οι κυτταρικές σειρές πολλαπλασιάζονται με επαγωγή, είτε με αυθόρμητες μεταλλάξεις κατά τις οποίες το κύτταρο επιδεικνύει αθανασία.
- Πρωτογενή κύτταρα που απομονώνονται από εγγενή ιστό.

Το καλλιεργημένο κρέας είναι κρέας για κατανάλωση που παράγεται με έναν πιο βιώσιμο τρόπο. Περιλαμβάνει τη συγκομιδή και την επέκταση των κυττάρων, τη διαφοροποίηση σε μυοσωλήνες, την κατασκευή σε μυϊκές ίνες και τη δόμηση του κρέατος.

Το καλλιεργημένο κρέας είναι η παραγωγή για κατανάλωση από ζωικά κύτταρα, η οποία βασίζεται στον μηχανισμό ανάπτυξης και επιδιόρθωσης του ζωικού μυϊκού ιστού. Ήδη από το 1932, ο Βρετανός πρωθυπουργός Τσώρτσιλ προέβλεψε ότι στο μέλλον θα μπορούσαν να παραχθούν στήθη ή φτερά κοτόπουλου μέσω

καλλιέργειας ιστών χωρίς την εκτροφή κοτόπουλων. Το 2013, κατασκευάστηκε το πρώτο πρωτότυπο καλλιεργημένου κρέατος, ένα μπιφτέκι από βοδινό κρέας (Εικόνα 2). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές επιστημονικές προκλήσεις για την παραγωγή και την εμπορική αξιοποίηση του καλλιεργημένου κρέατος, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής κυττάρων, της βελτιστοποίησης του μέσου, των βιοαντιδραστήρων και των βιοϋλικών (Zhu et al., 2022).



Εικόνα 2: Μπιφτέκι εργαστηριακής καλλιέργειας που δημιουργήθηκε από τον Mark Post στο Πανεπιστήμιο του Μάαστριχτ. Πηγή: PA IMAGES/ALAMY STOCK PHOTO.

Εκτός από τις λειτουργίες της επιδιόρθωσης κατεστραμμένου μυϊκού ιστού και της διατήρησης της δεξαμενής μυϊκών βλαστικών κυττάρων, τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα μπορούν να ενισχυθούν *in vitro* μετά την απομόνωση και μπορούν στη συνέχεια να διαφοροποιηθούν σε πολυπύρρηνα μυϊκά κύτταρα και να εκφράσουν την ειδική για τους μύς βαριά αλυσίδα μυοσίνης.

Με ειδικούς δείκτες μυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως NCAM, PAX7, εκτιμάται ότι τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα (δορυφορικά κύτταρα) αντιπροσωπεύουν το 30-35% του συνόλου των πυρήνων των μυοϊνών στο νεογνικό στάδιο, αλλά μειώνονται στο 2-7% στην ενήλικη ζωή. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ληφθεί κυρίως σε μυϊκό ιστό ανθρώπων και ποντικών και το ανώτατο όριο των μυϊκών βλαστικών κυττάρων που μπορούν να απομονωθούν από 1 g μυϊκού ιστού ζώων είναι ακόμη ασαφές (Fu, Wang & Hu, 2015).

Η παραγωγή καλλιεργούμενου κρέατος απαιτεί τη μαζική παραγωγή λειτουργικών βλαστικών κυττάρων του ζωικού κεφαλαίου *in vitro*, πράγμα που σημαίνει ότι τα κύτταρα δεν είναι μόνο ικανά να πολλαπλασιάζονται, αλλά μπορούν επίσης να διαφοροποιούνται σε μυοσώληνες για να σχηματίζουν μυϊκό ιστό. Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια για το καλλιεργούμενο κρέας είναι η διατήρηση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων των μυών των ζώων κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας καλλιέργειας .

Τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα χοίρων εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού μυοσώληνων και αναγέννησης μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια. Τα μέσα που περιείχαν EGF, δεξαμεθαζόνη και έναν αναστολέα p38 μπόρεσαν να διατηρήσουν τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα χοίρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας *in vitro* για τρία περάσματα. Η αναστολή της σηματοδότησης της p38-MAPK καθυστερεί την απώλεια της βλαστικότητας για τα δορυφορικά κύτταρα βοοειδών, η οποία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην επέκταση κυττάρων μεγάλης κλίμακας για την καλλιέργεια κρέατος.

Ωστόσο, ο αναστολέας της p38, ένα μικρό χημικό μόριο, δεν είναι κατάλληλος για την παραγωγή τροφίμων. Έχουν προταθεί διάφοροι άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη λειτουργική απώλεια των μυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως η ακαμψία του υποστρώματος και το οξειδωτικό στρες (L'honore et al., 2018). Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ένα ασφαλές για τρόφιμα συμπλήρωμα καλλιέργειας που να διατηρεί τη λειτουργία των μυϊκών βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης επέκτασης.

Το καλλιεργημένο κρέας απαιτεί επίσης τη μαζική παραγωγή τεχνητού μυϊκού ιστού *in vitro*. Ωστόσο, στις περισσότερες προσεγγίσεις, ο τεχνητός σκελετικός μυϊκός ιστός παραμένει σχετικά μικρός και λεπτός, γεγονός που επιτρέπει την παροχή θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των αποβλήτων (Gilbert-Honick & Grayson, 2020).

Η εφαρμογή της τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης έχει τη δυνατότητα παραγωγής μυϊκού ιστού σε μεγάλη κλίμακα. Ωστόσο, η τεχνολογία τρισδιάστατης εκτύπωσης εξαρτάται από τον χρόνο και τον εξοπλισμό. Η ευθυγράμμιση των

κυττάρων είναι αρκετά σημαντική για τη μηχανική ιστών σκελετικών μυών, η οποία μπορεί να προκληθεί από την τοπογραφία. Η ευθυγράμμιση των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική επιμήκυνση και τη βελτιωμένη συστολή της ακτομυοσίνης και τελικά τη βελτιωμένη διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Handral et al., 2020).

1.2 Ιστορική αναδρομή

Η διαδικασία παραγωγής του κρέατος κυτταροκαλλιέργειας περιλαμβάνει βασική και εφαρμοσμένη κυτταρική καλλιέργεια και μηχανική ιστών, που εφαρμόστηκαν αρχικά στην αναγεννητική ιατρική. Ωστόσο χρειάστηκε να περάσουν αρκετά χρόνια και να εξελιχθούν οι τεχνικές κυτταρικής καλλιέργειας, καθώς και οι γνώσεις περί βιολογίας και βλαστοκυττάρων, μέχρι να αρχίσουν οι πρώτες προσπάθειες για την καλλιέργεια κρέατος.

Αν και η πρώτη πατέντα για ένα σύστημα παραγωγής κρέατος *in vitro* από βλαστοκύτταρα καταχωρήθηκε το 1999, από τον πρωτοπόρο στον τομέα αυτόν Ολλανδό ερευνητή Willem van Eelen, η πρώτη παρουσίαση κρέατος κυτταροκαλλιέργειας έγινε από τον Mark Post το 2013.

Χρειάστηκαν 3 μήνες για την παραγωγή 10.000 μυϊκών ινών κρέατος κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες προήλθαν από δορυφορικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τον ώμο μίας αγελάδας (Post, 2014). Το μπιφτέκι που παρασκευάστηκε με κόστος 330.000 δολάρια, μαγειρεύτηκε και δοκιμάστηκε σε ζωντανή μετάδοση από στούντιο του Λονδίνου και βρέθηκε ότι ήταν «περίπου» σαν ένα συμβατικό.

Όπως προαναφέρθηκε, η έννοια του τεχνητού κρέατος για ανθρώπινη κατανάλωση γράφτηκε από τον Τσώρτσιλ πριν από 100 χρόνια και το 1932 δημοσιεύτηκε στο βιβλίο «Σκέψεις και περιπέτειες». Ωστόσο, είχε προβλεφθεί πολύ καιρό πριν από έναν συγγραφέα και συντηρητικό πολιτικό, τον Frederick Edwin Smith, ο οποίος προέβλεψε ότι «Δεν θα είναι πλέον απαραίτητο να φτάνουμε στην εξωφρενική εκτροπή ενός μοσχαριού για να τρώμε το κρέας του ως μπιριζόλα. Από μία «γονική» μπιριζόλα εξαιρετικής τρυφερότητας θα είναι δυνατόν να αναπτυχθεί όσο μεγαλύτερη και πιο ζουμερή μπιριζόλα μπορεί να είναι επιθυμητή».

Ο Willem Van Eelen από την Ολλανδία είχε ανεξάρτητα την ιδέα να χρησιμοποιήσει την καλλιέργεια ιστών για την παραγωγή κρέατος in vitro στις αρχές του 1950 και η ιδέα του ήταν να ξεκινήσει η νέα τεχνολογία παραγωγής κρέατος από βλαστικά κύτταρα. Χρειάστηκε να περάσει το 1999 για να υλοποιηθεί η θεωρητική ιδέα του van Eelen ως ιδέα των βλαστικών κυττάρων και της καλλιέργειας κυττάρων in vitro.

Συγκέντρωσε βιοψίες μυών από βατράχια και κράτησε τους ιστούς αυτούς ζωντανούς και να αναπτύσσονται σε τρυβλία καλλιέργειας και να εισαγάγει το νέο σύστημα καλλιέργειας βιολογικών ιστών. Καλλιεργήθηκε μυϊκός ιστός από τον κοινό χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) σε τρυβλία Petri χρησιμοποιώντας ειδικά μέσα και με στόχο τη διερεύνηση των δυνατοτήτων καλλιέργειας ζωικών μυϊκών πρωτεϊνών για μακροχρόνιες διαστημικές πτήσεις. Δοκιμαστικό πλαίσιο έκρινε αυτά τα επεξεργασμένα έκφυτα και συμφώνησε ότι το προϊόν ήταν αποδεκτό ως τρόφιμο.

Το 2008 στο πρώτο in vitro συμπόσιο κρέατος που πραγματοποιήθηκε στη Νορβηγία είχε προβλεφθεί ότι τα πρώτα εμπορικά in vitro προϊόντα κρέατος θα είναι διαθέσιμα στα επόμενα 5 έως 10 χρόνια σε τιμές ανταγωνιστικές με το ευρωπαϊκό βοδινό κρέας (~5.200-\$5.500 ανά τόνο ή 3.300 έως 3.500 ευρώ) χρήση σε υψηλής απόδοσης βιοαντιδραστήρα.

Τον Αύγουστο του 2013 στο Λονδίνο ο καθηγητής Mark Post του Πανεπιστημίου του Μάαστριχτ παρουσίασε το πρώτο στον κόσμο μπιφτέκι από καλλιεργημένο βοδινό κρέας που παρασκευάζεται από βοοειδή βλαστικά κύτταρα. Το μπιφτέκι ήταν ένα μπιφτέκι πέντε ουγγιών που παράγεται με τη χρήση εργαστηριακά καλλιεργημένου μοσχαρίσιου κρέατος αξίας άνω των 330.000 δολαρίων. Χρειάστηκαν μόνο τρεις μήνες για να αναπτυχθεί το μοσχαρίσιο κρέας στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας βλαστικά κύτταρα που συλλέχθηκαν από τον ώμο μιας αγελάδας. Μάλιστα είχε αναφέρει ότι σύμφωνα με τη δουλειά του θα περίμενε να δει καλλιεργημένο κρέατα σε κάθε σούπερ μάρκετ σε 10 έως 20 χρόνια με το κόστος παραγωγής του μπιφτεκιού να είναι 1\$.

Στον απόηχο της κατακόρυφης πτώσης της νομιμότητας της εργοστασιακής κτηνοτροφίας, το τεχνητό κρέας μπορεί κάλλιστα να είναι μια εφικτή επιλογή τόσο για την ηθική όσο και για την ρεαλιστική αποστράτευση της βιομηχανίας εργοστασιακής εκτροφής. Έγινε αποδεκτή από ακτιβιστές των ζώων και τους ειδικούς του κρέατος ως «κρέας χωρίς θύματα», το in vitro κρέας παρακάμπτει τις ηθικές επιπτώσεις της τυπικής παραγωγής κρέατος, αποφεύγοντας εντελώς το θάνατο των ζώων, αφαιρώντας

συνήθως κύτταρα από το ζώο-δότη μέσω βιοψίας και την καλλιέργεια κυττάρων σε μέσο που περιέχει εκχύλισμα μανιταριών αντί για ορό αίματος ζώων.

Μέσω διάφορων επενδυτικών προγραμμάτων και με τη βοήθεια εταιριών διαχείρισης επενδύσεων, όπως η IndieBio, με έδρα το Σαν Φραντζίσκο, δημιουργήθηκαν και εξελίχτηκαν οι πρώτες εταιρίες του χώρου, όπως η «MEMPHIS MEATS», η «CLARA FOODS», η «FINLESS FOODS» και η «NEW AGE MEATS». Η έρευνα πλέον στο χώρο της τεχνολογίας για την παραγωγή κρέατος κυτταροκαλλιέργειας γίνεται κυρίως στις εταιρίες που έχουν δημιουργηθεί για το σκοπό αυτό, η κάθε μία αναπτύσσει το δικό της τρόπο παραγωγής, χωρίς να δημοσιεύονται ακριβή στοιχεία εκ μέρους τους, κάποιες έχουν παρουσιάσει κάποια πρωτότυπα προϊόντα, ωστόσο καμία ακόμα δεν έχει καταφέρει να παρουσιάσει ένα μοντέλο για παραγωγή μεγάλης κλίμακας που να είναι οικονομικά και εμπορικά βιώσιμο.

Άλλες σημαντικές εταιρίες που δραστηριοποιούνται σήμερα στο χώρο είναι οι Αμερικανικές «EAT JUST» και «MODERN MEADOW», που εκτός από κρέας ερευνά και την παραγωγή δέρματος κυτταροκαλλιέργειας και οι Ισραηλινές «ALEPH FARMS», «SUPER MEAT», «MEAT THE FUTURE» και «FUTURE MEAT TECHNOLOGIES».

Από το 2013, όταν παρασκευάστηκε το πρώτο καλλιεργημένο μοσχαρίσιο χάμπουργκερ, δεκάδες εταιρείες έχουν εισέλθει στον τομέα του καλλιεργημένου κρέατος και αναπτύσσονται πλέον διάφορα είδη προϊόντων, όπως κοτόπουλο, βοδινό, χοιρινό και θαλασσινά. Μέχρι το τέλος του 2020, είχαν ιδρυθεί παγκοσμίως περίπου 60 εταιρείες αρχικών σταδίων που επικεντρώνονταν στα τελικά προϊόντα καλλιεργημένου κρέατος και στις πρώτες ύλες σε όλη την αλυσίδα αξίας, με περισσότερες από τις μισές από αυτές να έχουν ξεκινήσει τη δραστηριότητά τους εντός των τελευταίων δύο ετών.

Οι εταιρείες αυτές κατανέμονται γεωγραφικά σε 19 χώρες και πέντε ηπείρους, με το 37% στη Βόρεια Αμερική, το 25% στην Ασία και το 21% στην Ευρώπη. Το Memphis Meat έχει συγκεντρώσει σχεδόν 200 εκατομμύρια δολάρια για να αναλάβει την πρωτοκαθεδρία, ενώ το Mosa Meat έχει συγκεντρώσει πάνω από 85 εκατομμύρια δολάρια. Όσον αφορά το ενδιαφέρον για τα προϊόντα, το 28% των εταιριών που

δραστηριοποιούνται στον τομέα του καλλιεργημένου κρέατος ενδιαφέρεται για καλλιεργημένο βόειο και χοιρινό κρέας, ενώ το 12% ενδιαφέρεται για θαλασσινά, το 10% για πουλερικά και το 28% για πρώτες ύλες ή εξοπλισμό που χρησιμοποιείται στη διαδικασία παραγωγής.

1.3 Ανάγκη για εναλλακτική πηγή κρέατος

Η σίτιση 10 δισεκατομμυρίων ανθρώπων έως το 2050 αποτελεί το κορυφαίο πρόβλημα της ανθρωπότητας σήμερα. Το κρέας είναι ένα από τους πιο σημαντικούς διατροφικούς πόρους και θρεπτικά συστατικά για τη συντριπτική πλειοψηφία των ανθρώπων, καθώς καταναλώνονται πάνω από 300 εκατομμύρια τόνους το 2014, με προβλεπόμενη αύξηση 76% έως το 2050 (Alexandratos et al., 2012). Κάθε χρόνο, πάνω από 70 δισεκατομμύρια ζώα εκτρέφονται σε όλο τον κόσμο για να καλυφθεί η αυξανόμενη ζήτηση κρέατος. Η μεγάλη κλίμακας εκτροφή ζώων εγείρει σοβαρές περιβαλλοντικές, ηθικές και υγειονομικές ανησυχίες.

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της συμβατικής παραγωγής είναι οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από την εντερική ζύμωση. Επιπλέον, η σφαγή των ζώων μολύνει το περιβάλλον, καθώς είναι ανθυγιεινή και βίαιη.

Η διασταύρωση για τη δημιουργία αποκλειστικά ζώων υψηλής απόδοσης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της γενετικής ποικιλότητας των βοοειδών. Ο πολλαπλασιασμός των ζιζανίων από τα ζώα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των καλλιεργειών και της φυσικής ποικιλίας της άγριας πανίδας. Η διάβρωση του εδάφους προκαλείται από τη βόσκηση. Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος εγείρει ηθικές ανησυχίες και ζητήματα ανθρώπινης υγείας, τα υπερβακτήρια και τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά εξαπλώνονται.

Ακόμη, τα αγροτικά ζώα παρέχουν κίνδυνο ζωονοσογόνων ασθενειών (ιοί, βακτήρια, μύκητες και άλλα παθογόνα). Η παραδοσιακή κτηνοτροφική παραγωγή έχει γίνει όλο και πιο αβέβαιη λόγω επιδημιών της αφρικανικής πανώλης των χοίρων, της γρίπης των πτηνών και άλλων ασθενειών των ζώων. Υπό το πρίσμα αυτών των εκτιμήσεων, είναι επιτακτική ανάγκη να εξεταστεί μια εναλλακτική τεχνική

παραγωγής κρέατος που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, φιλική προς το περιβάλλον και μακράς διάρκειας.

Η κυτταρική βάση έχει χαρακτηριστεί ως μία από τις «10 κορυφαίες αναδυόμενες τεχνολογίες του Παγκόσμιου Οικονομικού Φόρουμ το 2018» και έχει αναγνωριστεί ως μια εύλογη λύση στα προβλήματα της ζωικής παραγωγής. Το κρέας με βάση τα κύτταρα (επίσης γνωστό ως *in vitro* κρέας, κρέας που καλλιεργείται στο εργαστήριο, καθαρό κρέας ή συνθετικό κρέας ή τεχνητό κρέας) είναι βρώσιμος μυϊκός ιστός που δημιουργείται με την καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων σε ελεγχόμενη καλλιέργεια και φυσιολογικό περιβάλλον σε εργαστήριο με τη χρήση μηχανικής ιστών και υπολογιστικής προσομοίωσης δηλαδή τις τεχνολογίες προσομοίωσης (Mengistie, 2020).

Με άλλα λόγια, το κρέας με βάση τα κύτταρα παράγεται με την καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων εκτός του ζώου για ανθρώπινη κατανάλωση από το οποίο προέρχεται. Για τις περισσότερες περιπτώσεις, τα βλαστικά κύτταρα με την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης απομονώνονται από μια βιοψία ζώου και τοποθετούνται σε κατάλληλο μέσο που περιέχει θρεπτικά συστατικά, πηγές ενέργειας, και άλλες μεταβλητές που απαιτούνται για την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Τα κύτταρα θα αναπτυχθούν και θα διαφοροποιηθούν σε ενήλικα μυϊκά κύτταρα σε βιοαντιδραστήρα, για τη δημιουργία μυϊκών ινών, λίπους και άλλους τύπους κυττάρων που αποτελούν τον μυϊκό ιστό. Η καλλιέργεια κυττάρων (ή ιστών) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βρώσιμων ζωικών μυών, συχνά γνωστών ως κρέας, η οποία απαιτεί τον πολλαπλασιασμό ενός μικρού αριθμού μυϊκών κυττάρων σε μια μεγάλη μάζα ιστού. Μετά την επεξεργασία των τροφίμων, όπως η διαμόρφωση, η βαφή και το καρύκευμα, αυτά τα κύτταρα συγκεντρώνονται και συνδυάζονται για την παραγωγή βρώσιμων τελικών προϊόντων κρέατος.

Το τεχνητό κρέας υποστηρίζεται ως μια βιώσιμη αντικατάσταση του παραδοσιακού κρέατος λόγω σημαντικών πλεονεκτημάτων, όπως η παραγωγή χωρίς ζώα, η μείωση της χρήσης ενέργειας έως και 50%, οι κατά 75- 95% χαμηλότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, η κατά 99% λιγότερη χρήση γης.

Επιπλέον, σε σύγκριση με το πραγματικό, το κρέας με βάση τα κύτταρα θα έχει πολύ μικρότερο αντίκτυπο στην εκπομπή άνθρακα. Σε αντίθεση με το συμβατικό ζωικό κρέας, όπου το 75-95% των ζωοτροφών που προσλαμβάνονται από το ζώο

χρησιμοποιείται για το μεταβολισμό και το σχηματισμό διάφορων τμημάτων του σώματος, όπως ο εξωσκελετός (τρίχες, κέρατα και οπλές) και νευρικές δομές, οι ενεργειακές ανάγκες θα είναι μειωμένες (Bhat & Fayaz, 2011).

Στο παραδοσιακό σύστημα, διάφορα φάρμακα, όπως ηρεμιστικά, πρόσθετα και στεροειδή, χορηγούνται στα ζώα πριν από τη θανάτωσή τους για την αύξηση της παραγωγής και του κέρδους. Συχνά όμως τα ζώα αρρωσταίνουν όλα αυτά τα ζητήματα αποφεύγονται με το τεχνητό κρέας. Καθώς το τεχνητό κρέας δεν παράγεται από ζώα που εκτρέφονται σε κλειστούς χώρους, μειώνεται ο κίνδυνος εκδήλωσης και μετάδοσης ασθενειών. Ως αποτέλεσμα, δεν υπάρχει ανάγκη παραγωγής ακριβών εμβολίων κατά θανατηφόρων ασθενειών (Srutee & Uday 2021).

Η παραγωγή με βάση τα κύτταρα θα γίνει λιγότερο δαπανηρή μακροπρόθεσμα και μπορεί να είναι πιο αποδοτική από το κανονικό, εάν παραχθεί πιο αποτελεσματικά (Bryant, 2020). Έτσι, τα υπεράριθμα οφέλη του τεχνητού κρέατος με βάση τα κύτταρα σε σύγκριση με την παραδοσιακή παραγωγή κρέατος άνοιξαν το πεδίο εφαρμογής για αυτή την καινοτόμο τεχνική.

Το κρέας με βάση τα κύτταρα βρίσκεται επί του παρόντος σε πρώιμο στάδιο λόγω της ανώριμης μεθόδου παραγωγής του και του υψηλού κόστους παραγωγής, για αυτό οι ερευνητές επικεντρώνονται πάνω σε τεχνικές βελτιώσεις για την επιτάχυνση της διαδικασίας εκβιομηχάνισης και εμπορευματοποίησης (Guan et al., 2021).

Τα τελευταία 50 χρόνια, η παγκόσμια παραγωγή κρέατος έχει τριπλασιαστεί, ενώ η παράλληλη αύξηση του πληθυσμού της γης εκτιμάται ότι θα φτάσει από τα 7,3 δισεκατομμύρια στα 10 δισεκατομμύρια το 2050. Επιπλέον, εκτιμάται ότι παράγοντες όπως η οικονομική ανάπτυξη, η αύξηση της κατανάλωσης από τις μεσαίες τάξεις των αναπτυσσόμενων χωρών, η αστικοποίηση και οι διατροφικές συνήθειες θα προκαλέσουν την συνεχή αύξηση της κατανάλωσης.

Άλλος παράγοντας στροφής προς την αναζήτηση εναλλακτικών πηγών είναι ο αντίκτυπος της παγκόσμιας παραγωγής κρέατος, ο οποίος εκτιμάται ότι ευθύνεται για το 15% - 25% της παραγωγής αερίων του θερμοκηπίου, καθώς και για τη μεγαλύτερη χρήση γης και νερού ανά κιλό παραγόμενης πρωτεΐνης και 1000 θερμίδων.

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος του πληθυσμού έχει αναπτύξει μεγάλη ευαισθησία όσον αφορά τις συνθήκες διαβίωσης και θανάτωσης των ζώων, αλλά και για τη διατροφική ασφάλεια στον τομέα της παραγωγής κρέατος.

Η παραγωγή κρέατος από κύτταρα μπορεί θεωρητικά να εξασφαλίσει την παγκόσμια ζήτηση σε πρωτεΐνη ζωικής, ξεκινώντας με έναν μικρό αριθμό κυττάρων, χάρη στις ιδιότητες των βλαστοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται σε μεγάλους αριθμούς υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η ανάγκη για την εκτροφή ζώων περιορίζεται σε έναν μικρό μόνο αριθμό, ενώ δεν υφίσταται πια ανάγκη για τη σφαγή των ζώων. Παράλληλα, μειώνονται σε μεγάλο βαθμό οι επιπτώσεις της παραγωγής κρέατος στο περιβάλλον και εξασφαλίζεται η σταθερή τροφοδοσία του πληθυσμού με υψηλής ποιότητας και διατροφικά ασφαλούς πρωτεΐνης.

Το καθαρό κρέας, που παράγεται από καλλιέργειες κυττάρων, αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική λύση έναντι του παραδοσιακού που προέρχεται από ζωντανά ζώα (Post, 2012). Η προσέγγιση αυτή απέκτησε αυξανόμενη προσοχή στην κοινή γνώμη, στα δημοφιλή μέσα ενημέρωσης, στις οργανώσεις για την προστασία των ζώων, στην επιστημονική κοινότητα και στους επενδυτές, ιδίως μετά την παραγωγή του πρώτου πρωτοτύπου καθαρού κρέατος.

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης θεωρούνται πλέον αναποτελεσματικά, καθώς τα ζώα καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες τροφής καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, εκ των οποίων έως και το 97% των θερμίδων χάνεται για διαδικασίες που αφορούν τη συντήρηση του σώματος και την παραγωγή μη εδωδιμων ιστών (Gaydhane et al., 2018; Sarlio, 2018). Σε σύγκριση με άλλες βιομηχανίες, τα προϊόντα ζωικής προέλευσης έχουν μεγαλύτερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα σε σχέση με τα προϊόντα φυτικής προέλευσης όσον αφορά τη ζήτηση εδάφους και νερού και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (GHG), με τη βιομηχανία βόειου κρέατος να προσδίδει τις βαρύτερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

Σύμφωνα με την έκθεση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών, ο κτηνοτροφικός τομέας είναι υπεύθυνος για το 14,5% των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και αξιοποιεί το 30% του εδάφους της Γης και το 8% του παγκόσμιου γλυκού νερού. Με τον αναμενόμενο διπλασιασμό της παγκόσμιας ζήτησης κρέατος έως το 2050, τα παραδοσιακά συστήματα παραγωγής κρέατος δεν μπορούν να θεωρηθούν βιώσιμα.

Επιπλέον, το 70-80% των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες χορηγείται στα ζώα εκτροφής (Elliott, 2015). Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών προκαλεί την επιλογή ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά στελεχών (AMR), που αποτελεί μείζονα ανησυχία για την ανθρώπινη υγεία (Avesar et al., 2017; Tang et al., 2017). Η AMR της κολιστίνης ξεκίνησε το 2015 σε χοιροτροφικές μονάδες και αργότερα εντοπίστηκε σε κοτόπουλο και χοίρους στο Βιετνάμ και τη Νότια Αμερική .

Εκτιμάται ότι μέχρι το 2050, τα AMR θα ευθύνονται για περισσότερους θανάτους από τον καρκίνο και θα κοστίζουν 2,9 τρισεκατομμύρια δολάρια ετησίως στις χώρες του ΟΟΣΑ. Αν και το μέγεθος της χρήσης αντιβιοτικών στην παραγωγή καθαρού κρέατος απαιτεί ακόμη διερεύνηση, έχει τη δυνατότητα να είναι χαμηλότερο από τη σημερινή χρήση στη βιομηχανία κρέατος λόγω των αποστειρωμένων συνθηκών καλλιέργειας και της πιθανής χρήσης μέσων χωρίς αντιβιοτικά.

Οι ηθικές ανησυχίες σχετικά με τις εργοστασιακές φάρμες είναι μια άλλη κινητήρια δύναμη πίσω από την έρευνα για το καθαρό κρέας. Το κοινό και η επιστημονική κοινότητα σέβονται τα αγροτικά ζώα ως αισθανόμενα όντα, με σωματικές και ψυχολογικές ανάγκες. Το κόστος της ανθρώπινης εκτροφής ενός κοτόπουλου, είναι 2-3 τάξεις μεγέθους υψηλότερο από το κόστος των προϊόντων που παράγονται από αυτό το ζώο (United States Department of Agriculture, 2018). Δεδομένου ότι η συντριπτική πλειονότητα των οικόσιτων ζώων εκτρέφεται για το κρέας, η πίεση για την εξάλειψη του κρέατος με βάση τα ζώα είναι ουσιαστική.

Από την άλλη πλευρά, η λεπτομερής ρύθμιση των συστατικών του κρέατος είναι δύσκολη στα ζωντανά ζώα και επιτυγχάνεται με την επιλογή συγκεκριμένων φυλών και την τήρηση πολύπλοκων πρωτοκόλλων διατροφής . Στο καθαρό κρέας, τα κύτταρα καλλιεργούνται in-vitro σε μια προσαρμόσιμη και ελεγχόμενη πλατφόρμα. Ο απλός και ακριβής χειρισμός του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη λεπτομερή ρύθμιση των χαρακτηριστικών του κρέατος. Επιπλέον, οι συνδυασμοί κυττάρων από διαφορετικά είδη μπορούν να οδηγήσουν σε νέες και πρωτόγνωρες γεύσεις.

Ένας τεχνητός ιστός βελτιστοποιείται παραδοσιακά για βιολογική λειτουργικότητα, βελτιωμένη βιωσιμότητα μετά τη μεταμόσχευση, βιοδιασπασιμότητα και αμελητέα ανοσολογική απόκριση. Για την επίτευξη αυτών των στόχων,

αναπτύσσονται πρωτόκολλα και εκτελείται μια αυστηρή σειρά πειραμάτων για την αξιολόγηση της επίδρασης συγκεκριμένων παραγόντων στη συνολική ποιότητα του ιστού. Τα πειράματα αυτά διεξάγονται με τη χρήση παραγοντικών σχεδίων, στα οποία μετρώνται τόσο οι κύριοι παράγοντες όσο και οι αλληλεπιδράσεις τους (Chen et al., 2011). Παρόμοια προσέγγιση απαιτείται για τη βελτιστοποίηση του καθαρού κρέατος, με έμφαση στη γεύση (γεύση και άρωμα), την υφή, το κόστος, τη θρεπτική αξία και την ασφάλεια των τροφίμων .

Οι εκτιμήσεις της γεύσης αποτελούν βασική πρόκληση στην έρευνα για το καθαρό κρέας. Το κρέας περιέχει χιλιάδες μόρια γεύσης, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, αιμοπρωτεϊνών, θειούχων και καρβονυλικών ενώσεων, λιπιδίων, σύντομων πεπτιδίων και πρόσθετων πτητικών ουσιών γεύσης. Ένα πρόσθετο εμπόδιο προέρχεται από το μικρό μέγεθος των εργαστηριακών δειγμάτων, καθώς τα τυποποιημένα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της ποιότητας του κρέατος έχουν σχεδιαστεί για τη δοκιμή δειγμάτων που κυμαίνονται από ολόκληρα ζώα έως δεκάδες γραμμάρια, τα οποία είναι τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερα από τα πειραματικά εργαστηριακά δείγματα.

Η περίθλαση φωτός είναι μια γρήγορη, φθηνή και μη επεμβατική μέθοδος ανάλυσης κρέατος. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται σε μια βάση δεδομένων αναφοράς με μοτίβα περίθλασης φωτός από δείγματα κρέατος με γνωστή σύνθεση. Η συσχέτιση μεταξύ ενός μετρούμενου δείγματος και της βάσης δεδομένων αναφοράς χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της σύνθεσης του δείγματος με μεγάλη ακρίβεια. Η κλιμάκωση αυτής της τεχνολογίας είναι εφικτή και θα μπορούσε να επιταχύνει την έρευνα για το καθαρό κρέας.

Ωστόσο, η περίθλαση φωτός παρέχει μόνο μια εκτίμηση των κύριων συστατικών, όπως η περιεκτικότητα του δείγματος σε λίπος και κολλαγόνο. Το μοριακό προφίλ των εργαστηριακών δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με χρωματογραφικό διαχωρισμό, ακολουθούμενο από ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση με φασματομετρία μάζας (Trivedi et al., 2016). Μια βάση δεδομένων αναφοράς μοριακών προφίλ που λαμβάνονται από δείγματα κρέατος θα μπορούσε να είναι επωφελής για την ερμηνεία και την τυποποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων .

Ενώ η μοριακή σκιαγράφηση μπορεί να είναι πιο αργή και ακριβή, παρέχει ποσοτικοποίηση των μορίων γεύσης και είναι πιο κατάλληλη για την ανάπτυξη νέων

ιστών, η σύνθεση των οποίων μπορεί συχνά να είναι εκτός του πεδίου εφαρμογής της βάσης δεδομένων αναφοράς.

Οι μετρήσεις της υφής είναι απλούστερες και μπορούν εύκολα να προβλέψουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση υφιστάμενων συσκευών, αλλά απαιτούν προσαρμογή των υφιστάμενων πρωτοκόλλων ή οργάνων για την αξιολόγηση μικρότερων δειγμάτων σε ευρύτερες υποδεέστερες περιοχές (Luckett et al., 2014).

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την υφή του καθαρού κρέατος περιλαμβάνουν την ωρίμανση των μυϊκών ινών και την ευθυγράμμιση, την περιεκτικότητα και την ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), την περιεκτικότητα σε ενδομυϊκό λίπος (IMF) και το υλικό και τη δομή του ικριώματος. Η στατική καταπόνηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της ευθυγράμμισης των μυοσωλήνων και της ECM με την προστιθέμενη αξία της βελτιωμένης μυϊκής ωρίμανσης .

Ωστόσο, η επεκτασιμότητα της διαδικασίας μπορεί να είναι δύσκολη. Η κλιμακούμενη ευθυγράμμιση μπορεί να προκληθεί μέσω του σχεδιασμού των ικριωμάτων, με τη δημιουργία ευθυγραμμισμένων ινώδους ικριώματος ή με μικροδιαμόρφωση .

Το κόστος είναι πιθανώς το βασικό εμπόδιο, καθώς δανείζεται εργαλεία από τον ακριβό και αυστηρά ρυθμιζόμενο τομέα της αναγεννητικής ιατρικής και τα εφαρμόζει στη βιομηχανία τροφίμων, η οποία έχει ένα από τα χαμηλότερα περιθώρια κέρδους. Οι κύριες δαπάνες για την παραγωγή καθαρού κρέατος είναι τα βιοϋλικά και η διασφάλιση της καθαρότητάς τους, το ανθρώπινο δυναμικό, οι εγκαταστάσεις και τα εργαλεία μέτρησης. Εκτιμάται ότι το 55-95% του κόστους παραγωγής θα μπορούσε να αποδοθεί στη χρήση μέσων και ότι το 99% του κόστους των μέσων μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες ανάπτυξης .

Αν και οι αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors, GF) είναι δαπανηρά βιοϋλικά, λόγω του καθαρισμού των πρωτεϊνών, η συμβολή τους στη μηχανική των ιστών είναι ανεκτίμητη (Van der Gucht, 2018). Η αντικατάσταση των καθορισμένων GF με κύτταρα που παράγουν GF είναι δυνατή, ωστόσο μπορεί να περιπλέξει τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των GF, καθώς οι πειραματικές παράμετροι μπορούν να

επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης των αυξητικών παραγόντων σε αυτά τα κύτταρα. Δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις είναι η παραγωγή αυτών των μορίων σε χαμηλότερο βαθμό καθαρισμού (ή χωρίς καθαρισμό) ή η παραγωγή φθηνών αναλόγων αυτών των μορίων. Πρέπει να αναπτυχθούν και να βελτιστοποιηθούν προσαρμοσμένοι βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή καθαρού κρέατος, να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της χρήσης των μέσων και να ανακυκλωθούν τα κύρια συστατικά των μέσων.

Οι τροφιμογενείς ασθένειες, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη, η χρήση των πόρων, η ευημερία των αγροτικών ζώων και οι περιβαλλοντικές συνέπειες της εκτροφής, όπως η ρύπανση από τα περιττώματά τους και οι μαζικές εκπομπές μεθανίου που συμβάλλουν στην υπερθέρμανση του πλανήτη, είναι μερικές μόνο από τις σοβαρές ανησυχίες που συνδέονται με τα συμβατικά συστήματα παραγωγής.

Δεδομένων των σημαντικών αρνητικών συνεπειών της παραγωγής κρέατος στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία, η παραγωγή κρέατος με καλλιέργεια, μια τεχνική που έχει τη δυνατότητα να αλλάξει την ανθρώπινη ύπαρξη, αποτελεί μια εφικτή εναλλακτική λύση.

Η τεχνική καλλιέργειας κυττάρων έχει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ομοιογένεια των κυττάρων, παρουσιάζοντας σχεδόν πλήρη έλεγχο της μυογένεσης. Επιπλέον, τα MSC μπορούν να αυξηθούν τουλάχιστον 20 φορές όταν καλλιεργούνται υπό ιδανικές συνθήκες. Ως εκ τούτου, μπορεί να ληφθεί σημαντική ποσότητα μυϊκών ινών από πολύ μικρό αριθμό απομονωμένων κυττάρων (Mizuno et al., 2010). Οι μελλοντικές προσπάθειες θα πρέπει να επικεντρωθούν στη σωματική πυρηνική μεταφορά κυττάρων σε ωκύτταρα (κλωνοποίηση), σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ή στην έκτοπη έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων σε επαγωγίμα MSC ως συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ικανά να διαφοροποιούνται αποτελεσματικά σε μυοσωλήνες και μυϊκές ίνες. Οι προσαρμογές στην υφή, τη γεύση και το άρωμα του καλλιεργημένου κρέατος είναι επίσης δυνατές (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010).

Τα καλλιεργημένα κρέατα μπορεί να έχουν κάποια δυσκολία να ανταγωνιστούν τα κανονικά κρέατα όσον αφορά το χρώμα και την εμφάνισή τους- επομένως, για να βελτιωθεί η εμφάνιση και η γεύση των προϊόντων καλλιεργημένου κρέατος, πρέπει να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι επεξεργασίας. Έχουν επίσης προταθεί και επιχειρηθεί να χρησιμοποιηθούν ικρίωματα από φυσικά και βρώσιμα βιοϋλικά, όπως το κολλαγόνο,

τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη τρισδιάστατων ιστών και πολύπλοκων δομών κρέατος .

Η μέθοδος παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια μπορεί να παρέχει τη δυνατότητα αποσύνδεσης από τη φύση και τα ζώα και μπορεί να αποτελέσει ένα βήμα προς τη βιώσιμη αστικοποίηση (Welin, 2013). Όπως προαναφέρθηκε, το κύριο εμπόδιο είναι το υψηλό κόστος του παρά το γεγονός ότι η μεγάλης κλίμακας παραγωγή και η διείσδυση στην αγορά συνδέονται γενικά με σημαντική μείωση των τιμών. Επομένως, η παραγωγή καλλιεργημένου κρέατος σε μεγάλη κλίμακα είναι δυνατή μόνο εάν αναπτυχθεί μια τεχνική χαμηλού κόστους που παράγει ένα προϊόν που είναι ποιοτικά συγκρίσιμο με τα υπάρχοντα προϊόντα και να επιδοτείται από την κυβέρνηση με τον ίδιο τρόπο που επιδοτούνται άλλες αγροτικές επιχειρήσεις .

1.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνητού κρέατος

Αναπτύσσονται εναλλακτικές λύσεις για την παραδοσιακή παραγωγή κρέατος, εν μέρει για να βοηθήσουν στη μείωση της κατανάλωσης, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών διαιτών και των υποκατάστατων. Το in-vitro κρέας (IVM) αποτελεί μια πιθανή εναλλακτική λύση που θα μπορούσε να μειώσει την εξάρτηση από τις εντατικές μεθόδους εκτροφής, μειώνοντας έτσι τις αρνητικές επιπτώσεις του γεωργικού τομέα.

Η IVM είναι μια διαδικασία που αποσκοπεί να αναδημιουργήσει την περίπλοκη δομή των μυών των ζώων με σημαντικά λιγότερες απαιτήσεις σε κύτταρα. Μια βιοψία παρέχει ένα δείγμα μυός το οποίο στη συνέχεια κόβεται για να απελευθερωθεί το βλαστικό κύτταρα που μπορούν να διαιρεθούν και να πολλαπλασιαστούν για να σχηματίσουν τελικά ένα προϊόν. Η IVM παρέχει μια δυναμική διαδικασία παραγωγής κρέατος με λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, χαμηλότερη διατροφική κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων και λιγότερες απαιτήσεις για τα ζώα. Ωστόσο, η αποδοχή των προϊόντων IVM από τους καταναλωτές είναι κρίσιμη για την κλίμακα του αντίκτυπου που θα μπορούσε να έχει μια τέτοια τεχνολογία στην αγορά.

Η διαδικασία που εμπλέκεται μπορεί να μειώσει τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και να αυξήσει τη συνολική υγεία.

Το κρέας αποτελεί πηγή διατροφής, καθώς παρέχει απαραίτητα αμινοξέα και αποτελεί πηγή πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες εξαρτάται από την πηγή, αλλά η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στις ζωικές πηγές είναι 22%. Οι πηγές κρέατος παρέχουν στον οργανισμό τα απαραίτητα αμινοξέα, τα

οποία αποτελούν τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης, και τα αμινοξέα αυτά πρέπει να συμπληρώνονται μέσω των τροφίμων που καταναλώνει ένα άτομο (Pereria, 2013).

Εκτός από τα διατροφικά οφέλη, τα άτομα καταναλώνουν κρέας ως μέρος των συνηθειών επειδή «είναι φυσιολογικό, είναι φυσικό, και είναι απαραίτητο».

Καθώς αυξάνεται η κατανάλωση κρέατος και η ζήτηση στο γεωργικό σύστημα, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις θα αυξηθούν επίσης. Στις ΗΠΑ, η γεωργική βιομηχανία αντιπροσωπεύει το 10% των συνολικών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (EPA, 2019). Η παραγωγή κρέατος επηρεάζει επίσης τη λειψυδρία. Το κύκλος ζωής για την παραγωγή κρέατος περιλαμβάνει τις καλλιέργειες που καλλιεργούνται για ζωοτροφές και συνεχίζεται μέσω της αγοράς και τη διάθεση από τον καταναλωτή. Για ένα μπιφτέκι βοδινού κρέατος 150 γραμμαρίων, η απαίτηση σε νερό είναι 2.400 λίτρα.

Η πρόσληψη νερού από τα ζώα ποικίλλει με βάση διαφορετικούς παράγοντες του ζώου και το περιβάλλον (ηλικία, βάρος, είδος, εποχή). Η γη που απαιτείται για την εκτροφή των ζώων, συμπεριλαμβανομένων τη βόσκηση και την παραγωγή ζωοτροφών, είναι τεράστια. Ο γεωργικός τομέας καταλαμβάνει το 26% της «ελεύθερης από πάγο χερσαία επιφάνεια του πλανήτη».

Εκτός από τις αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις που συνδέονται με την κτηνοτροφία και τις ανησυχίες σχετικά με τα δικαιώματα των ζώων, υπάρχει μια σειρά από ανησυχίες που σχετίζονται με την υγεία και έχουν οδηγήσει σε υποκατάστατα κρέατος (Joshi, 2015). Οι δίαιτες με βάση τα λαχανικά είναι χαμηλότερες σε χοληστερόλη και κορεσμένα λιπαρά και υψηλότερη σε αντιοξειδωτικά, φυλλικό οξύ και φυτικές ίνες από τις δίαιτες με βάση το κρέας. Χορτοφαγικές δίαιτες συνδέονται επίσης με χαμηλότερο κίνδυνο για ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου 2, ενώ οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε επεξεργασμένο κρέας συνδέονται με αύξηση των ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου, διαβήτη και του καρκίνου. Η υγεία έχει ερευνηθεί ότι είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που λαμβάνουν υπόψη τους οι καταναλωτές όταν λαμβάνουν αποφάσεις για την κατανάλωση κρέατος .

Ως εναλλακτική λύση στην παραδοσιακή κτηνοτροφική βιομηχανία, η IVM είναι ένα σύστημα που δημιουργεί ένα ζωικό προϊόν από τον μυϊκό ιστό ενός ζώου με την ταχεία αντιγραφή της κυτταρικής σύνθεσης του ιστού έως ότου σχηματιστεί ένα προϊόν κρέατος. Με αυτή τη μέθοδο, υπάρχουν διάφορα οφέλη, όπως λιγότερη πιθανότητα εξάπλωσης ασθενειών μέσω της επαφής των ζώων και σημαντικά οφέλη για την περιβαλλοντικές συνέπειες που παράγονται από τον γεωργικό τομέα.

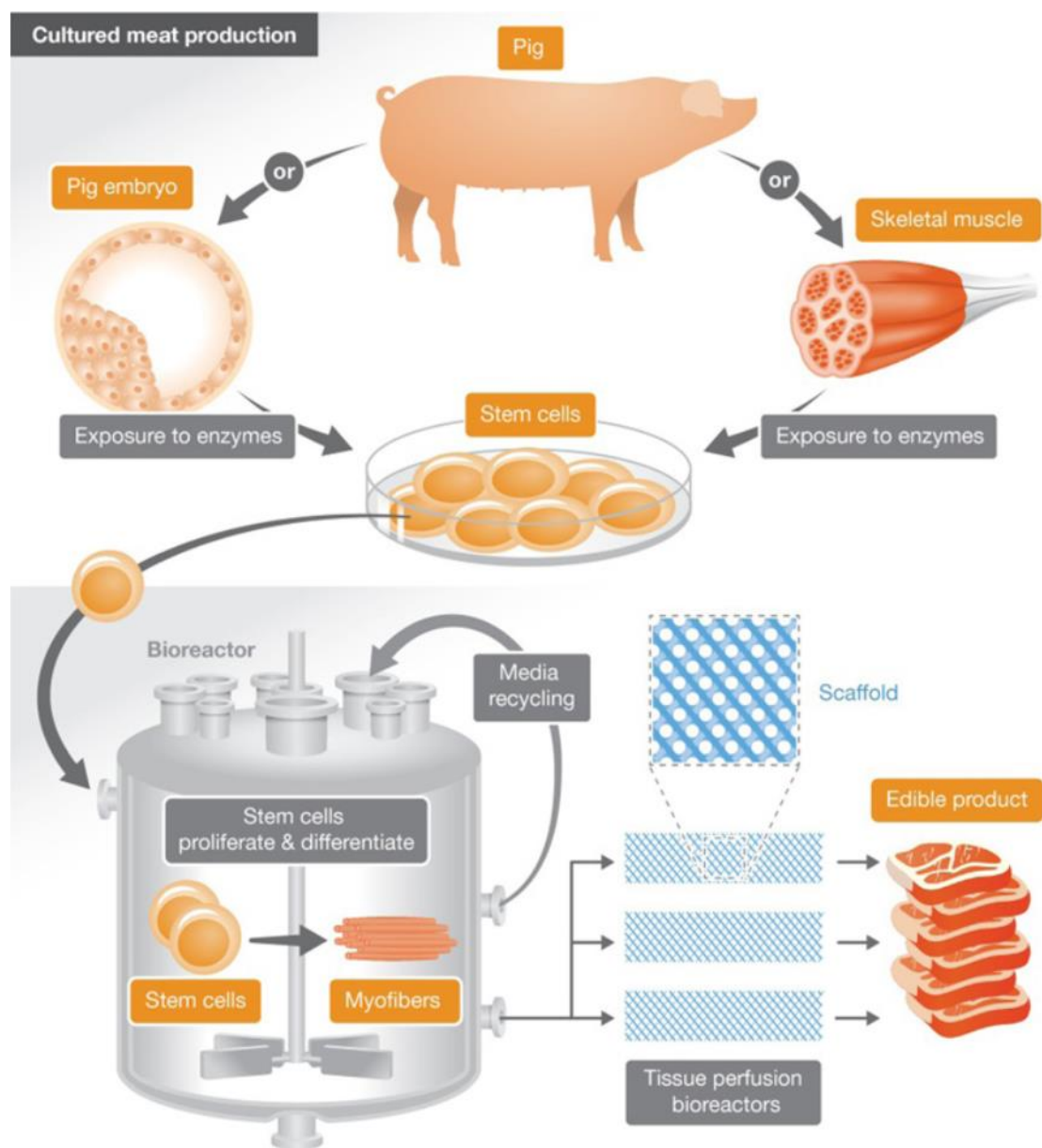
Η IVM θα παρέχει ένα αυστηρό και ρυθμιζόμενο σύστημα για τον έλεγχο των τροφιμογενών ασθενειών και της έκθεσης σε κινδύνους, όπως τα φυτοφάρμακα σε παραδοσιακές εγκαταστάσεις παραγωγής (Bhat, 2015), έχει επίσης τη δυνατότητα να μειώσει την αποτύπωμα άνθρακα της βιομηχανίας κρέατος έως και 90% .

Κεφάλαιο 2: Παραγωγή τεχνητού κρέατος

Η δομική πολυπλοκότητα του ίδιου του κρέατος, που αποτελείται από διάφορους τύπους ιστών και περίπλοκα συστήματα, είναι δύσκολο να αναπαραχθεί εκτός του σώματος των ζώων. Αυτές οι μοναδικές ιδιότητες του κρέατος είναι που του προσδίδουν την ξεχωριστή γεύση και την υφή του. Το κρέας από θηλαστικά, πουλερικά και θαλασσινά διαφέρει με βάση τους μυς, τον τύπο των ινών και, συνεπώς, την ποιότητα και τη γεύση. Συνεπώς, η αναπαραγωγή διαφορετικών τύπων κρέατος σε ένα εργαστήριο απαιτεί μια ολοκληρωμένη κατανόηση της δομής του κρέατος και των συστατικών του. Εξαιτίας αυτής της πολυπλοκότητας του κρέατος, η ιδέα του τεχνητού κρέατος δεν έλαβε σημαντική προσοχή στην επιστημονική κοινότητα μέχρι τις τελευταίες δεκαετίες.

Τον Μάιο του 2005 δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Tissue Engineering το πρώτο ολοκληρωμένο άρθρο που επεξεργαζόταν το τεχνητό κρέας. Με τη συνεχή έρευνα σε όλο τον κόσμο, οι επιστήμονες έχουν αποκτήσει καλύτερη κατανόηση της δομής του κρέατος και έχουν διαπιστώσει ότι τα απαραίτητα συστατικά του κρέατος

περιλαμβάνουν σκελετικά μυϊκά κύτταρα και λιποκύτταρα, ή λιπώδεις ιστούς. Σήμερα, η δυνατότητα καλλιέργειας κρέατος στο εργαστήριο (Εικόνα 3) καθίσταται εφικτή χάρη σε έναν πολύ μοναδικό τύπο κυττάρων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια μυϊκών και λιπώδους ιστών.



Εικόνα 3: Διαδικασία παραγωγής καλλιεργημένου κρέατος.

2.1 Είδη κυττάρων

Το κρέας, ή σκελετικοί μύες, περιέχει περίπου 90% μυϊκές ίνες, 10% συνδετικούς και λιπώδεις ιστούς και 0,3% αίμα (Nollet, 2012). Οι σκελετικοί μυϊκοί ιστοί, με στόχο την αναγέννηση ιστών, μπορούν να παραχθούν σε τρισδιάστατα

ικριώματα με τη συνεκτροφή μυϊκών κυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs) και υποστηρικτικών κυττάρων που παράγουν ECM, αλλά στερούνται συστατικών λίπους και αίματος. Προκειμένου να αναπαραχθεί η λιπώδης σύνθεση του εγγενούς σκελετικού μυϊκού ιστού, το τεχνητό κρέας θα πρέπει να δημιουργηθεί από λιποκύτταρα.

Όσον αφορά τα συστατικά του αίματος, με εξαίρεση τα ψάρια, η πλειονότητα των αιμοπρωτεϊνών στο κρέας προέρχεται από τη μυοσφαιρίνη (κατά μέσο όρο 1,5 % του πρωτεϊνικού περιεχομένου του κρέατος) που βρίσκεται στο εσωτερικό των μυϊκών ινών. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή «καθαρού αίματος» μπορεί να είναι μικρής σημασίας, ιδίως δεδομένου ότι οι καλλιέργειες αίματος δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί για ιατρικούς σκοπούς.

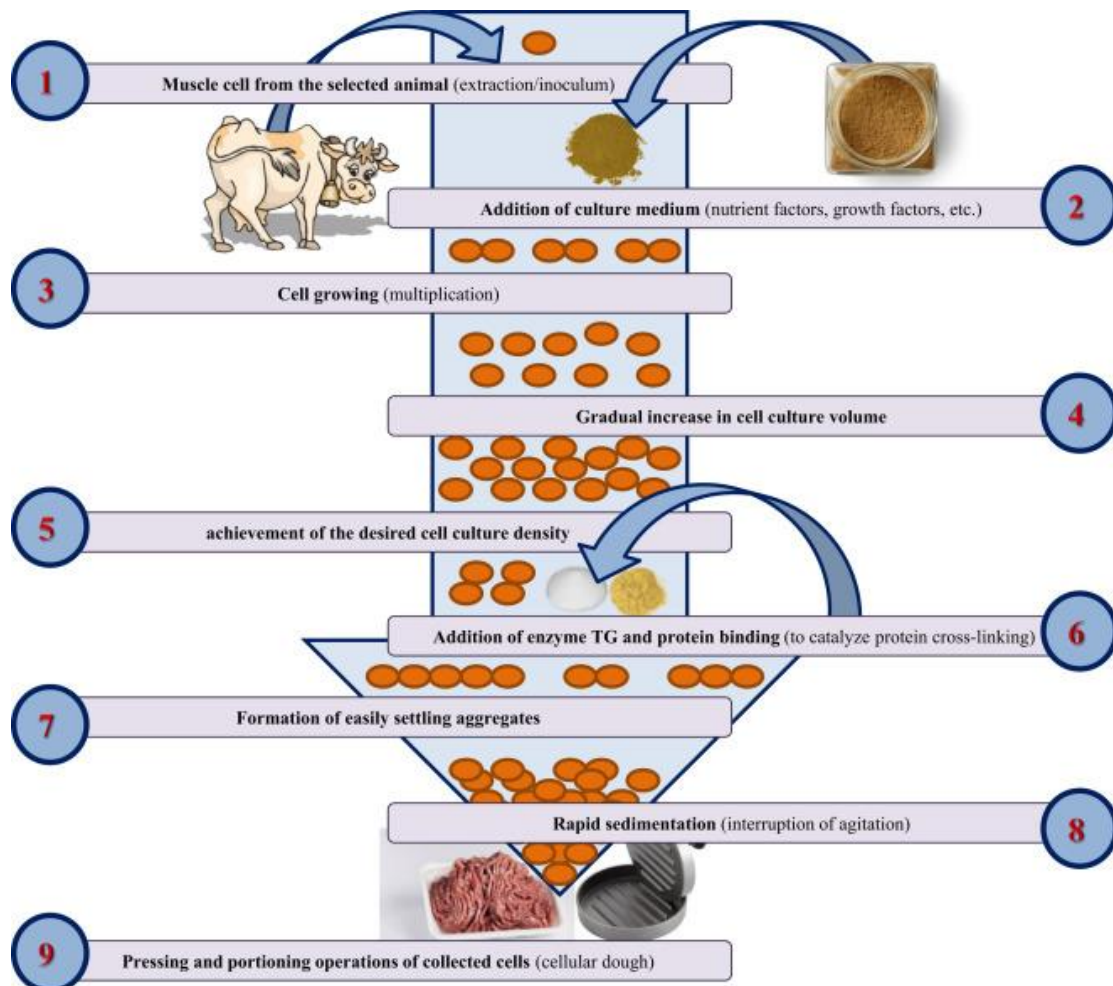
Τα νευρικά κύτταρα διαδραματίζουν επίσης βασικό ρυθμιστικό ρόλο στους σκελετικούς μύες, παρέχοντας ηλεκτρικά σήματα που επηρεάζουν την ομοιοστάση και την ωρίμανση των ιστών. Ενώ η νεύρωση μπορεί να είναι δύσκολο να επιτευχθεί με κλιμακούμενο και οικονομικά αποδοτικό τρόπο, τα ηλεκτρικά σήματα μπορούν να μιμηθούν ορισμένους από τους βασικούς ρόλους των νευρικών κυττάρων.

2.1.1 Μυϊκά βλαστικά κύτταρα (Myosatellite Cells)

Ο σκελετικός μυς αποτελείται από μεταμιτωτικές πολυπύρηνες μυϊκές ίνες που περιέχουν τα συστατικά στοιχεία του σκελετικού μυός. Οι σκελετικές μυϊκές ίνες σχηματίζονται κατά την ανάπτυξη με τη μετανάστευση των πρόδρομων μυϊκών κυττάρων ή μυοβλαστών από τους σομίτες στους εκκολαπτόμενους μύες, όπου συγχωνεύονται για να σχηματίσουν πολυπύρηνες μυϊκές ίνες.

Καθώς το τελικό σημείο διαφοροποίησης είναι τόσο εμφανές, η μυογένεση παρέχει ένα εξαιρετικό πρότυπο σύστημα για τη μελέτη του ελέγχου της διαφοροποίησης. Από τη διαπίστωση ότι η MyoD μπορεί να μετατρέψει τους ινοβλάστες σε μυογενετικά κύτταρα, ο ρυθμιστικός καταρράκτης που ελέγχει τη μυογενετική διαφοροποίηση δεν έχει διευκρινιστεί αρκετά. Τα ηρεμούντα πρόδρομα μυϊκά κύτταρα στους ενήλικους μύς ονομάζονται δορυφορικά κύτταρα. Ανακαλύφθηκαν το 1961 από τους Katz & Mauro και βρίσκονται κάτω από το βασικό

έλασμα της μυϊκής ίνας, αλλά ξεχωριστά από την ίδια τη μυϊκή ίνα. Τα δορυφορικά κύτταρα συνεισφέρουν μιονουκλεάδες στις αναπτυσσόμενες μυϊκές ίνες και είναι ο κύριος, αν όχι ο μοναδικός, τύπος κυττάρων που συμβάλλει στην αναγέννηση των μυών.



Εικόνα 4: Ροή εργασίας της καλλιέργειας μυϊκών κυττάρων με τη χρήση τεχνικής ικρίωματος.

Τα δορυφορικά κύτταρα εμφανίζονται στα άκρα περίπου στις 17,5 ημέρες μετά την κοίλανση, αφού έχουν σχηματιστεί οι πρωτογενείς μυϊκές ίνες. Η προέλευσή τους δεν είναι γνωστή, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι προέρχονται από τη ραχιαία αορτή. Μέχρι πρόσφατα, για την ακριβή ταυτοποίησή τους χρειαζόταν ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η ανακάλυψη των πρωτεϊνών που εκφράζονται από τα δορυφορικά κύτταρα, αλλά όχι από τους μιονουκλεούς στις μεταμιτωτικές μυϊκές ίνες, έκανε τη μελέτη τους πολύ πιο απλή. Η M-cadherin, ένα εξαρτώμενο από το ασβέστιο μόριο

κυτταρικής προσκόλλησης, η c-met, ο υποδοχέας για τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF), ο πυρηνικός παράγοντας των μυοκυττάρων (MNF) και ο Pax7, ένας μεταγραφικός παράγοντας, εκφράζονται από τα δορυφορικά κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής ανάπτυξης, τα δορυφορικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και οι απόγονοί τους συγχωνεύονται με την αναπτυσσόμενη μυϊκή ίνα, ενώ ορισμένα σχηματίζουν επίσης νέα δορυφορικά κύτταρα. Παρά αυτή την αναπλήρωση της δεξαμενής δορυφορικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της μυϊκής ανάπτυξης, ο αριθμός των δορυφορικών κυττάρων, ο οποίος είναι υψηλότερος στους μεταγεννητικούς μύες, μειώνεται με την ηλικία.

Αν και μελέτες σχετικά με το μήκος των τελομερών έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρή ή καθόλου εναλλαγή σε μη κατεστραμμένους, μη μυοπαθείς ενήλικους σκελετικούς μύες, τα δορυφορικά κύτταρα ενεργοποιούνται με τραυματισμό. Τα ήσυχα δορυφορικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων. Τα ενεργοποιημένα δορυφορικά κύτταρα εκφράζουν μυογενετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες με παρόμοιο τρόπο με τα πρόδρομα μυϊκά κύτταρα κατά την ανάπτυξη των σκελετικών μυών. Πολλαπλασιάζονται και στη συνέχεια είτε συγχωνεύονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μυοσωλήνες, οι οποίοι ωριμάζουν σε μυϊκές ίνες, είτε συγχωνεύονται με κατεστραμμένα τμήματα μυϊκών ινών.

Έχει αποδειχθεί ότι οι κλώνοι των δορυφορικών κυττάρων είναι ικανοί να δημιουργήσουν νέους μύες και να αυτοανανεωθούν για να δημιουργήσουν περισσότερα δορυφορικά κύτταρα *in vivo*. Τα κύτταρα αυτά διατηρούνται επίσης εντός του μυός ξενιστή ως πρόδρομα κύτταρα μακράς διάρκειας ζωής, ικανά να δημιουργήσουν νέο μυ όταν ο μυς τραυματιστεί. Συνεπώς, οι κλώνοι αυτοί πληρούν όλα τα κριτήρια ενός βλαστικού κυττάρου, αν και συγκεκριμένου ιστού.

Υπάρχουν λειτουργικές ενδείξεις ότι τα δορυφορικά κύτταρα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός. Μετά από τραυματισμό, ορισμένα πολλαπλασιάζονται πριν είτε διαφοροποιηθούν σε μυς είτε δημιουργήσουν περισσότερα δορυφορικά κύτταρα. Άλλα ενεργοποιημένα δορυφορικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται πριν από τη συνένωση με τις κατεστραμμένες μυϊκές ίνες και θεωρείται ότι είναι πιο αφοσιωμένα πρόδρομα κύτταρα.

Ένας μικρός πληθυσμός «βλαστοκυτταρικών» πρόδρομων μυϊκών κυττάρων στο μυ των ποντικών επιβιώνει από υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. Ο μυοπαθής μυς ποντικού mdx, στον οποίο χορηγήθηκε ακτινοβολία γάμμα 18 Gy, δεν αναγεννάται, ενώ όταν ο ακτινοβολημένος μυς υποστεί εκτεταμένη βλάβη από δηλητήριο φιδιού, παρατηρείται εκτεταμένη αναγέννηση. Τα ανθεκτικά στην ακτινοβολία πρόδρομα μυϊκά κύτταρα που αφυπνίζονται σε απόκριση σε ακραίο τραύμα είναι πολύ μειωμένα στους μυς mdx και μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν υποπληθυσμό δορυφορικών κυττάρων σε βαθιά ηρεμία.

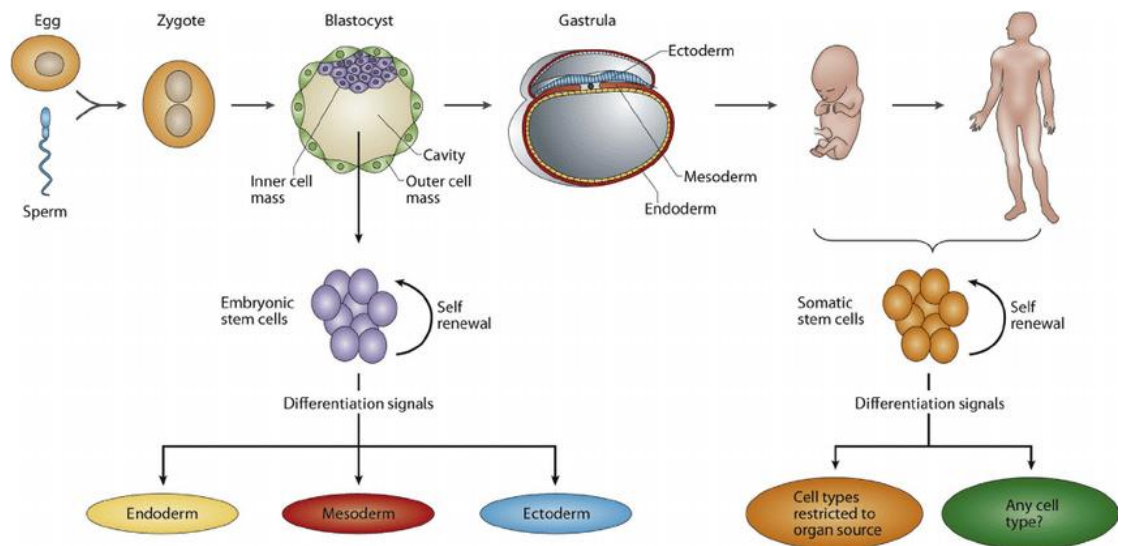
Πολλοί αυξητικοί παράγοντες εμπλέκονται στη χημειοταξία, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των δορυφορικών κυττάρων. Οι θρυμματισμένες μυϊκές ίνες παράγουν πολλούς παράγοντες που είναι μιτογόνοι για τα πρόδρομα μυϊκά κύτταρα, ορισμένοι από τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί (βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (basic-FGF), αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (PDGF)-BB, τρανσφερρίνη και αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων) και ορισμένοι που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί.

Τα μακροφάγα, τα οποία εισβάλλουν στην περιοχή της βλάβης και φαγοκυτταρώνουν τον κατεστραμμένο ιστό, παράγουν επίσης αυξητικούς παράγοντες που είναι μιτογόνοι για τα πρόδρομα κύτταρα των μυών, π.χ. PDGF, TGF-β, basic-FGF και LIF. Αυξητικοί παράγοντες όπως ο HGF, ο βασικός-FGF και οι IGF1 και TGF-β προάγουν επίσης τη χημειοταξία των δορυφορικών κυττάρων σε καλλιέργεια ιστού. Τα δορυφορικά κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο σημείο του τραυματισμού επάγονται για να πολλαπλασιαστούν και να μεταναστεύσουν, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δορυφορικά κύτταρα εισέρχονται στο σημείο του τραυματισμού από άλλα σημεία του μύος ή, σε ακραίες περιπτώσεις, από γειτονικούς μυς.

2.1.2 ECM

Η ECM των σκελετικών μυών είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητα των ιστών, δημιουργεί σημεία προσκόλλησης για την προσκόλληση των κυττάρων, παρέχει στα κύτταρα ένα τριδιάστατο περιβάλλον και ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, τη μορφολογία και την ευθυγράμμιση μέσω

βιοχημικών και βιοφυσικών ενδείξεων. Η σύνθεση και οι ρόλοι της ECM δεν είναι σταθεροί, αλλά αλλάζουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μυών σε μια διαδικασία που ονομάζεται ινογένεση, παράλληλα με τη μυογένεση και τη λιπογένεση. Εκτός από τους βιολογικούς της ρόλους, η ECM περιέχει θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες (κυρίως κολλαγόνα), και γλυκοζαμινογλυκάνες [κυρίως υαλουρονικό οξύ (HA)], και επηρεάζει την υφή των ιστών και τη συνολική ποιότητα του κρέατος



Εικόνα 5: Βλαστικά κύτταρα.

Η ECM αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και μήτρα πρωτεογλυκανών (PG), αλλά περιλαμβάνει επίσης γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) και ιώδεις πρωτεΐνες όπως η ελαστίνη, η ινδονεκτίνη και η λαμίνη. Η μυϊκή ECM έχει τρία ανοδικά στρώματα συνδετικών ιστών, όσον αφορά το μέγεθος και το πάχος του τοιχώματος, το ενδομύσιο που γεμίζει τα κενά μεταξύ των μυϊκών ινών, το περιμύσιο που διαμερίζει δέσμες μυϊκών ινών (fascicles) και το επιμύσιο που περιβάλλει ολόκληρο τον μυ. Το περιμύσιο ποικίλλει σε μέγεθος και μπορεί να χωριστεί σε πρωτογενές και δευτερογενές περιμύσιο. Τα πρωτογενή περιμυϊκά στρώματα είναι μικρότερα, περιέχουν λιγότερες μυϊκές ίνες και έχουν λεπτότερα τοιχώματα σε σύγκριση με τα δευτερογενή περιμυϊκά στρώματα (54,6-133 μm πάχος τοιχώματος στα βοοειδή).

Ενώ όλες οι στιβάδες αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνα I και III, οι σχετικές αναλογίες τους διαφέρουν και άλλοι τύποι κολλαγόνου μπορούν να βρεθούν

διάσπαρτοι. Το κολλαγόνο IV είναι βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης και παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-μητρών και στη θέση του SC. Οι μεταβολές που σχετίζονται με την ηλικία περιλαμβάνουν αύξηση της συγκέντρωσης του κολλαγόνου και αλλαγές στην κατανομή των τύπων κολλαγόνου και στη διασύνδεση.

Σε κάποιο βαθμό, η μίμηση της μορφολογίας και των μηχανικών ιδιοτήτων του επιμύθιου, περιμύθιου και ενδομύθιου μπορεί να επιτευχθεί με προσεκτικό σχεδιασμό του ικριώματος. Η βασική μεμβράνη μπορεί να είναι δύσκολο να αναπαραχθεί πριν από την κυτταρική σπορά, καθώς είναι προσαρμοσμένη στη δομή του μυοσωλήνα.

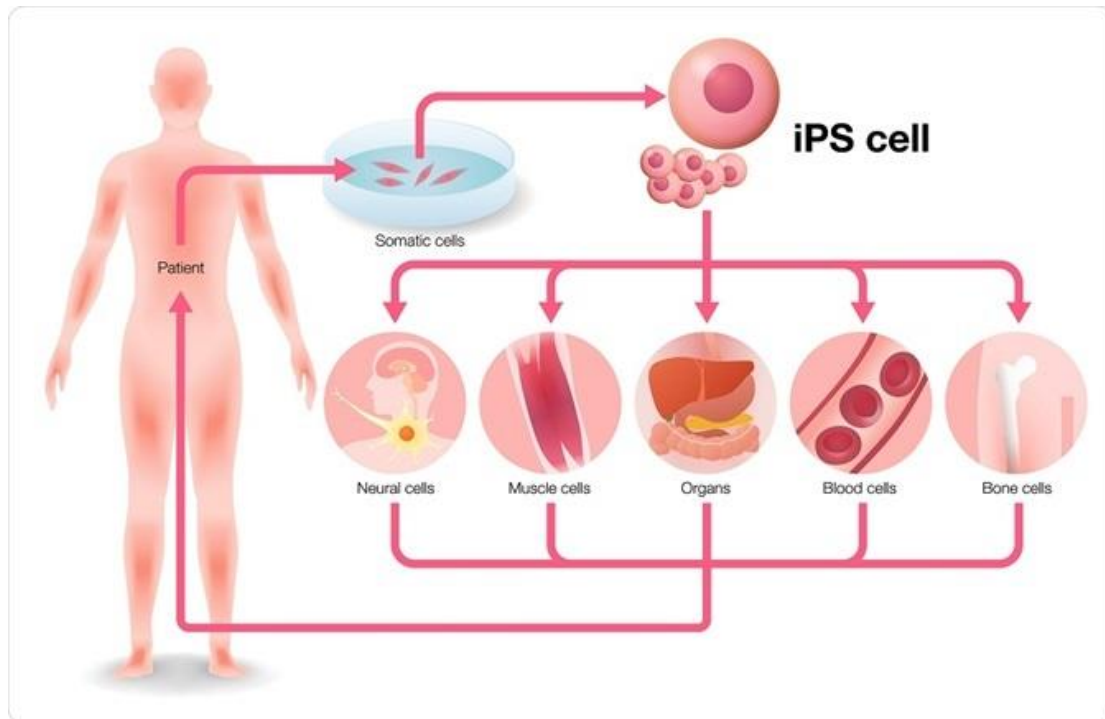
Ωστόσο, οι απομονωμένοι ινοβλάστες δεν είναι συνήθως πολύ καλά καθορισμένοι και συχνά αποτελούνται από διάφορους υποπληθυσμούς με λίγους ειδικούς δείκτες. Επιπλέον, αν και ο σύντομος κυτταρικός κύκλος των ινοβλαστών μπορεί να είναι επωφελής για διαδικασίες κλιμάκωσης, μπορεί να είναι δυσμενής για τη συγκαλλιέργεια, καθώς η σχετική συγκέντρωσή τους είναι δύσκολο να ελεγχθεί. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να παραχθεί η ECM ξεχωριστά, να λυοφιλοποιηθεί σε σκόνη, η οποία μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ικριωμάτων ή υδρογελών για κυτταρική σπορά. Ωστόσο, οι εν λόγω ανασυσταθείσες ECM θα είναι ομοιογενείς, οι οποίες ενδέχεται να μην μπορούν να καλύψουν τους λειτουργικούς, γεωμετρικούς και διαμερισματικούς ρόλους της ECM.

2.1.3 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC's)

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPS), είναι ένας τύπος πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από ενήλικα σωματικά κύτταρα, τα οποία έχουν επαναπρογραμματιστεί γενετικά σε μια κατάσταση που μοιάζει με εμβρυϊκή βλαστική κατάσταση μέσω της εξαναγκασμένης έκφρασης γονιδίων και παραγόντων σημαντικών για τη διατήρηση των καθοριστικών ιδιοτήτων των ES κυττάρων.

Τα κύτταρα iPS ποντικού από ινοβλάστες ποντικού αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2006 από το εργαστήριο Yamanaka στο Πανεπιστήμιο του Κιότο. Τα ανθρώπινα κύτταρα iPS παρήχθησαν για πρώτη φορά ανεξάρτητα από τις ομάδες των

Yamanaka & Thomson από ανθρώπινους ινοβλάστες στα τέλη του 2007. Τα κύτταρα iPS είναι παρόμοια με τα ES κύτταρα από πολλές απόψεις, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των δεικτών ES κυττάρων, των προτύπων μεθυλίωσης της χρωματίνης, του σχηματισμού εμβρυοειδούς σώματος, του σχηματισμού τερατόματος, του σχηματισμού βιώσιμων χμαιρών, της πολυδυναμίας και της ικανότητας να συμβάλλουν σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς in vitro.



Εικόνα 6: Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.

Η επαναστατική ανακάλυψη των κυττάρων iPS επιτρέπει στους ερευνητές να αποκτήσουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα χωρίς την αμφιλεγόμενη χρήση εμβρύων, παρέχοντας μια νέα και ισχυρή μέθοδο για την «αποδιαφοροποίηση» κυττάρων των οποίων η αναπτυξιακή μοίρα είχε παραδοσιακά θεωρηθεί καθορισμένη. Επιπλέον, οι ιστοί που προέρχονται από κύτταρα iPS θα είναι σχεδόν πανομοιότυποι με τον δότη των κυττάρων, γεγονός που αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην έρευνα της μοντελοποίησης ασθενειών και του ελέγχου φαρμάκων.

Η προέλευση των κυττάρων iPS επηρεάζει την επιλογή των παραγόντων επαναπρογραμματισμού, την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού και της διαφοροποίησης. Η ενδογενής έκφραση παραγόντων μεταγραφής μπορεί να

διευκολύνει τη διαδικασία επαναπρογραμματισμού. Τα νευρωνικά βλαστικά κύτταρα ποντικού εκφράζουν υψηλότερα ενδογενή επίπεδα Sox2 και c-Myc από τα ES κύτταρα. Έτσι, δύο μεταγραφικοί παράγοντες, ο εξωγενής Oct4 μαζί με είτε τον Klf4 είτε τον c-Myc, αρκούν για τη δημιουργία iPS κυττάρων από βλαστικά κύτταρα. Οι σκελετικοί μυοβλάστες εκφράζουν ενδογενώς Sox2, Klf4 και c-Myc και μπορούν εύκολα να επαναπρογραμματιστούν σε κύτταρα iPS.

Είναι πιθανόν τα κύτταρα iPS να επιδεικνύουν μνήμη της γονικής προέλευσης και επομένως να έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα διαφοροποίησης σε άλλα κύτταρα ιστών. Στη μελέτη των Kim et al. (2010) αποδείχθη ότι τα κύτταρα iPS που επαναπρογραμματίστηκαν από κύτταρα περιφερικού αίματος μπορούσαν να διαφοροποιηθούν αποτελεσματικά σε κύτταρα αιμοποιητικής σειράς. Διαπιστώθηκε, ωστόσο, ότι τα κύτταρα αυτά παρουσίασαν πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα διαφοροποίησης σε νευρικά κύτταρα. Ομοίως, στη μελέτη των, διαπιστώθηκε ότι τα ανθρώπινα β κύτταρα iPS που προέρχονται από β κύτταρα έχουν την επιγενετική μνήμη και μπορούν να διαφοροποιηθούν ευκολότερα σε κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Τα κύτταρα iPS από διαφορετικές προελεύσεις παρουσιάζουν παρόμοια πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στην αδιαφοροποίητη κατάσταση. Επομένως, η μνήμη θα μπορούσε να είναι επιγενετική και να μην σχετίζεται άμεσα με την πολυδύναμη κατάσταση.

Η κυτταρική πηγή των κυττάρων iPS μπορεί επίσης να επηρεάσει την ασφάλεια των καθιερωμένων κυττάρων iPS. Στη μελέτη των Miura et al. (2009) έγινε σύγκριση της ασφάλειας της νευρικής διαφοροποίησης των κυττάρων iPS ποντικού που προέρχονται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των MEFs, των ινοβλαστών της ουράς, των ηπατοκυττάρων και του στομάχου. Εξετάστηκε η καρκινικότητα. Τα κύτταρα iPS που επαναπρογραμματίστηκαν από ινοβλάστες τ εμφάνισαν πολλά αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα μετά από τρεις εβδομάδες in vitro..

Επιπλέον, στη μελέτη των Tsuji et al. (2010), προ-αξιολογημένα, μη καρκινογόνα και ασφαλή κύτταρα iPS ποντικού μεταμοσχεύθηκαν σε εγκέφαλο ποντικού με ανοσοανεπάρκεια και διαπιστώθηκε ότι παράγαγαν ηλεκτροφυσιολογικά λειτουργικούς νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα in vitro.

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPS) αποτελούν έναν άλλο τύπο κυττάρου που έχει λάβει προσοχή ως πιθανή επιλογή για την καλλιέργεια κρέατος (Holden & Vogel, 2008). Θα πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι η βελτίωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού και η ανάπτυξη μεθόδων για την καθοδήγηση της διαφοροποίησης και της αποδιαφοροποίησης των κυττάρων iPS για τη δημιουργία μυοσωληνίσκων, πρέπει να επιτευχθεί πριν από την ενσωμάτωση των κυττάρων iPS σε πρωτόκολλα καλλιέργειας κρέατος .

Για να βελτιωθεί η ποιότητα του τεχνητού κρέατος, μπορεί να είναι επιθυμητό να συν-καλλιεργηθούν λιποκύτταρα με μυοϊνίδια προκειμένου να βελτιωθεί η υφή, η γεύση και η τρυφερότητα του καλλιεργημένου κρέατος αυξάνοντας αποτελεσματικά το λίπος ενδομυϊκά.

2.1.4 Αποδιαφοροποιημένα κύτταρα (Dedifferentiated Cells)

Ορισμένα ασπόνδυλα και αμφίβια έχουν εξαιρετική ικανότητα αναγέννησης. Τα ψάρια ζέβρα είναι σε θέση να αναγεννούν πλήρως την καρδιά τους, ακόμη και μετά την αφαίρεση του 20% ενώ οι γαιοσκώληκες σχηματίζουν εύκολα δύο νέα αντίγραφα αφού κοπούν στη μέση. Ορισμένα αμφίβια, όπως οι τρίτωνες, δημιουργούν νέα άκρα, ουρές και σαγόνια με δομές ή λειτουργίες πανομοιότυπες με τα χαμένα μέρη του σώματος μετά από ακρωτηριασμό, γεγονός που θεωρείται πλήρης αναγέννηση.

Ωστόσο, σε επίπεδο οργανισμού, τα θηλαστικά έχουν περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης. Η δομή ή οι λειτουργίες ενός κατεστραμμένου οργάνου μπορεί να αποκατασταθούν σε μειωμένο βαθμό σε σύγκριση με την αρχική κατάσταση, και αυτή η «ατελής» αναγέννηση συμβαίνει συνήθως εντός του συγκεκριμένου οργάνου. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι οι ουλές στο δέρμα που αποκαθιστούν την κάλυψη χωρίς εφίδρωση, καθώς και ο ινώδης χόνδρος που παρέχει δομή διαφορετική από τον αρθρικό χόνδρο και επομένως κατώτερες λειτουργίες.

Η αποδιαφοροποίηση θεωρείται ως ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αναγέννηση, καθώς επιτρέπει στα κύτταρα, ιδίως εκείνα που δεν έχουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό, να πολλαπλασιάζονται εκ νέου και να επαναδιαφοροποιούνται, οδηγώντας στην αντικατάσταση των χαμένων κυττάρων.

Η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων μπορεί να συνδεθεί με την απώλεια της εξειδίκευσής τους, όπως η αλλαγή των γονιδίων που εκφράζονται ή η αλλαγή της μορφολογίας τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτά τα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα μπορεί να αποκτήσουν τη δυνατότητα να επαναξειδικευτούν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, ανάλογα με τις συνθήκες στο περιβάλλον τους ή τεχνητά σε εργαστηριακές συνθήκες. Τέσσερις τεχνικές είναι γνωστές:

Γενετική Αναγέννηση: Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την εισαγωγή ειδικών γονιδίων (όπως οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού) σε εξειδικευμένα κύτταρα, ώστε να τα μετατρέψει σε κύτταρα που μοιάζουν περισσότερο με εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ή σε άλλες μορφές αποδιαφοροποιημένων κυττάρων. Επιτυγχάνεται μέσω της εισαγωγής ειδικών γονιδίων ή παραγόντων επαναπρογραμματισμού σε εξειδικευμένα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι επαναπρογραμματιστικοί παράγοντες που μπορεί να είναι και πρωτεΐνες που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και την κυτταρική μορφολογία. Παράγοντες επαναπρογραμματισμού περιλαμβάνουν (OCT3/4, SOX2, KLF4, και c-MYC), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ΤΩΝ iPSCs.

Χημική Αποδιαφοροποίηση: Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί χημικές ουσίες για τη μετατροπή εξειδικευμένων κυττάρων σε μια λιγότερο εξειδικευμένη κατάσταση. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την επαναπροσδιορισμό της κυτταρικής ταυτότητας χωρίς την ανάγκη για γενετική επέμβαση ή εισαγωγή εξωγονιδίων.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη χημική αναγέννηση μπορεί να είναι μικρά μόρια, που επηρεάζουν την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ή τη λειτουργία των πρωτεϊνών στο εσωτερικό των κυττάρων.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη χημική αναγέννηση μπορεί να στοχεύουν σε διάφορα βιολογικά μοριακά μοτίβα, όπως μεταγραφικούς παράγοντες, μεταγενετικούς παράγοντες, μεταλλαγμένους, κλπ. Με τη χρήση αυτών των ουσιών, επιχειρείται να επαναπρογραμματιστούν τα κύτταρα ώστε να υιοθετήσουν μια διαφορετική κυτταρική ταυτότητα ή να επανέλθουν σε μια πιο ανεπτυγμένη κατάσταση.

Χρήση Μοριακών Διακινητών: Ορισμένοι μοριακοί διακινητές μπορούν να μεταφέρουν ειδικά μόρια σε κύτταρα, επηρεάζοντας τη λειτουργία τους και προκαλώντας αποδιαφοροποίηση, ορισμένοι είναι συνδεδεμένοι με ειδικά μόρια

αναγνώρισης που τους επιτρέπουν να συνδέονται με δομικά στοιχεία στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ άλλοι μπορεί να χρησιμοποιήσουν τους μηχανισμούς της διαπερατότητας του κυτταροπλάσματος για τη μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Ένα παράδειγμα μοριακού διακινητή είναι το "receptor-mediated endocytosis", όπου πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με μόρια στην επιφάνεια του κυττάρου μπαίνουν στο εσωτερικό του. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι Α που φέρουν τα μόρια που απαιτούνται, αφαιρούνται από την επιφάνεια του κυττάρου και ενσωματώνονται στην ενδοπλασματική μεμβράνη. Από εκεί θα μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, επιτρέποντας στα μόρια να φτάσουν στον προορισμό τους.

Μεταγενετική Μηχανική: Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη ρύθμιση της επιγενετικής πληροφορίας των κυττάρων χωρίς να αλλάξει η νουκλεοτιδική ακολουθία του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση της πολικότητας του DNA ή της χρωματίνης και με την επίδραση στους επιγενετικούς μηχανισμούς ρύθμισης, όπως η μεθυλοποίηση του DNA και οι μεταγενετικές τροποποιήσεις των ιστών αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση χημικών ενώσεων για την επίδραση στη μεθυλοποίηση του DNA καθώς και τη χρήση νέων τεχνολογιών όπως η CRISPR-Cas9 για την επεξεργασία της επιγενετικής πληροφορίας.

Ωστόσο αποδιαφοροποιημένα χονδροκύτταρα παρουσιάζουν αλλαγή φαινοτύπου μετά από επανειλημμένη καλλιέργεια σε μονοστρώματα. Ο φαινότυπος των σφαιρικών χονδροκυττάρων αλλάζει σε κύτταρα που μοιάζουν με ατρακτοειδή ινοβλαστικά.

Εν τω μεταξύ, η αποδιαφοροποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της έκφρασης του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου II (Col II) προς το κολλαγόνο τύπου I (Col I) και, συνεπώς, μια αντίστοιχη αλλαγή στην παραγωγή της πρωτεΐνης Col II προς την πρωτεΐνη Col I στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM).

Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης επάγει την αποδιαφοροποίηση επιδερμικών κυττάρων, αρθρικών χονδροκυττάρων ή ενδοθηλιακών κυττάρων για την αναγέννηση. Επιπλέον, ορισμένα βιομόρια πυροδοτούν την αποδιαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων μέσω των μονοπατιών της ενεργοποιούμενης με μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK).

Επίσης σχεδιάζονται και δημιουργούνται καινοτόμα βιοϋλικά για τη ρύθμιση της αποδιαφοροποίησης καθώς βελτιώνεται η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της.

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα αποτελούν τις βασικές μονάδες των μυοσωλήνων και των μυοϊνών. Τα διαφοροποιούμενα προγονικά κύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένο μιτωτικό πολλαπλασιασμό πριν από το σχηματισμό μυοσωλήνων, αλλά στη συνέχεια δεν παρουσιάζουν πυρηνικό πολλαπλασιασμό. Οι καλλιέργειες σκελετικών μυϊκών κυττάρων περιλαμβάνουν δύο φάσεις, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Ο πολλαπλασιασμός των αρχέγονων κυττάρων καθορίζει την ποσότητα παραγωγής του καλλιεργούμενου κρέατος, όπου υψηλότερος ρυθμός επέκτασης των κυττάρων επιτυγχάνεται με την αύξηση της αποτελεσματικότητας των κυτταρικών διπλασιασμών. Η διαφοροποίηση είναι μια σημαντική φάση για την επίτευξη των απαιτούμενων χαρακτηριστικών για το τεχνητό κρέας. Επιπλέον, ο έλεγχος του πληθυσμού των SC στην προγονική τους κατάσταση είναι ζωτικής σημασίας, όπου πολλοί παράγοντες εμπλέκονται για τη διατήρηση της κατάστασης των βλαστικών κυττάρων ή των προγονικών κυττάρων.

Στην περίπτωση των μεθόδων καλλιέργειας τεχνητού κρέατος, θα πρέπει να επιλέγονται εξωγενείς ρυθμιστές. Οι εξωγενείς ρυθμιστές που εμπλέκονται στη μυογένεση, οι οποίοι έχουν δοκιμαστεί και βελτιστοποιηθεί ελάχιστα μέχρι σήμερα, θα πρέπει να εξεταστούν για μεθόδους μαζικής καλλιέργειας, έτσι ώστε να επιτευχθεί περαιτέρω πρόοδος στον τομέα της δημιουργίας και της παραγωγής κρέατος. Πριν από μια δεκαετία, δεν υπήρχαν κατάλληλα στοιχεία που να μπορούν να ληφθούν υπόψη για τον έλεγχο της καλλιέργειας τεχνητού κρέατος με ελεγχόμενο τρόπο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η φιμπρονεκτίνη, ένας απαραίτητος και επαρκής παράγοντας για τη σηματοδότηση της πρωτεΐνης τύπου wingless (Wnt) 7a μέσω του υποδοχέα της τάξης frizzled (FZD) 7/της αποσατουράσης στεαροϋλ-CoA (Scd) 4 που μπορεί να ρυθμίσει τον αριθμό των SC. Ακόμη, η κατάσταση των SC ρυθμίζεται από τη μεταβολική δραστηριότητα, για παράδειγμα, η μειωμένη δραστηριότητα του νικοτιναμιδικού αδενινικού δινουκλεοτιδίου (NAD)(+) - αθόρυβη ρύθμιση πληροφοριών τύπου ζευγαρώματος 2 homolog (SIRT) 1 διατηρεί την προγονική ιδιότητα, μέσω του μεταβολικού ελέγχου της ακετυλίωσης H4K16. Ο στρατηγικός μεταβολικός έλεγχος της δραστηριότητας NAD(+)-SIRT1 μπορεί να βοηθήσει στη διαρκή διατήρηση της κατάστασης SC.

Άλλοι εξωγενείς παράγοντες που ρυθμίζουν την κατάσταση SC μέσω της διευκόλυνσης του πολλαπλασιασμού αλλά και του ανταγωνισμού της διαφοροποίησης είναι το κολλαγόνο IV, ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας (TGF), ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης (IGF), ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF), ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων που μοιάζει με τον παράγοντα ασθενούς επαγωγής της απόπτωσης (TWEAK) και η Delta-1. Κατά τη διαφοροποίηση και το σχηματισμό μυοϊνών, η διαλυτή εξωκυττάρια περιοχή του κολλαγόνου XXV και η α 6 ιντεγκρίνη διασπώνται, γεγονός που είναι επαρκές για την προώθηση του σχηματισμού πολυπύρηνων μυοϊνών.

2.2.1 Μέσο καλλιέργειας

Το μέσο καλλιέργειας αποτελεί βασικό παράγοντα κάθε τεχνολογίας που βασίζεται σε κυτταροκαλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής τεχνητού κρέατος. Η προτίμηση του μέσου τόσο για τον πολλαπλασιασμό όσο και για τη διαφοροποίηση είναι μεταβλητή και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύνθεση του μέσου, καθώς και από το κόστος του. Ως εκ τούτου, τα μέσα καλλιέργειας αποτελούν σημαντικό μέρος των οικονομικών και τεχνικών ζητημάτων που σχετίζονται με την παραγωγή του τεχνητού κρέατος επί του παρόντος. Επί του παρόντος, τα μέσα που χρησιμοποιούνται είναι μόνο ένα γενικευμένο μέσο που υποστηρίζει την ανάπτυξη για ευρύ φάσμα κυττάρων.

Στην παραγωγή τεχνητού κρέατος, τα απομονωμένα κύτταρα θα είναι βλαστικά κύτταρα τα οποία θα πολλαπλασιαστούν περαιτέρω σε συγκεκριμένα προγονικά κύτταρα και μετά από αυτά θα οδηγηθούν στη διαφοροποίηση σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα. Ως εκ τούτου, αν και όλα είναι τα ίδια κύτταρα, η κατάσταση των κυττάρων είναι διαφορετική, οπότε και οι απαιτήσεις των κυττάρων αλλάζουν. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη διαμόρφωσης νέου μέσου για κάθε συγκεκριμένη μεταβολική κατάσταση. Αυτή η διατύπωση μπορεί να βοηθήσει στην ταχύτερη ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου, επομένως μπορεί να επιτευχθεί ταχύτερη παραγωγή.

Αν και τα περισσότερα από τα συστατικά των μέσων που χρησιμοποιούνται σήμερα και απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση είναι παρόμοια, τμήματα όπως οι αυξητικοί παράγοντες και τα μόρια που διεγείρουν τη

διαφοροποίηση είναι ζωτικής σημασίας για τη δεύτερη φάση. Ένα τέτοιο συμπλήρωμα είναι ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS) που χρησιμοποιείται ευρέως στην κυτταροκαλλιέργεια λόγω του μη ενεργοποιημένου ανοσοποιητικού συστήματος και της απουσίας πιθανής κυτταροτοξικότητας. Ο FBS είναι πλούσια πηγή αυξητικών παραγόντων και έτσι προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ παρουσιάζει και δυναμική ρυθμιστική ικανότητα.

Παρόλο που το FBS είναι ευεργετικό στις τεχνικές καλλιέργειας κυττάρων, υπάρχουν επίσης περιορισμοί που σχετίζονται με αυτό. Αυτοί περιλαμβάνουν τη μεταβλητότητα από παρτίδα σε παρτίδα, ηθικά ζητήματα και υψηλό κόστος λόγω της εκτεταμένης ζήτησης. Εναλλακτικά, το FBS μπορεί να αντικατασταθεί από κλωνοποιημένους αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες μεμονωμένων κυττάρων ή ισοδύναμα με ορό εκχυλίσματα μικροβιακής προέλευσης για να μειωθεί σημαντικά το κόστος παραγωγής. Ωστόσο, πρέπει να επιλυθούν τα τεχνολογικά εμπόδια που υπάρχουν στην υλοποίηση αυτών των επιλογών, ώστε να ξεπεραστεί αποτελεσματικά το κόστος της παραγωγής μεγάλης κλίμακας.

Η επιλογή του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας είναι ίσως το πιο σημαντικό βήμα στην αρι-στοποίηση της διαδικασίας παραγωγής, καθώς για μία παραγωγή βιομηχανικής κλίμακας θα απαιτηθεί να διατίθεται σε υψηλές ποσότητες. Το μέσο καλλιέργειας πρέπει να παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Θα πρέπει να είναι οικονομικό, κατάλληλο για παρασκευή τροφίμου, άμεσα διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες και αποτελεσματικό στο να προάγει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση μυϊκών κυττάρων. Τα σύγχρονα μέσα που χρησιμοποιούνται για καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών, περιορίζονται σε εργαστηριακές ανάγκες για ερευνητικούς σκοπούς, είναι κυρίως ζωικής προέλευσης και το κόστος τους είναι απαγορευτικό για τη χρήση τους στην παραγωγή κυτταροκαλλιεργειών μεγάλης κλίμακας. Αν και η κατεύθυνση της έρευνας στρέφεται προς την παραγωγή εξ ολοκλήρου συνθετικών μέσων καλλιέργειας, οι τρέχουσες φόρμουλες παρασκευής δεν έχουν καταφέρει να επιτύχουν την αντίστοιχη με τα ζωικής προέλευσης επίδοση και τα περιθώρια βελτίωσης σε αυτό το πεδίο θα επηρεάσουν άμεσα την παραγωγή του κρέατος in vitro.

Το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί στην φάση του πολλαπλασιασμού των βλαστοκυτ-τάρων είναι κατά κανόνα διαφορετικό από το μέσο που θα προκαλέσει και θα συντηρήσει την διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς οι μεταβολικές ανάγκες αλλάζουν, από την χρήση άμεσης πηγής ενέργειας έως την παραγωγή εξειδικευμένων πρωτεϊνών. Γενικά, ένα μέσο πλούσιο σε ορό απαιτείται κατά τη φάση της ανάπτυξης, ενώ αντίθετα ένα μέσο φτωχό σε ορό κατά τη φάση της διαφοροποίησης.

2.2.2 Ορός

Ο FBS είναι επί του παρόντος το τυπικό συμπλήρωμα καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την επέκταση των MSC των κατοικίδιων ζώων και των περισσότερων άλλων τύπων κυττάρων που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Αποτελεί αναπόσπαστο μέρος των γενικών πρακτικών καλλιέργειας κυττάρων για περισσότερα από 50 χρόνια λόγω της εξαιρετικής σύνθεσης των παραγόντων που απαιτούνται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τόσο των ζωικών όσο και των ανθρώπινων κυττάρων. Ο FBS διαθέτει επίσης πολύ χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών σε σχέση με τον ορό από ώριμες αγελάδες, γεγονός που μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης ανοσολογικής αντίδρασης.

Ωστόσο, το FBS εξακολουθεί να απασχολεί τόσο τους ερευνητές όσο και τους κλινικούς ιατρούς λόγω των υψηλών ποσοστών παραλλακτικότητας του προϊόντος, των κλινικών κινδύνων ανεπιθύμητων αντιδράσεων λόγω των βοοειδών πρωτεϊνών ή ασθενειών και των ηθικών προβληματισμών σχετικά με την παραγωγή του.

2.2.3 Αυξητικοί παράγοντες

Μια κρίσιμη ιδιότητα των MSCs για την απομόνωση, την ταυτοποίηση και την καλλιέργειά τους είναι η προσκόλλησή τους στο πλαστικό (plastic). Αν και δεν έχει βρεθεί ακόμη ένας οριστικός παράγοντας στον ορό που να προάγει την προσκόλληση των κυττάρων στο πλαστικό, έχει προταθεί ότι τόσο η φιμπρονεκτίνη όσο και η βιτρονεκτίνη μπορούν να συμβάλουν σε αυτό. Μια μελέτη σε ανθρώπινα MSCs έδειξε ότι οι επιφάνειες καλλιέργειας που έχουν υποστεί προεπεξεργασία με FBS προάγουν

καλύτερη προσκόλληση και πολλαπλασιασμό από ό,τι οι μη επεξεργασμένες επιφάνειες καλλιέργειας. Ενώ σε MSCs ιπποειδών που απομονώθηκαν από αίμα ομφάλιου λώρου δεν έδειξε καμία διαφορά η επικάλυψη με FBS στη φιάλη καλλιέργειας στον πολλαπλασιασμό, σε MSCs μυελού των οστών (BM-MSCs) η ινωδονεκτίνη ήταν απαραίτητη για την κυτταρική προσκόλληση. Ωστόσο, τα MSCs που προέρχονται από το λίπος των ιπποειδών (AD-MSCs) έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς χωρίς επικάλυψη της φιάλης. Επιπλέον, μελέτες καλλιέργειας MSCs απουσία ορού δείχνουν ότι η προσθήκη FBS απαιτείται για την αρχική προσκόλληση κατά το στάδιο της απομόνωσης.

συμβολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων διαφόρων ορμονών, θρεπτικών ουσιών, αυξητικών παραγόντων και άλλων συστατικών του FBS είναι ελάχιστα κατανοητή. Ορισμένοι έχουν προτείνει ότι οι ορμόνες ήταν η κύρια οδός μέσω της οποίας το FBS υποστήριζε την κυτταρική ανάπτυξη. Μέσω της εργασίας που πραγματοποίησαν οι Hayashi & Sato (2016), το FBS αντικαταστάθηκε με τη συμπλήρωση των μέσων με T3, ορμόνη απελευθέρωσης θυρεοτροπίνης, τρανσφερρίνη και παραθυρεοειδική ορμόνη, η οποία διατήρησε με επιτυχία την ανάπτυξη μιας κυτταρικής σειράς υπόφυσης αρουραίου για 10 ημέρες. Αυτή η συνθήκη καλλιέργειας παρήγαγε κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ρυθμό 60-100% εκείνου των καλλιεργούμενων με FBS κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα συστατικά του FBS είναι κρίσιμα για την υποστήριξη της κυτταρικής ανάπτυξης.

Η γλυκόζη είναι ένα από τα καλύτερα κατανοητά μόρια στην επιβίωση των MSC και χρησιμεύει ως παράδειγμα του γιατί η σωστή συμπλήρωση είναι το κλειδί για τη λειτουργία των MSC. Στη μελέτη των Nuschke et al. (2017) διαπιστώθηκε ότι τα ανθρώπινα BM-MSC βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη γλυκόζη, καθώς αυτό το βασικό θρεπτικό συστατικό εξαντλείται γρήγορα, ενώ άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως η L-γλουταμίνη, το πυροσταφυλικό και τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη άλλων κυτταρικών τύπων, χρησιμοποιούνται με φειδώ.

Η παροχή γλυκόζης είναι σημαντική σε όλα τα είδη και τους ιστούς προέλευσης MSC, δεδομένου ότι διαθέτουν πολύ περιορισμένη ενδοκυτταρική αποθήκευση γλυκόζης ή απόθεμα ATP. Ως εκ τούτου, μόλις 3-5 ημέρες στέρησης γλυκόζης στην καλλιέργεια προκαλούν ταχύ κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, οι υψηλές συγκεντρώσεις

γλυκόζης έχουν συσχετιστεί με μειωμένο πολλαπλασιασμό, αυξημένη απόπτωση, χαμηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων και τροποποιημένο δυναμικό διαφοροποίησης.

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι επίσης σημαντικοί για τον πολλαπλασιασμό των MSC. Στη μελέτη των Devireddy et al. (2018) διαπιστώθηκε ότι ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β-1 (TGF-β1) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι όλοι ευεργετικοί για την υποστήριξη της ανάπτυξης των MSC.

Ο πολλαπλασιασμός των ανθρώπινων BM-MSCs ενισχύθηκε σημαντικά με τη χορήγηση TGF-β και bFGF απουσία ορού, ενώ ο TGF-β μόνος του επιβράδυνε τον πολλαπλασιασμό. Παρομοίως, τα μέσα που συμπληρώθηκαν με TGF-β απουσία μόνο ορού οδήγησαν σε λιγότερα AD-MSCs σκύλου, αλλά ο πολλαπλασιασμός βελτιώθηκε όταν προστέθηκαν πρόσθετοι αυξητικοί παράγοντες όπως ο bFGF ή ο PDGF. Σε κύτταρα ιπποειδών, η προσθήκη TGF-β σε μέσα FBS αύξησε τα ποσοστά πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με μέσα που συμπληρώνονταν με απλό FBS, πιθανώς λόγω του ορού που παρείχε άλλους αυξητικούς παράγοντες όπως ο PDGF και ο bFGF. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τις πολύπλοκες επιδράσεις των αυξητικών παραγόντων που απαιτούνται για την κυτταρική ανάπτυξη. Επομένως, απαιτείται περισσότερη έρευνα για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων παραγόντων που παρέχει το FBS για την καλλιέργεια MSC σε διάφορα είδη.

2.2.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

Απουσία πολυπεπτιδίων Wnt, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από ένα σύμπλοκο της κινάσης της καζεΐνης 1 (CK1) και της GSK-3 με τις πρωτεΐνες αξίνη και APC, με αποτέλεσμα να αποικοδομείται. Τα πολυπεπίδια Wnt προσδέονται στους υποδοχείς Frizzled και LRP, προκαλώντας τη φωσφορυλίωση των Dishevelled και LRP. Η φωσφορυλίωση δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για την αξίνη. Η αλληλεπίδραση

της αξίνης στις θέσεις αυτές προκαλεί την αποσταθεροποίηση του συμπλόκου αξίνης/APC/ CK1/ GSK-3, με αποτέλεσμα να μην αποικοδομείται η β-κατενίνη, η οποία συσσωρεύεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Εκεί, η β-κατενίνη σχηματίζει σύμπλοκο με μεταγραφικούς παράγοντες Tcf, μετατρέποντάς τους από καταστολείς σε ενεργοποιητές των γονιδίων-στόχων τους.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

Η Notch λειτουργεί ως υποδοχέας άλλων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (π.χ. της Delta) οι οποίες εντοπίζονται στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων. Επομένως, η Notch ευθύνεται για την άμεση διακυτταρική σηματοδότηση. Άρα εδώ το Notch ΔΕΝ είναι το σήμα! Η πρόσδεση της Delta επάγει την πρωτεολυτική αποκοπή της Notch από τη γ-σεκρετάση (γ-secretase). Η αποκοπή απελευθερώνει την ενδοκυτταρική επικράτεια της Notch, η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα CSL, επάγοντας τη γονιδιακή έκφραση.

2.3 Τεχνικές καλλιέργειας

Η παρούσα ενότητα εξετάζει τη δυνατότητα χρήσης μεθόδων ιστικής και γενετικής μηχανικής για τη δημιουργία βρώσιμου ζωικού κρέατος. Το θέμα αυτό ενδιαφέρει μας ενδιαφέρει επειδή η παραγωγή τεχνητού κρέατος είναι μια πρακτική εφαρμογή της μηχανικής ιστών και της γενετικής μηχανικής, με λιγότερες σημαντικές τεχνολογικές δυσκολίες από ό,τι πολλές κλινικές εφαρμογές.

Ο σκελετικός μυϊκός ιστός αποτελεί την πλειονότητα του βρώσιμου ζωικού κρέατος. Η χρήση μεθόδων μηχανικής ιστών σκελετικών μυών για την παραγωγή είναι μονόδρομος. Οι προσεγγίσεις *in vitro* κατασκευής μπορούν να ταξινομηθούν σε γενικές γραμμές σε στρατηγικές που βασίζονται σε ικρίωματα και σε στρατηγικές αυτοοργάνωσης.

Ο πολλαπλασιασμός των μυοβλαστών, δηλαδή των σκελετικών βλαστικών κυττάρων, η σπορά τους σε ένα ικρίωμα ή σε φορείς όπως ένα πλέγμα κολλαγόνου και στη συνέχεια η αιμάτωσή τους με ένα μέσο καλλιέργειας σε έναν σταθερό ή περιστρεφόμενο βιοαντιδραστήρα, αποτελούν μέρος της τεχνικής που βασίζεται σε ικρίωματα. Όταν εκτίθενται σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τα κύτταρα αυτά συγχωνεύονται σε μυοσωλήνες και τελικά διαφοροποιούνται σε μυοΐνες. Οι μυοΐνες που παράγονται μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν στη συνέχεια να μαγειρευτούν και να καταναλωθούν.

Στη μελέτη των Benjaminson et al. (2014) χρησιμοποιήθηκε η αυτοοργανωτική προσέγγιση και ήταν οι πρώτοι επιστήμονες που χρησιμοποίησαν προσεγγίσεις ιστικής μηχανικής. Καλλιέργησαν σκελετικούς μυς χρυσόψαρου για 7 ημέρες σε ποικίλες συνθήκες και ανακάλυψαν αύξηση της επιφάνειάς του από 5,2% σε 13,8%. Όταν τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια που περιείχε κύτταρα σκελετικών μυών χρυσόψαρου, η επιφάνειά τους αυξήθηκε κατά 79%. Τα εκφυτεύματα επωφελήθηκαν από το γεγονός ότι όλα τα κύτταρα που αποτελούν τον μυ έμοιαζαν καταλλήλως με τη δομή *in vivo*. Ωστόσο, η απουσία κυκλοφορίας του αίματος σε αυτά τα εκφυτεύματα αποκλείει τη σημαντική ανάπτυξη, δεδομένου ότι τα κύτταρα νεκρώνονται όταν απομονώνονται από μια πηγή θρεπτικών ουσιών.

Το κρέας από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς και τα κλωνοποιημένα ζώα χαρακτηρίζονται επίσης ως τεχνητό. Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί έχουν τροποποιήσει τα γονίδια τους μέσω γενετικής μηχανικής ώστε να περιέχουν DNA από άλλο οργανισμό. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τη δημιουργία καλλιεργειών που έχουν τροποποιηθεί ώστε να είναι πλεονεκτικές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες καλλιέργειες. Η κλωνοποίηση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία για την παραγωγή ειδών με τα ακριβή γενετικά χαρακτηριστικά του γονέα τους. Μέχρι στιγμής έχουν κλωνοποιηθεί πρόβατα, χοίροι, κατσίκες, βοοειδή και κουνέλια, αλλά δεν έχουν καταναλωθεί ποτέ.

Παρακάτω θα δούμε οκτώ τεχνικές:

ΤΕΧΝΙΚΗ 1

Αυτή η τεχνική εξηγεί την απομόνωση πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων για χρήση στην παραγωγή *in vitro*. Τα κύτταρα δημιουργούν μυϊκά κύτταρα (μυοκύτταρα), λιποκύτταρα (λιποκύτταρα), κύτταρα οστών (οστεοκύτταρα) και κύτταρα χόνδρου (χρονοκύτταρα). Τα κύτταρα μπορούν να τεμαχιστούν και να απομονωθούν από εμβρυϊκούς ιστούς οποιουδήποτε εμβρύου ζώου εκτός ανθρώπου. Στα βοοειδή, για παράδειγμα, εμβρυϊκοί μεσεγχυματικοί ιστοί που είναι πλούσιοι σε πολυδύναμα μυστέλεχοι τα οποία κατά προτίμηση απομονώνονται από έμβρυα την ημέρα 30 έως 40 ή και νωρίτερα. Μετά την ανατομή, οι εμβρυϊκοί ιστοί μπορούν να τεμαχιστούν σε μικρά κομμάτια μεγέθους περίπου ενός χιλιοστού επί ενός χιλιοστού σε αλατούχο ρυθμισμένο με φωσφορικά («PBS») pH 7,45. Πέντε έως δέκα κομμάτια του ιστού μπορούν να επωαστούν σε 300 μl 0,25% θρυψίνης και 0,1% EDTA σε PBS για τριάντα λεπτά στους 37° C. με ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, οι ιστοί μπορούν να αφεθούν να κατακαθίσουν στον πυθμένα του σωλήνα χωρίς παρέμβαση ή με ήπια φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο που περιέχει το διάλυμα θρυψίνης/EDTA μπορεί στη συνέχεια να αναρροφηθεί και να αντικατασταθεί με 300 μl κολλαγενάσης 0,1% σε PBS για δέκα έως τριάντα λεπτά στους 37° C. Η πέψη κολλαγενάσης μπορεί να επαναληφθεί για αρκετούς κύκλους. Ανάλογα με την οξύτητα του διαλύματος λόγω του DNA που απελευθερώνεται από τα κατεστραμμένα κύτταρα, 40 μl DNase I σε 1 mg/ml σε PBS μπορούν να προστεθούν στο διάλυμα κολλαγενάσης μεταξύ των κύκλων.

Η αντίδραση μπορεί να σταματήσει με την προσθήκη μέσου όπως DMEM ή Ham's F-12, ή και τα δύο σε αναλογία 1:1, (Life Technologies, Rockville, Md.) που συμπληρώνεται με 10 mM HEPES, 2 mM L-γλουταμίνη (Sigma- Aldrich), 10-20% αδραντοποιημένος από τη θερμότητα ορός εμβρύου μόσχου ή βοοειδών (Hyclone Laboratories, Logan, Utah), πενικιλίνη σε 100 μονάδες/ml και στρεπτομυκίνη σε 100 μg/ml («πλήρες μέσο»). Τα κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν πλήρως με ήπια μεταφορά των ιστών με πιπέτα προς τα πάνω και προς τα κάτω και στη συνέχεια πλύσιμο των κυττάρων σε πλήρες μέσο μία ή δύο φορές χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο. Τα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να τοποθετηθούν σε ένα τρυβλίο petri κατάλληλου μεγέθους το οποίο μπορεί να είναι επικαλυμμένο με φυσικά βιοϋλικά (π.χ. κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη ή άλλες εξωκυτταρικές μήτρες) ή συνθετικά βιοϋλικά (π.χ. υδροξυαπατίτης, αλγινικό, πολυγλυκολικό οξύ, πολυγαλακτικό οξύ ή συμπολυμερή), ή και τα δύο, και μπορεί να αναπτυχθεί στους 37°C και να εξισορροπηθεί με 5% CO₂.

ΤΕΧΝΙΚΗ 2

Τα μεσεχγυματικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί, μπορεί να είναι εμπλουτισμένα για μυοβλάστες σε καλλιέργεια. Αρχικά, τα κύτταρα μπορούν να επιστρωθούν διαφορετικά σε διαφορετικούς δίσκους petri μετά από διάσπαση και πλύση. Χρησιμοποιώντας ένα τρυβλίο Petri 60 mm, τα κύτταρα μπορούν πρώτα να επωαστούν σε πλήρες μέσο για δύο έως τέσσερις ώρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, τα επιθηλιακά κύτταρα θα τείνουν να προσκολλώνται γρήγορα στο τρυβλίο Petri ενώ οι μυοβλάστες παραμένουν στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο μπορεί στη συνέχεια να συλλεχθεί και οι μυοβλάστες μπορούν να επιστρωθούν σε διαφορετικό τρυβλίο Petri επικαλυμμένο με φυσικά ή συνθετικά βιοϋλικά. Οι μυοβλάστες μπορούν να εμπλουτιστούν συμπληρώνοντας τα μέσα ανάπτυξης με αυξητικούς παράγοντες. Περαιτέρω, οι μυοβλάστες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυοβλάστες ή μυϊκά κύτταρα καλλιεργώντας τους σε πλήρες μέσο ή σε ελάχιστο μέσο (π.χ. πλήρες μέσο μείον τον ορό εμβρύου μόσχου) συμπληρωμένο με ειδικούς για τους μυϊκούς παράγοντες ανάπτυξης ή διαφοροποίησης. Για να μιμηθούν καλύτερα in vivo μυϊκά κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά νευρώνονται από νευρωνικά κύτταρα, το μέσο καλλιέργειας μπορεί επίσης να συμπληρωθεί με κατάλληλους νευροδιαβιβαστές όπως ως ακετυλοχολίνη.

ΤΕΧΝΙΚΗ 3

Εναλλακτικά, οι μυοβλάστες μπορεί να είναι εμπλουτισμένοι από πολύ ισχυρό εμβρυϊκό στέλεχος. Ισχυρά κύτταρα μπορούν να προέρχονται από γονιμοποιημένα in vitro ωάρια ενός ζώου χρησιμοποιώντας τεχνικές γονιμοποίησης in vitro, απόστέλεχομένων κύτταρων που υπάρχουν στον ομφάλιο λώρο ή τον πλακούντα ή από Embryonic(ES) κύτταρα που απομονώθηκαν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Τα κύτταρα ES, για παράδειγμα, μπορούν να συλλεχθούν, να διαχωριστούν ήπια με θρυψίνη και να καλλιεργηθούν in vitro με ανασυνδυασμένο ανασταλτικό παράγοντα (Chemicon, San Diego, Καλιφόρνια) και κύτταρα τροφοδοσίας όπως κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών που διακόπηκε η ανάπτυξη. Αυτά τα πανίσχυρα κύτταρα μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία με αυξητικούς παράγοντες όπως για να προκαλέσουν τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε μυοβλάστες.

ΤΕΧΝΙΚΗ 4

Χρησιμοποιώντας πρότυπη ανοσοϊστοχημεία ή τεχνικές in situ υβριδισμού, μπορούν να εντοπιστούν μυοβλάστες ή μυοκύτταρα (διαφοροποιημένα μυϊκά κύτταρα). Εν συντομία, οι μυοβλάστες ή τα μυοκύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια μπορούν να μεταφερθούν σε γυάλινες πλάκες επικαλυμμένες με κατάλληλη εξωκυτταρική μήτρα όπως περιγράφεται παραπάνω. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν στον επιθυμητό αριθμό και διαφοροποίηση χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω. . Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ενδοκυτταρικοί δείκτες αντισωμάτων ή ανιχνευτές νουκλεοτιδίων. Οι μεμβράνες μπορούν να είναι διαπερατές με 1% NP-40 ή Triton-X. Αντισώματα έναντι δεικτών ειδικών για μυοβλάστες ή μυοκύτταρα όπως η μυοσίνη, η τιτίνη, η άλφα-ακτινίνη που διατίθενται από τη Sigma® μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση των κυττάρων χρησιμοποιώντας τυπικές τεχνικές φθορίζουσας ανοσοϊστοχημείας. Εναλλακτικά, μονόκλωνοι ανιχνευτές RNA ή DNA για αυτούς τους δείκτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για υβριδισμό in situ. Επιπλέον, όταν τα μυϊκά κύτταρα έχουν προσκολληθεί σε μια τρισδιάστατη δομή στήριξης όπως αποκαλύπτεται παρακάτω, μπορούν να καταψυχθούν, να τεμαχιστούν και να ταυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας δείκτες αντισωμάτων όπως αντισώματα κατά της μυοσίνης, τιτίνης, 12101, τροπονίνης T, άλφα ακτινίνης που διατίθενται από Sigma®.

ΤΕΧΝΙΚΗ 5

Δισδιάστατα ικρίσματα ή στηρίγματα μπορούν να σμιλευτούν από φυσικά βιοϋλικά (π.χ. κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη ή άλλη εξωκυτταρική μήτρα) ή συνθετικά βιοϋλικά (π.χ. υδροξυαπατίτης, αλγινικό, πολυγλυκολικό οξύ, πολυγαλακτικό οξύ και τα συμπολυμερή τους) ή και τα δύο. Κατά προτίμηση, τα τρισδιάστατα ικρίσματα είναι σμιλεμένα με διακλαδώσεις για τα θρεπτικά συστατικά και τα μέσα καλλιέργειας να φτάσουν στην εσωτερική μάζα των σχηματιζόμενων μυϊκών ιστών. Η δομή στήριξης είναι κατά προτίμηση σμιλεμένη σε διαφορετικά μεγέθη, σχήματα και μορφές για να επιτρέπει την ανάπτυξη μυϊκών ιστών που μοιάζουν με διαφορετικούς τύπους κρέατος όπως μπριζόλα, φιλέτο, κότσι, στήθος κοτόπουλου, μπαστούνι, αρνίσια παιδάκια, φιλέτο ψαριού, ουρά αστακού κ.λπ.

ΤΕΧΝΙΚΗ 6

Τα λιποκύτταρα, τα χονδροκύτταρα και οι οστεοβλάστες είναι όλα ικανά να διαφοροποιηθούν από το πολυδύναμο μεσεγχυματικό στέλεχος ή εμβρυϊκό στέλεχος και οστέοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν. Τα κύτταρα μπορούν

να καλλιεργηθούν σε DMEM, ή Ham's F-12, ή και τα δύο σε αναλογία 1:1. Το μέσο μπορεί να συμπληρωθεί με αυξητικούς παράγοντες. Για τα λιποκύτταρα, η διαφοροποίηση μπορεί να επιτευχθεί με τη τεχνική με μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών ("BMP") όπως η BMP-4 και η BMP-2, που είναι γνωστό ότι προκαλούν δέσμευση στη γενεαλογία των λιποκυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι μυοβλάστες μπορεί ακόμη και να προκληθούν να διαφοροποιηθούν σε λιποβλάστες (πρόδρομοι λιποκυττάρων) θεραπεύοντας κύτταρα μυοβλαστών ή κύτταρα δορυφόρικα μυών με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Ετσι, κρέας με την επιθυμητή ποσότητα περιεκτικότητας σε λίπος μπορεί να παραχθεί με σπορά και συγκαλλιέργεια μυϊκών κυττάρων και λιποκυττάρων σε μια ορισμένη αναλογία. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να αφεθούν να διαφοροποιηθούν αρχικά σε μυοβλάστες και στη συνέχεια σε μεταγενέστερο χρόνο. Αυξητικοί παράγοντες μπορεί να προστεθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικούς χρόνους έκθεσης για να διαφοροποιηθούν οι μυοβλάστες σε λιποκύτταρα όπως επιθυμείται. Επιπλέον, η ανάπτυξη των μυϊκών κυττάρων και των λιποκυττάρων μπορεί να ρυθμιστεί ελέγχοντας τη συγκέντρωση των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, εάν επιθυμούμε λιγότερα λιποκύτταρα στην τελικό προϊόν, μικρότερες συγκεντρώσεις παραγόντων BMP μπορεί να προστεθούν στην καλλιέργεια.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ 7

Χονδροκύτταρα ή κύτταρα χόνδρου μπορούν επίσης να απομονωθούν από το γόνατο ή τα πλευρά ενός ζώου. Ο αποκομμένος ιστός από το γόνατο ή τα πλευρά μπορεί να κοπεί, να υποστεί πέψη με κολλαγενάση και να πλυθεί με πλήρες μέσο. Τα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να επιστρωθούν διαφορετικά για να αυξηθεί η καθαρότητα των χονδροκυττάρων. Είναι γνωστό ότι τα χονδροκύτταρα διαφοροποιούνται ως απόκριση στη μηχανική καταπόνηση. Τα χονδροκύτταρα μπορεί αρχικά να σχηματίσουν ένα πρώτο στρώμα κυττάρων υποστήριξης σε ένα τρισδιάστατο ικρίωμα. Οι μυοβλάστες ή τα κύτταρα λιποκυττάρων, ή και τα δύο, μπορούν στη συνέχεια να σπαρθούν στο στρώμα των χονδροκυττάρων και να αναπτυχθούν στο επιθυμητό μέγεθος. Ως εκ τούτου, η στιβάδα των χονδροκυττάρων μπορεί να παρέχει πρόσθετους παράγοντες πρόσφυσης ή ανάπτυξης στα μυϊκά κύτταρα.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ 8

Τα μυϊκά κύτταρα που αναπτύσσονται in vitro διαφέρουν από τα μυϊκά κύτταρα που αναπτύσσονται in vivo. Καθώς οι μύες χρησιμοποιούνται in vivo, τα μυϊκά κύτταρα, για παράδειγμα στα άκρα, συστέλλονται και χαλαρώνουν ανάλογα με την κίνηση. Έτσι, για πιο στενή μίμηση της ανάπτυξης μυϊκών κυττάρων in vivo, τα κύτταρα που αναπτύσσονται in vitro μπορεί να εκτεθούν σε ηλεκτρικό ή ταλαντευόμενο ρεύμα ή σε παλμούς ηλεκτρικού ή ταλαντευόμενου ρεύματος για να συστέλλονται. Οι ηλεκτρικοί ανιχνευτές μπορούν να βυθιστούν στο μέσο καλλιέργειας για την παροχή ήπιου ρεύματος, εναλλακτικά, η δομή στήριξης μπορεί να είναι επικαλυμμένη με ηλεκτρικά αγώγιμα υλικά.

2.3.1 Τεχνική αυτοοργάνωσης (Self-Organising Technique)

Μια πιο φιλόδοξη μέθοδος για την παραγωγή κρέατος υψηλής δομής *in vitro* είναι η χρήση εμφυτευμένου ζωικού μυϊκού ιστού. Περιλαμβάνει τη δημιουργία αυτοοργανωμένου μυϊκού ιστού ή τον *in vitro* πολλαπλασιασμό υπάρχοντος μυϊκού ιστού.

Οι Benjaminson et al. (2014) διερεύνησαν κατά πόσον ομόλογα κύτταρα ενήλικου μυϊκού ιστού μπορούν να συνδεθούν και να αναπτυχθούν σε ένα υπόστρωμα. Τεμάχια ιστού χρυσόψαρου τεμαχίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για να δημιουργηθούν σφαιρίδια, τοποθετήθηκαν σε πλάκες Petri με ένα μείγμα διατροφής και καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε μια σειρά από μέσα ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου εμβρυϊκού ορού βοοειδών, εκχυλίσματος ιχθυαλεύρου και διαφόρων εκχυλισμάτων μανιταριών) για να κατανοηθεί το πώς το καθένα βοήθησε στην ανάπτυξη του εκ νέου φυτεμένου μυϊκού ιστού και να εντοπιστούν πιθανά υποκατάστατα του εμβρυϊκού ορού βοοειδών. Μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας, το 81% των 48 καλλιεργειών παρουσίασε προσκόλληση ιστού στο δοχείο καλλιέργειας, το 63% αυτοθεραπεία και το 74% κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όταν χρησιμοποιήθηκε εμβρυϊκός ορός βοοειδών ως θρεπτικό μέσο, ο εκφυτευμένος ιστός αυξήθηκε κατά περίπου 14% και κατά περισσότερο από 13% όταν χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μανιταριού *maitake*. Μετά από μία εβδομάδα σε καλλιέργεια που περιείχε κύτταρα σκελετικών μυών χρυσόψαρου, η επιφάνεια των εκφυτευμάτων αυξήθηκε κατά 79%. Οι νεοσχηματιζόμενοι ιστοί έμοιαζαν με φρέσκα φιλέτα ψαριού και μαρινάρονταν σε ελαιόλαδο και σκόρδο και τηγανίζονταν πριν υποβληθούν σε επιτροπή αισθητήρων για αξιολόγηση. Η επιτροπή οργανοληπτικής αξιολόγησης ανέφερε ότι ο νεογέννητος ιστός φαίνονταν και μύριζε βρώσιμος.

Στη μελέτη των Li et al. (2018) καθιερώθηκε ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων χοίρου. Οι μύες κόπηκαν σε μικρά κομμάτια, φυγοκεντρήθηκαν για να απομονωθούν τα κύτταρα και να δημιουργηθούν σφαιρίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri για να πολλαπλασιαστούν χρησιμοποιώντας ένα μέσο ανάπτυξης με εμβρυϊκό ορό βοοειδών

και πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και ένα μέσο διαφοροποίησης με ορό αλόγου. Η αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού δείχνει περίπου 70% πολλαπλασιασμό σε μια εβδομάδα.

Στη μελέτη των Wang et al. (2018) πραγματοποιήθηκε συλλογή κυττάρων σκελετικών μυών κατσίκας, τα οποία πολλαπλασιάστηκαν σε ποσοστό 80% χρησιμοποιώντας μέσο ανάπτυξης με ορό εμβρύου βοοειδών και μέσο διαφοροποίησης με ορό αλόγου. Οι παραπάνω μελέτες αποδεικνύουν την ισχύ του εμβρυϊκού ορού βοοειδών και του ορού αλόγου στον πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων. Συνολικά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την καθιέρωση πρωτοκόλλων με τη χρήση των αντιδραστηρίων έναντι διαφόρων ζωικών μυϊκών κυττάρων για την *in vitro* παραγωγή κρέατος με την αυτοοργανωτική τεχνική.

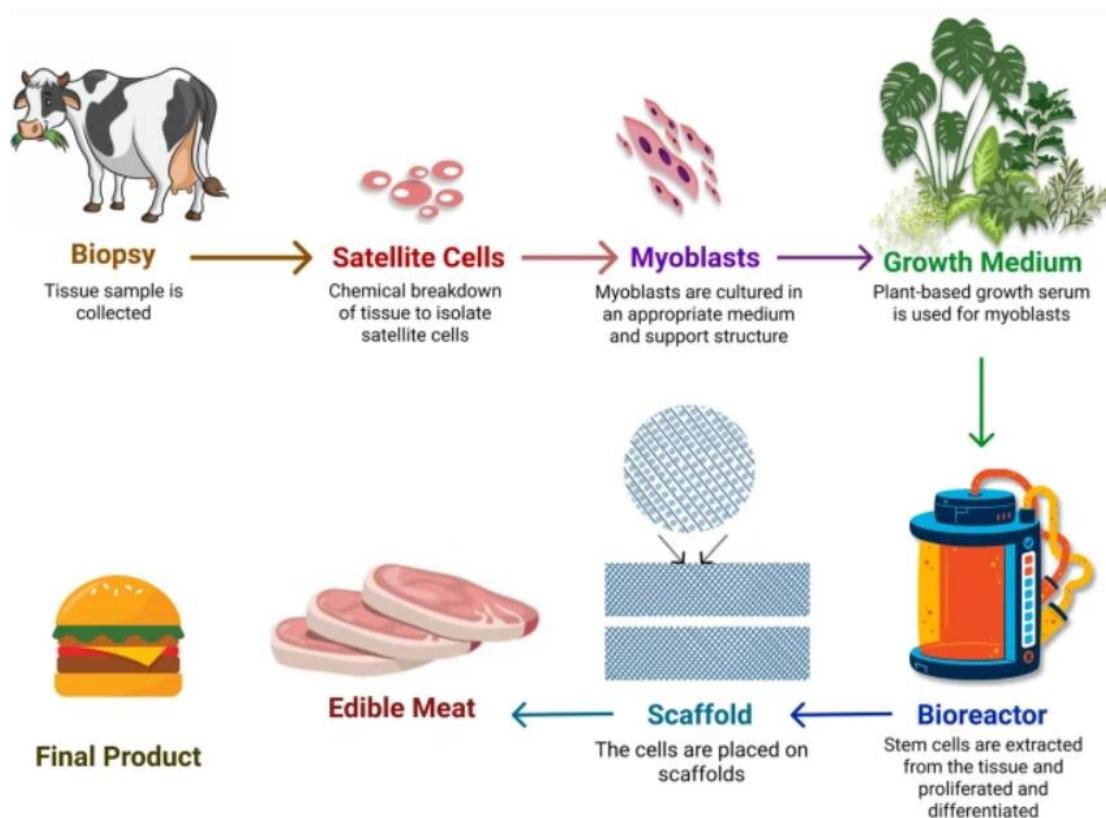
2.3.2 Τεχνική ικρίωμάτων (Scaffold Technique)

Για ένα σύστημα παραγωγής κρέατος *in vitro* με βάση το ικρίωμα θα απαιτηθεί ο διαχωρισμός εμβρυϊκών μυοβλαστών από αγροτικά ζώα, όπως βοοειδή, πρόβατα και χοίρους, και η ανάπτυξή τους σε σταθερό ή περιστρεφόμενο βιοαντιδραστήρα με χρήση μέσου ανάπτυξης φυτικής προέλευσης. Αυτά τα κύτταρα θα διαιρούνταν και θα ξαναδιαιρούνταν για εβδομάδες ή μήνες, μετασχηματιζόμενα τελικά σε μυϊκές ίνες σε ένα ικρίωμα εντός του βιοαντιδραστήρα.

Δεν έχει ακόμη σχεδιαστεί και κατασκευαστεί ένας βιοαντιδραστήρας μεγάλης κλίμακας ικανός για μαζική καλλιέργεια κρέατος, καθώς η δημιουργία μυών απαιτεί τη χρήση ενός κυκλοφορικού συστήματος για την παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στα αναπτυσσόμενα κύτταρα ή ίνες, ενώ παράλληλα αποβάλλονται τα μεταβολικά απόβλητα. Αν και μικροσκοπικά κομμάτια μυών λαμβάνουν επαρκή θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο μέσω διάχυσης, δεν έχουν αναπτυχθεί καλλιεργημένοι μύες με ενσωματωμένες αρτηρίες αίματος για την παροχή οξυγόνου και θρέψης.

Αν και αρκετές μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων είναι ήδη προσβάσιμες, το πιο δύσκολο βήμα για την παραγωγή τεχνητού κρέατος είναι ο προσδιορισμός της

βέλτιστης σύνθεσης του μέσου καλλιέργειας. Το μέσο θα πρέπει να είναι φθινό, να αποτελείται εξ ολοκλήρου από συστατικά ποιότητας τροφίμων, να είναι ευρέως προσβάσιμο σε μεγάλες ποσότητες και να είναι αποτελεσματικό στη διατήρηση και ενθάρρυνση της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των μυϊκών κυττάρων. Στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζεται το περίγραμμα της τεχνικής scaffolding για την παραγωγή τεχνητού κρέατος.



Εικόνα 7: Η τεχνική Scaffolding.

2.3.3 Βιοαντιδραστήρες (Bioreactors)

Οι στατικοί βιοαντιδραστήρες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς και συνεπάγονται τη σπορά των κυττάρων σε ένα ικρίωμα, ακολουθούμενη από την προσθήκη κατάλληλων μέσων ανάπτυξης και την καλλιέργεια σε επωαστήρα. Η παραγωγή τεχνητού κρέατος θα χρειαστεί την ανάπτυξη νέων βιοαντιδραστήρων ικανών να διεγείρουν την ανάπτυξη ιστών και να διατηρούν χαμηλή διάτμηση και ομοιόμορφη αιμάτωση σε υψηλούς όγκους. Οι περιστρεφόμενοι βιοαντιδραστήρες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην έρευνα μηχανικής ιστών σκελετικών μυών.

Η βιοδιεργασία χωρίζεται σε τέσσερα στάδια: πολλαπλασιασμός των κυττάρων, διαφοροποίηση των κυττάρων, παραγωγή προϊόντων και αξιοποίηση των

αποβλήτων. Η πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος στο οποίο πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται τα μυϊκά κύτταρα διακρίνει τη βιοεπεξεργασία κρέατος *in vitro* από τις υπάρχουσες βιοεπεξεργασίες.

Ο βιοαντιδραστήρας με περιστρεφόμενο τοίχωμα δοχείου περιστρέφεται με ρυθμό που εξισορροπεί τη φυγόκεντρο δύναμη, τη δύναμη αντίστασης και τη δύναμη βαρύτητας και βυθίζει την τρισδιάστατη καλλιέργεια στο μέσο, βοηθώντας στην ανάπτυξη ιστού με δομή συγκρίσιμη με εκείνη που συναντάται *in vivo*. Οι βιομηχανικές δυνάμεις βοηθούν στη δημιουργία στρωτής ροής του μέσου, η οποία βελτιώνει τη διάχυση και επιτυγχάνει υψηλό ρυθμό μεταφοράς μάζας με χαμηλό επίπεδο διατμητικής τάσης.

Οι βιοαντιδραστήρες άμεσης αιμάτωσης είναι ένας άλλος τύπος που ταιριάζει καλύτερα στην καλλιέργεια με ικριώματα. Το μέσο σε αυτό το σενάριο τρέχει μέσω ενός πορώδους ικριώματος και η ανταλλαγή αερίων πραγματοποιείται σε έναν εξωτερικό βρόχο υγρού. Αυτό το είδος βιοαντιδραστήρα έχει υψηλό ρυθμό μεταφοράς μάζας και σημαντικά χαμηλή διατμητική τάση.

2.3.4 Διέγερση των κυττάρων (Stimulation of cells)

Ηλεκτρική διέγερση

Η εφαρμογή ηλεκτρικών ερεθισμάτων κατά την *in vitro* καλλιέργεια κρέατος είναι σημαντική για την ανάπτυξη ώριμων μυϊκών ινών. Η δραστηριότητα συστολής ενισχύει τη διαφοροποίηση των μυοσωλήνων σε διαφορετικές ισομορφές της αλυσίδας μυοσίνης για την ανάπτυξη των σαρκομερίων. Η ηλεκτρική διέγερση είναι χρήσιμη για τον ακριβή έλεγχο της μηχανικής λειτουργίας των μυών. Λόγω της ενεργού συστολής των μυών, οι μυϊκές κατασκευές ασκούν δύναμη με τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου σε βιοαντιδραστήρες. Ωστόσο, η δύναμη που παράγεται από τις μυϊκές κατασκευές είναι μόνο το 2-8% της δύναμης που παράγεται από τους ώριμους σκελετικούς μύες.

Μηχανική διέγερση

Η μηχανική διέγερση είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός που μπορεί να παρέχει μηχανικά ερεθίσματα στα κύτταρα με τη βοήθεια υποδοχέων ιντεγκρίνης που προσδένονται στην πρωτεΐνη της εξωκυτταρικής μήτρας των κυττάρων για να αναπτύξουν ένα αδιάλυτο πλέγμα. Τα γεγονότα αυτά επάγουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα ηρεμίας ενεργοποιούνται από την κυκλική καταπόνηση, αυξάνοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών (Kook et al., 2008). Η μηχανική διέγερση μπορεί να επηρεάσει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στους μύες και η εφαρμοζόμενη έκταση, ο χρόνος και η συχνότητα του ερεθίσματος είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εφαρμογή των μηχανικών ερεθισμάτων.

2.3.5 3D εκτύπωση οργάνων ή βιοεκτύπωση/ 3D Bioprinting

Η τρισδιάστατη (3D) εκτύπωση οργάνων ή βιοεκτυπώσεων βασίζεται στις συμβατικές αρχές εκτύπωσης. Για τη δημιουργία του πρωτοτύπου του βιοπροϊόντος χρησιμοποιείται λογισμικό σχεδιασμού με τη βοήθεια υπολογιστή (CAD). Τα κύτταρα ψεκάζονται πάνω σε πηκτές σύμφωνα με το CAD και, κατά την καλλιέργεια, τα κύτταρα συγχωνεύονται για να σχηματίσουν το βιο-προϊόν, το οποίο μπορεί να έχει τη βασική κυτταρική δομή και την αγγείωση για την παροχή αίματος.

Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση είναι μία από τις πιο αποτελεσματικές και ελκυστικές τεχνικές για τη δημιουργία λειτουργικά και ανατομικά πανομοιότυπων οργάνων ή ιστών για αναγεννητικές εφαρμογές ιστών και οργάνων. Καταθέτει με ακρίβεια βιοϋλικά και διάφορους τύπους κυττάρων σε μια ενιαία τρισδιάστατη αρχιτεκτονική ιστού. Η 4D εκτύπωση, η οποία χρησιμοποιεί συγκρίσιμη τεχνολογία, επεκτείνει την τρισδιάστατη εκτύπωση και προσθέτει μια άλλη διάσταση αλλοίωσης με την πάροδο του χρόνου. Τα όργανα ή οι ιστοί-στόχοι είναι ευαίσθητοι στην υγρασία και τη θερμοκρασία και η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την αποκατάσταση μυών, οστών και καρδιαγγειακών ιστών.

Το 2021, η Aleph Farms, σε συνεργασία με το Technion, το Ινστιτούτο Τεχνολογίας του Ισραήλ, καλλιέργησε με επιτυχία την πρώτη μπριζόλα rib-eye στον κόσμο χρησιμοποιώντας τρισδιάστατη βιοεκτύπωση. Διαθέτει λίπος παρόμοιο με το

κανονικό κρέας και η εταιρεία δηλώνει ότι στο μέλλον θα είναι σε θέση να παράγει οποιοδήποτε είδος κρέατος με την τεχνολογία αυτή.

Κεφάλαιο 3: Εξέλιξη στην παραγωγή τεχνητού κρέατος

3.1 Κοινωνικές και οικονομικές πτυχές των συστημάτων παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια

Το σύστημα παραγωγής κρέατος απαιτεί λιγότερη χρήση νερού, γης, σιτηρών ζωοτροφών και ενέργειας σε σύγκριση με το παραδοσιακό σύστημα κτηνοτροφίας (Tu. Επιπλέον, μπορεί να εμφανίσει υψηλότερο ποσοστό μετατροπής σε βρώσιμο κρέας από το παραδοσιακό κτηνοτροφικό σύστημα που εμφανίζει ποσοστό μετατροπής 5%-25%. Έτσι θα μπορούσε να αποτελέσει μια ιδανική εναλλακτική λύση λόγω της δυνητικής βιωσιμότητας και των περιορισμένων περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Για παράδειγμα, ένας βιοαντιδραστήρας 20 m³, το μεγαλύτερο μέγεθος για την παραγωγή καλλιεργημένου κρέατος σήμερα, θα μπορούσε να παράγει 25.600 kg τεχνητού κρέατος ετησίως.

Υποθέτοντας ότι δεν υπάρχουν απώλειες κατά τη διαδικασία παραγωγής, αυτό αντιπροσωπεύει μια εκτιμώμενη παροχή τ για 2.560 άτομα ετησίως. Ο υπολογισμός για τη σίτιση 2.560 ατόμων βασίζεται στους Van der Weele & Tramper (2014), οι οποίοι υπέθεσαν ότι όλοι στον κόσμο θα τρώνε 25-30 ημέρα (10 kg/έτος). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η εν λόγω παραγωγή απαιτεί μόνο λίγες ώρες εργασίας την ημέρα για τη συντήρηση του βιοαντιδραστήρα, είναι μια δυνητικά χαμηλού κόστους εναλλακτική λύση στο σημερινό σύστημα διατροφής.

Ένα άλλο οικονομικό όφελος θα μπορούσε να βρεθεί στη διανομή του, με την τοποθέτηση των εγκαταστάσεων κοντά στις πόλεις, το κόστος μεταφοράς μπορεί να μειωθεί σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον, όσον αφορά τα απόβλητα τροφίμων, η παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής έχει μεγάλο πρόβλημα στη διαχείριση των

αποβλήτων, επειδή ολόκληρο το σφάγιο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατανάλωση.

Ένα άλλο σημείο το οποίο θα πρέπει να αναφερθεί είναι ότι το σημερινό κτηνοτροφικό σύστημα επηρεάζει αρνητικά το περιβάλλον, προκαλώντας ανησυχίες για την περιβαλλοντική βιωσιμότητα. Η ρύπανση αυτή προκαλείται από την κτηνοτροφία και την παραγωγή ζωοτροφών, καθώς και από την επεξεργασία των προϊόντων, αυξάνοντας με τη σειρά της τη ζήτηση νερού (Steinfeld et al., 2006).

Για την παραγωγή 1 kg βοδινού κρέατος απαιτούνται 15.495 L νερού και το 99% της εν λόγω κατανάλωσης νερού χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των σιτηρών και των ακατέργαστων ζωοτροφών (π.χ. βοσκότοποι, ξηρός σανός και σιλό). Μόνο το 1% του νερού (περίπου 155 L) χρησιμοποιείται για πόση και εξυπηρέτηση των ζώων. Η ζήτηση αποδίδεται κυρίως στην απαίτηση πόσιμου νερού για τα ζώα, καθώς και στην ανάπτυξη των καλλιεργειών και των φυτών.

Σε γενικές γραμμές, η κτηνοτροφία απαιτεί το 30% της συνολικής επιφάνειας της γης, το 33% της καλλιεργούμενης γης για ζωοτροφές και 26% για βοσκότοπους. Ωστόσο, τα συστήματα παραγωγής με καλλιέργεια κυττάρων χρησιμοποιούν μόνο το 1% της γης που απαιτείται για τα παραδοσιακά συστήματα.

Παρ' όλα αυτά, η υπόθεση αυτή περιορίζεται στην δημιουργία βιομάζας ενός μέσου καλλιέργειας με βάση τα φύκια και ως εκ τούτου, το κόστος και η αποτελεσματικότητα της διαφορετικών μέσων καλλιέργειας είναι αβέβαια. Παρόλο που τα συστήματα με καλλιέργεια απαιτούν λιγότερη γη από τα παραδοσιακά, το σύστημα παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια απαιτεί τουλάχιστον **τέσσερις φορές περισσότερη ενέργεια** από την παραδοσιακή κτηνοτροφία. Αναλυτικότερα, το καλλιεργημένο κρέας απαιτεί 18-25 GJ/t άμεσης ενέργειας ενώ για την παραγωγή παραδοσιακού κρέατος απαιτούνται 4,5 GJ/t άμεσης ενέργειας.

Η κτηνοτροφική παραγωγή καταναλώνει άμεση ενέργεια, όπως ο φωτισμός, η θέρμανση και η ψύξη, ενώ τα συστήματα παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια απαιτούν ενέργεια για την καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων, καθώς και για την αποστείρωση και την υδρόλυση του υλικού βιομάζας που απαιτείται στα μέσα κυτταροκαλλιέργειας.

Η κτηνοτροφία παρέχει το ένα τέταρτο του συνόλου της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και το 15% της ενέργειας που καταναλώνεται στα τρόφιμα, και συμβάλλει επίσης στο 18% των παγκόσμιων εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και στο 37% των εκπομπών μεθανίου στην ατμόσφαιρα, οι τιμές των οποίων είναι υψηλότερες από εκείνες των παγκόσμιων μεταφορών (FAO, 2012). Η παραγωγή κρέατος με καλλιέργεια θα επηρέαζε κατά τεκμήριο λιγότερο το περιβάλλον σε σύγκριση με τη συμβατική γεωργία. Ειδικότερα, η μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου θα αποτελούσε σημαντικό πλεονέκτημα.

Ένα άλλο ζήτημα αποτελεί η ευημερία των ζώων . Περίπου 56 δισεκατομμύρια ζώα σφάζονται για το κρέας τους κάθε χρόνο . Ως εκ τούτου, η παραδοσιακή ευημερία των ζώων που σχετίζεται με την κτηνοτροφική παραγωγή αποτελεί μια σημαντική παγκόσμια ηθική ατζέντα. Τα συστήματα παραγωγής καλλιεργημένου κρέατος έχουν αναδειχθεί ως καλές εναλλακτικές λύσεις.

Παρά τα πλεονεκτήματα του τεχνητού κρέατος που σχετίζονται με την καλή διαβίωση των ζώων και το περιβάλλον, η εμπορική επιτυχία του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το αν θα μπορούσε να είναι μια επιθυμητή επιλογή για τους χορτοφάγους, τους vegans και τα άτομα που απορρίπτουν την κατανάλωση κρέατος για ηθικούς λόγους.

Επιπλέον, η εμπορική επιτυχία εξαρτάται και από την αντίληψη των καταναλωτών και διάφορες κοινωνικές ανησυχίες, όπως η φυσικότητα, τα ζητήματα ασφάλειας και προστασίας των τροφίμων, η επίδραση της διαμόρφωσης, η νομοθεσία, η θρησκεία και η ηθική. Ως εκ τούτου, η αποδοχή του είναι αμφιλεγόμενη.

Ένα από τα πιο συνηθισμένα εμπόδια που σχετίζονται με το τεχνητό κρέας είναι ο τεχνητός του χαρακτήρας. Οι καταναλωτές συνήθως δεν αποδέχονται εύκολα νέες τεχνολογίες, όπως οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί, όταν έχουν περιορισμένες πληροφορίες για τη συγκεκριμένη τεχνολογία. Επιπλέον, οι επιδράσεις πλαισίωσης για το καλλιεργημένο κρέας συμβάλλουν σημαντικά στη στάση, τις πεποιθήσεις και την πρόθεση συμπεριφοράς των καταναλωτών. Ωστόσο, οι αλλαγές στην αντίληψη των καταναλωτών με την παροχή θετικών πληροφοριών θα μπορούσαν να κάνουν τους

καταναλωτές να δοκιμάσουν. Συνεπώς, θα ήταν απαραίτητη η συνεχής αξιολόγηση των αλλαγών στην αντίληψη των καταναλωτών με την πάροδο του χρόνου.

Επιπρόσθετα, οι ρυθμιστικές δομές είναι σημαντικές για την οικοδόμηση της εμπιστοσύνης των καταναλωτών προς την παραγωγή του τεχνητού κρέατος και το ίδιο το τεχνητό κρέας, συμπεριλαμβανομένης της ασφάλειας και της διατροφικής σύνθεσης. Αρκετές εκθέσεις επικεντρώνονται στη ρύθμιση όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ωστόσο, είναι δύσκολο να θεσπιστούν κανονισμοί που σχετίζονται με αυτό λόγω των ανεπαρκών πληροφοριών και της ελλιπούς τεχνολογίας που είναι επί του παρόντος διαθέσιμες.

Επίσης, εμφανίζονται διαφορετικές αντιλήψεις σε διάφορες θρησκευτικές κοινότητες, συμπεριλαμβανομένων των Εβραίων, των Μουσουλμάνων και των Ινδουιστών. Σε μια έρευνα αποδοχής που απευθυνόταν σε 3.030 συμμετέχοντες, συμπεριλαμβανομένων Εβραίων, Μουσουλμάνων και Ινδουιστών, οι απαντήσεις ήταν αρκετά συγκεκριμένες .

Στην περίπτωση των διατροφικών επιλογών, τα ηθικά ζητήματα αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία. Παρόλο που η τεχνολογία πλησιάζει στην πραγματική εμπορική διαθεσιμότητα, είναι προφανές ότι οι ηθικοί προβληματισμοί σχετικά δεν έχουν επιλυθεί ακόμη πλήρως (Dilworth et al., 2015).

3.2 Τεχνικές προσεγγίσεις για την παραγωγή κρέατος με καλλιέργεια

Η παραγωγή κρέατος από καλλιέργεια με βάση τη μηχανική ιστών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τεχνολογίες κυτταροκαλλιέργειας μεγάλης κλίμακας, οι οποίες θα μπορούσαν να παρέχουν σημαντική ποσότητα κυττάρων, επιτρέποντας την παραγωγή . Τα συστήματα παραγωγής κυττάρων μεγάλης κλίμακας στοχεύουν επίσης στην παραγωγή όσο το δυνατόν περισσότερων κυττάρων με τους λιγότερους απαιτούμενους πόρους. Ο ελάχιστος χειρισμός και η σύντομη περίοδος καλλιέργειας

για επαρκή αριθμό συλλεγόμενων κυττάρων είναι επίσης παράγοντες που θεωρούνται συνήθως παράγοντες για την αποτελεσματική μαζική παραγωγή κυττάρων.

Διάφοροι τύποι κυττάρων αποτελούν δυνητικά βιώσιμες επιλογές για την παραγωγή κρέατος από καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένων των μυογενετικών δορυφορικών κυττάρων, των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPS)

Καθώς η καλλιέργεια κυττάρων αποτελεί σημαντικό βήμα στην παραγωγή καλλιεργημένου κρέατος, η επιλογή του κατάλληλου δοχείου καλλιέργειας είναι καθοριστικής σημασίας. Τα τρυβλία T που χρησιμοποιούνται συνήθως στην κυτταροκαλλιέργεια παρέχουν επιφάνεια 20-225 cm². Στην περίπτωση καλλιέργειών μεγάλης κλίμακας που απαιτούν σημαντικά μεγαλύτερη επιφάνεια από αυτή, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλές φιάλες T. Ένα σύστημα πολλαπλών δίσκων έχει αναπτυχθεί ως εναλλακτική λύση υψηλής επιφάνειας που παρέχεται σε μία μόνο μονάδα. Παρόλο που αυτό το σύστημα διαθέτει πολλαπλούς δίσκους που παρέχουν πολλαπλές επιφάνειες προσκόλλησης κυττάρων, ο χειρισμός πολλαπλών φιαλών T ενδέχεται να είναι διαφορετικής εντάσεως, καθώς κάθε φιάλη T διαχειρίζεται ξεχωριστά.

Οι φιάλες κυλίνδρου επινοήθηκαν από τον Gey το 1933, με στόχο τη χαμηλού κόστους συντήρηση μεγάλου αριθμού κυτταρικών πληθυσμών με ταυτόχρονη χρήση λιγότερου θρεπτικού μέσου. Οι φιάλες κυλίνδρου, τοποθετημένες σε αεροστεγή θάλαμο ή σε θήκη χωρίς θάλαμο, μπορούσαν να σφραγιστούν για να μην ξηραίνονται τα κύτταρα και το μέσο. Αυτό το σύστημα απαιτεί επίσης έναν αργό μηχανισμό κίνησης, που επιτρέπει στις φιάλες με τα κύτταρα να περιστρέφονται αργά, επιτρέποντας στο μέσο να καλύπτει ομοιόμορφα τα κύτταρα και επιτρέποντας μεγαλύτερη ανταλλαγή αερίων.

Οι φιάλες κυλίνδρων θα μπορούσαν να προσφέρουν επιφάνεια προσκόλλησης έως και 350.000 cm². Σε σύγκριση με τις φιάλες T ή τις καλλιέργειες πολλαπλών δίσκων, οι φιάλες κυλίνδρου παρέχουν ανώτερες εφαρμογές για την αγκύρωση. Ωστόσο, η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο του συστήματος φιαλών κυλίνδρου είναι δύσκολη και ο χειρισμός πολλών φιαλών κυλίνδρου ταυτόχρονα είναι επίπονος.

Για να ξεπεραστούν αυτές οι ελλείψεις, έχουν γίνει σχετικές προσπάθειες για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας καλλιέργειας με φιάλη κυλίνδρου. Οι φιάλες κυλίνδρου έχουν χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων κοτόπουλου σε μεγάλη κλίμακα, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για την παραγωγή κρέατος κοτόπουλου. Σύμφωνα με το USDA, τα συστήματα επώασης με κυλινδρική φιάλη βελτίωσαν δραστικά την παραγωγή μυϊκών κυττάρων χοίρου, παρέχοντας αρκετά κύτταρα για την τρισδιάστατη (3D) κατασκευή κυτταρικών φύλλων για την *in vitro* μηχανική.

Η καλλιέργεια κυττάρων σε εναιώρημα παρέχει μεγαλύτερη παραγωγή από ό,τι τα συστήματα καλλιέργειας μονοστρωματικής καλλιέργειας, αλλά η προσκόλληση σε μια συγκεκριμένη επιφάνεια καλλιέργειας είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό των εξαρτώμενων από την αγκύρωση κυττάρων χωρίς να χάσουν τις κυτταρικές τους ιδιότητες. Για τη μαζική καλλιέργεια των εξαρτώμενων από την αγκύρωση κυττάρων, χρησιμοποιούνται μικροφορείς για τη δημιουργία καλλιεργειών εναιωρήματος .

Το 1967, ο Van Wezel περιέγραψε την έννοια των «μικροφορέων» χρησιμοποιώντας σωματίδια δεξτράνης για την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας σε αναδεδυμένο εναιώρημα. Αυτά τα σωματίδια δεξτράνης είναι σφαιρίδια μικροσκοπικού μεγέθους που εμφανίζουν θετικά φορτισμένες επιφάνειες και προσελκύουν ζωικά κύτταρα που περιέχουν αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες. Διάφορα υλικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μικροφορείς, όπως δεξτράνη, κυτταρίνη, ζελατίνη και πλαστικό.

Αυτοί οι μικροφορείς θα μπορούσαν να είναι στερεοί ή πορώδεις και τα υλικά θα μπορούσαν να επιλεγούν ανάλογα με την πρόθεση καλλιέργειας και τον τύπο των κυττάρων. Η συμμόρφωση με τα τρόφιμα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε περιπτώσεις όπου οι μικροφορείς χρησιμοποιούνται στην παραγωγή βρώσιμου κρέατος. Αν και αρκετοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μικροφορέων κατάλληλων για ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα, δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί μικροφορείς για την επέκταση των μυοβλαστών ή την παραγωγή καλλιεργούμενου κρέατος.

Η διαδικασία διαχωρισμού των καλλιεργούμενων κυττάρων από τους μικροφορείς είναι το τελικό στάδιο, κατά το οποίο τα καλλιεργημένα κύτταρα χρησιμοποιούνται για μεταγενέστερες εφαρμογές. Οι μικροφορείς θα μπορούσαν να διαχωριστούν από τα καλλιεργημένα κύτταρα με τη χρήση ενζύμων ή μηχανικών δυνάμεων, διαδικασία που είναι γνωστό ότι αποτελεί πρόκληση. Οι μικροφορείς από θερμοανταποκρινόμενα υλικά θα μπορούσαν να αλλάξουν τις επιφανειακές τους ιδιότητες ανάλογα με τη θερμοκρασία και να αποκολλήσουν τα προσκολλημένα κύτταρα, τα οποία θα μπορούσαν στη συνέχεια να φιλτραριστούν.

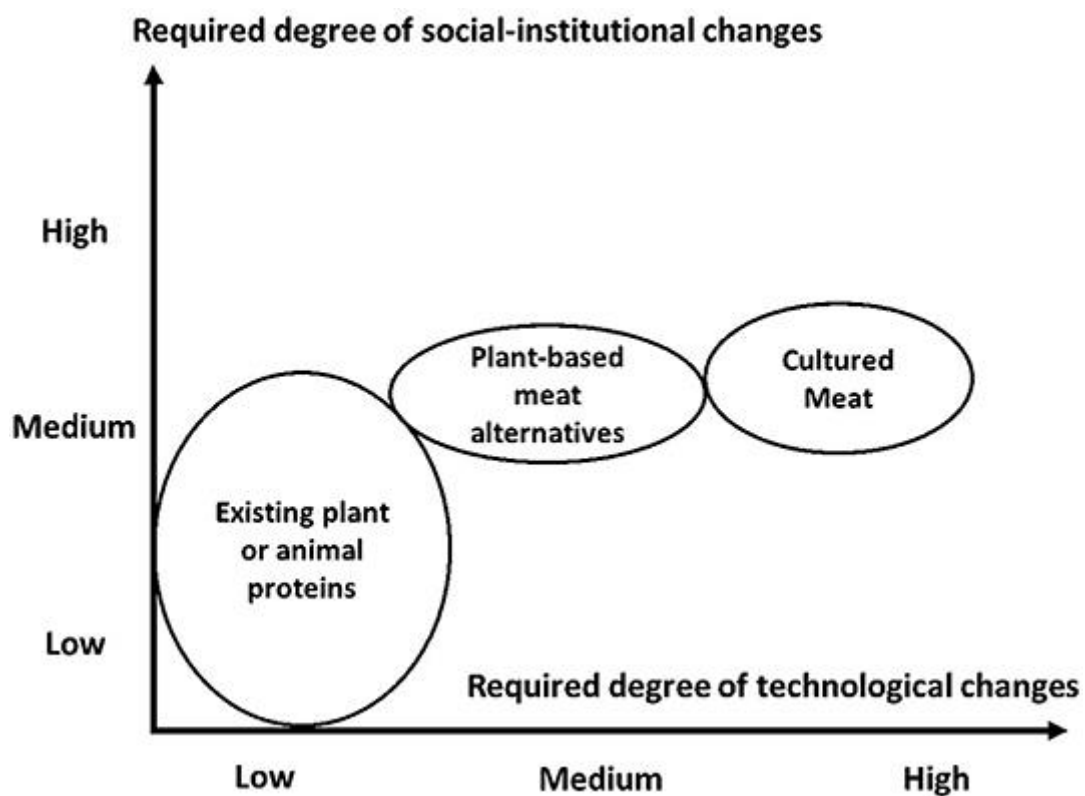
Πρόσφατα, τα δορυφορικά κύτταρα αναπτύχθηκαν και διαφοροποιήθηκαν σε συστήματα καλλιέργειας εναιωρήματος χρησιμοποιώντας βιοδιασπώμενα ικριώματα για την ανάπτυξη καλλιεργούμενου κρέατος. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την αγκύρωση των κυττάρων σε επιφάνειες ικριωμάτων, οι οποίες θα μπορούσαν να παρέχονται από κατασκευές μηχανικής ιστών.

Η λήψη δομής ιστού από μυϊκό κύτταρο θα ήταν ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη δημιουργία τεχνητού κρέατος. Ωστόσο, η κανονική καλλιέργεια κυττάρων σε ένα δίσκο για την απόκτηση δομής που μοιάζει με ιστό είναι πολύ δύσκολη. Για να σχηματίσουν τα κύτταρα την κατάλληλη δομή, χρησιμοποιούνται ικριώματα. Τα ικριώματα που διαμορφώνονται σε επιθυμητό σχήμα μπορούν να παρέχουν φυσική υποστήριξη για την αγκύρωση των μυϊκών κυττάρων, η υδρογέλη χρησιμοποιείται συχνά ως υλικό βάσης ικριώματος για τη μίμηση της κυτταρικής κόγχης. Η υδρογέλη που κατασκευάζεται σε πορώδη δομή μιμείται την εξωκυτταρική μήτρα (ECM), καθώς παρέχει στα κύτταρα διαπερατή αγκύρωση κατάλληλη για την ανταλλαγή νερού, αερίων και θρεπτικών ουσιών.

Τέτοια τρισδιάστατα ικριώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν με απλή σπορά των κυττάρων στην τελική δομή ή με ανάμειξη κυττάρων σε βιομελάνη και τρισδιάστατη εκτύπωση μείγματος με ενθυλακωμένο κύτταρο για να σχηματιστεί ικριώμα με κύτταρα. Διάφοροι τύποι υλικών βάσης χρησιμοποιούνται για τη μηχανική ιστών. Το κολλαγόνο, η ινική και το αλγινικό οξύ χρησιμοποιούνται ως υδρογέλη, αλλά για να γίνουν οι πηκτές πιο βιολογικά όμοιες με τους πραγματικούς ιστούς, εισάγονται βιοϋμένια που χρησιμοποιούν αποκελυφωμένη εξωκυτταρική μήτρα (dECM) (Choi et

al., 2016). Οι βιογέλες που παρασκευάζονται με dECM περιέχουν περισσότερους ειδικούς για τους ιστούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των συγκολλητικών πρωτεϊνών, σε σύγκριση με τις γενικές υδρογέλες, και πιστεύεται ότι είναι πιο κατάλληλες για τη μηχανική ιστών (Kim et al., 2020).

3.3 Νομοθεσία



Εικόνα 8: Βαθμός κοινωνικής-θεσμικής και τεχνολογικής αλλαγής που απαιτείται για εναλλακτικές λύσεις κρέατος

Υπάρχει λιγοστή, αλλά σημαντική βιβλιογραφία σχετικά με τη ρύθμιση του τεχνητού κρέατος, με τον Schneider να εξετάζει τη ρύθμιση στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Petetin να εξετάζει τη ρύθμιση στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Όσον αφορά το καθεστώς, το *in vitro* κρέας βρίσκεται στα όρια μεταξύ κρέατος και μη κρέατος. Τον Απρίλιο του 2018, η Γαλλία είχε ήδη απαγορεύσει τη χρήση λέξεων που σχετίζονται με το κρέας και τα γαλακτοκομικά για τον προσδιορισμό χορτοφαγικών και vegan προϊόντων. Η χρήση της λέξης «κρέας» για το *in vitro* κρέας δεν έχει ακόμη αποφασιστεί.

Οι κτηνοτρόφοι στις ΗΠΑ υποστηρίζουν έναν νέο νόμο στο Μιζούρι, ο οποίος ορίζει ότι για να ονομάζεται ένα προϊόν «κρέας», πρέπει να προέρχεται από πραγματικό ζώο, όπως αναφέρεται στα περισσότερα λεξικά. Επιπλέον, οι επιστήμονες του κρέατος διακρίνουν μεταξύ «μυών» και «κρέατος», με το τελευταίο να είναι το αποτέλεσμα μιας φυσικής βιολογικής διαδικασίας γήρανσης των μυών λόγω της παύσης της παροχής οξυγόνου στα μυϊκά κύτταρα.

Είναι πιθανό ότι η απάντηση σχετικά με τη ρύθμιση θα πάρει χρόνο, και είναι πιθανό ότι ο ορισμός του «κρέατος» θα διαφέρει από χώρα σε χώρα. Η διευθύνουσα σύμβουλος του Συμβουλίου Βοοειδών της Αυστραλίας, Margo Andrae, προειδοποιεί ήδη τις εταιρείες τεχνητού κρέατος να αποφύγουν την επανάληψη μιας μάχης για τους όρους, όπως συνέβη με το «γάλα» και τα «γαλακτοκομικά».

Επιπλέον, οι διάφορες νεοσύστατες επιχειρήσεις έχουν σαφώς διαφορετικές στρατηγικές με βάση τις επιλογές μάρκετινγκ, με ορισμένες από αυτές να αποκαλούν το προϊόν «ζωική πρωτεΐνη» και άλλες τεχνητό κρέας. Οι πρώτες καθοδηγούνται από τη θέληση να πουν την αλήθεια στους καταναλωτές, ενώ οι δεύτερες από την επιθυμία να είναι προκλητικές προκειμένου να αυξήσουν το ενδιαφέρον των καταναλωτών.

Σε μια πρόσφατη έρευνα, οι Bryant et al. (2016) ρώτησαν τους συμμετέχοντες από τις ΗΠΑ, την Ινδία και την Κίνα σχετικά με την προθυμία τους να δοκιμάσουν περιστασιακά ή να αγοράζουν συχνά τεχνητό κρέας, να τρώνε καλλιεργημένο κρέας αντί για συμβατικό κρέας ή υποκατάστατα κρέατος φυτικής προέλευσης. Η προθυμία να δοκιμάσουν ήταν αρκετά υψηλή: το 64,6% των συμμετεχόντων ήταν πρόθυμοι να το δοκιμάσουν, χωρίς όμως να δίνουν σαφή απάντηση για το εάν θα το καταναλώσουν σε τακτική βάση.

Τα αποτελέσματα μιας έρευνας των Hocquette et al. (2016), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η πλειοψηφία των πιο μορφωμένων καταναλωτών από διάφορες χώρες δεν θα αγοράζει τακτικά καλλιεργημένο κρέας, παρόλο που το ένα τρίτο των ερωτηθέντων απάντησε «δεν γνωρίζω». Επιπλέον, το όραμα των καταναλωτών είναι πιθανό να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου μέσω της λήψης περισσότερων πληροφοριών.

3,4 Ηθική

Τα ηθικά ζητήματα είναι όλο και πιο σημαντικά στις επιλογές τροφίμων και αυτό ενθαρρύνει την ανάπτυξη κοινωνικών ανησυχιών. Ενώ αναγνωρίζονται τα πιθανά πλεονεκτήματα του όσον αφορά την ηθική και τα περιβαλλοντικά ζητήματα, πολλοί καταναλωτές έχουν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων κυρίως λόγω της αντίληψης της αφύσικης φύσης.

Το *in vitro* κρέας, όπως κάθε νέα τεχνολογία, εγείρει αναπόφευκτα ηθικά ζητήματα. Ένας από τους κύριους σκοπούς αυτής της καινοτομίας, σύμφωνα με τους υποστηρικτές, είναι να σταματήσουν οι συνήθεις πρακτικές, ωστόσο λόγω της έλλειψης νευρικού συστήματος, τα καλλιεργούμενα κύτταρα υποτίθεται ότι είναι απαλλαγμένα από κάθε είδους πόνο, αν και οι βιοψίες σε ζώα για τη συλλογή κυττάρων μπορεί να εγείρουν ορισμένα ζητήματα σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Ως εκ τούτου, ορισμένοι επιστήμονες θεωρούν αυτό το τεχνητό κρέας ως χορτοφαγικό προϊόν.

Θρησκεία και κατανάλωση κρέατος

Το κρέας *in vitro*, όπως και κάθε άλλη νέα τεχνολογία, εγείρει πολλά ηθικά, φιλοσοφικά και θρησκευτικά ερωτήματα. Κυρίως λόγω του νεφελώδους καθεστώτος του, οι θρησκευτικές αρχές εξακολουθούν να συζητούν τα εξής: αν το *in vitro* είναι Kosher (καταναλώσιμο σύμφωνα με τους εβραϊκούς διατροφικούς νόμους), Halal (για τους μουσουλμάνους καταναλωτές, συμβατό με τους ισλαμικούς νόμους), ή τι πρέπει να γίνει αν δεν υπάρχει διαθέσιμο ζώο για τις τελετουργικές πρακτικές (ινδουιστές καταναλωτές).

Όσον αφορά την εβραϊκή θρησκεία, η γνώμη των ραβίνων διχάζεται. Ορισμένοι πιστεύουν ότι το καλλιεργημένο κρέας μπορεί να θεωρηθεί Κοσέρ μόνο εάν τα αρχικά κύτταρα προέρχονται από Κοσέρ ζώο. Άλλοι υποθέτουν ότι ανεξάρτητα από την

προέλευση των κυττάρων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του καλλιεργημένου κρέατος, αυτά σίγουρα θα χάσουν την αρχική τους ταυτότητα. Επομένως, το αποτέλεσμα μπορεί να οριστεί ως απαγορευμένο για κατανάλωση.

Για την ισλαμική κοινότητα, το κρίσιμο ερώτημα είναι αν το καλλιεργημένο κρέας είναι σύμφωνο με τους ισλαμικούς νόμους ή όχι, που συνήθως αναφέρεται ως «Halal ή όχι». Δεδομένου ότι η καλλιέργεια είναι μια πρόσφατη εφεύρεση, ο παραδοσιακός ισλαμικός νομικός στον οποίο συχνά αναφέρονται οι μουσουλμάνοι δεν έχει συζητήσει ποτέ το καθεστώς Halal.

Ως εκ τούτου, οι σύγχρονοι ισλαμιστές νομικοί έχουν αναλάβει αυτό το ζήτημα. Το καθεστώς Halal μπορεί να επιλυθεί μέσω του προσδιορισμού της πηγής των κυττάρων και του μέσου ορού που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια. Κατά συνέπεια, το τεχνητό κρέας θεωρείται Halal μόνο εάν τα βλαστικά κύτταρα προέρχονται από Halal ζώο και δεν χρησιμοποιείται ούτε αίμα ούτε ορός στη διαδικασία. Πράγματι, ο ορός θα πρέπει να αποφεύγεται, εκτός εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι το κρέας δεν θα αλλάξει ως αποτέλεσμα της επαφής με τον ορό, όντας δυνητικά ακάθαρτο.

3.5 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Τα MSC είναι τα σημαντικότερα συστατικά του καλλιεργημένου κρέατος, η παραγωγή του οποίου απαιτεί τον πολλαπλασιασμό τους σε συγκεκριμένα προγονικά κύτταρα και τη διαφοροποίησή τους. Η ποσότητα του παραγόμενου καθορίζεται από τον πολλαπλασιασμό των MSCs και υψηλότεροι ρυθμοί κυτταρικής ανάπτυξης επιτυγχάνονται με τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών διπλασιασμού των κυττάρων.

Η διαφοροποίηση αποτελεί κρίσιμο βήμα για την επίτευξη των επιθυμητών χαρακτηριστικών του , αν και οι προτιμήσεις των μέσων πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης είναι μεταβλητές και εξαρτώνται από τη σύνθεσή τους. Επιπλέον, καθώς η διαδικασία εξελίσσεται από τις φάσεις πολλαπλασιασμού στις φάσεις διαφοροποίησης και ωρίμανσης, οι μεταβαλλόμενες ανάγκες των κυττάρων ενδέχεται να απαιτούν προσαρμογές των μέσων καλλιέργειας. Αν και τα περισσότερα από τα συστατικά που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση στα

κοινώς χρησιμοποιούμενα μέσα είναι πανομοιότυπα, οι GF και οι ενώσεις που οδηγούν στη διαφοροποίηση είναι κρίσιμες για τις φάσεις διαφοροποίησης και ωρίμανσης.

Ο εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS) περιέχει υψηλή συγκέντρωση GFs και προάγει την κυτταρική ανάπτυξη. Ωστόσο, αν και ο FBS είναι χρήσιμος για την καλλιέργεια κυττάρων, έχει αρκετούς περιορισμούς. Η ανάπτυξη μέσω καλλιέργειας για τη μεγάλης κλίμακας παραγωγή υψηλής ποιότητας καλλιεργούμενων προϊόντων κρέατος παραμένει μια τεράστια πρόκληση. Διάφορες μυοκίνες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MSC και ότι η IL-15 διεγείρει τη συσσώρευση της πρωτεΐνης MyHC, ένας υποτιθέμενος βιοδείκτης της τελικής μυογενετικής διαφοροποίησης, σε διαφοροποιημένους μυοσωλήνες. Προβλέπεται ότι οι μυοκίνες είναι πιθανό να είναι σημαντικά συστατικά των μέσων χωρίς ορό που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και ελέγχουν την κυτταρική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας κρέατος.

Συμπεράσματα

Το τεχνητό κρέας είναι μια καλή πηγή πρωτεΐνης και μελετάται ως ασφαλής και αποτελεσματική εναλλακτική λύση για το συμβατικό κρέας. Έχει επίσης τη δυνατότητα να παρέχει μια ανεξάντλητη παροχή διαιτητικής πρωτεΐνης με οικονομικά αποδοτικό και φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο. Η αποδοχή του καλλιεργημένου κρέατος λέγεται ότι εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα και την ικανότητά του να μιμείται τις ιδιότητες του παραδοσιακού κρέατος.

Οι τρέχουσες τεχνολογίες, όπως τα βλαστοκύτταρα, η μηχανική ιστών και η καλλιέργεια ιστών, καθιστούν δυνατή την παραγωγή καλλιεργημένου κρέατος. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες εξελίξεις στον τομέα αυτό, καθώς και εκτεταμένη διερεύνηση της οικονομικής αποτελεσματικότητας της τεχνολογίας και των σχετικών ηθικών και κοινωνικών ανησυχιών, πριν επιτευχθεί επιτυχής παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα.

Τα συμβατικά συστήματα παραγωγής κρέατος συνδέονται με διάφορα προβλήματα, όπως ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων, πηγές μολυσματικών ασθενειών, διατροφικές ανισότητες, περιορισμένη διαθεσιμότητα πόρων, απώλεια

βιοποικιλότητας λόγω καταστροφής των ενδιαιτημάτων και περιβαλλοντική υποβάθμιση λόγω ρύπανσης και υπερθέρμανσης του πλανήτη. Σε αυτό το σενάριο, θα πρέπει να διερευνηθούν εναλλακτικές λύσεις στα συμβατικά συστήματα κρέατος.

Το κρέας *in vitro* έχει μεγάλες δυνατότητες να αντικαταστήσει το κρέας των σφαγμένων ζώων και τα προϊόντα με βάση το κρέας. Επιπλέον, με την κλιμακούμενη ζήτηση κρέατος, η γεφύρωση του χάσματος ζήτησης-προσφοράς με τη συμβατική παραγωγή κρέατος είναι δύσκολη. Θα πρέπει να προωθηθεί η παραγωγή κρέατος με καλλιέργεια για να παρέχεται στους καταναλωτές κρέας φιλικό προς το περιβάλλον και απαλλαγμένο από ασθένειες. Παρόλα αυτά, είναι επίσης σημαντικό να διεξαχθεί σε βάθος έρευνα και να αναπτυχθούν ισχυρές τεχνικές γνώσεις για την περαιτέρω βελτίωση της τεχνολογίας και να καταστεί οικονομικά εφικτή και εμπορικά βιώσιμη για την ανάπτυξη υγιούς και ασφαλούς κρέατος για τους καταναλωτές.

Για να καλυφθεί η αυξανόμενη ζήτηση τροφίμων από τον αυξανόμενο πληθυσμό το 2050, ο FAO κατέληξε στο συμπέρασμα ότι θα χρειαστούν 70% περισσότερα τρόφιμα για να καλυφθεί αυτή η ζήτηση. Στο πλαίσιο αυτό, τα κτηνοτροφικά συστήματα θα αποτελέσουν ζωτικό στοιχείο για την αντιμετώπιση της παγκόσμιας επισιτιστικής και διατροφικής ασφάλειας στον κόσμο. Ωστόσο, για να αποφευχθεί η κριτική που ασκείται στην κτηνοτροφία σχετικά με θέματα περιβάλλοντος και καλής διαβίωσης των ζώων, αναπτύσσονται αποτελεσματικότεροι τρόποι παραγωγής πρωτεϊνών για τη διατήρηση του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού.

Μια επιλογή είναι η καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας, το πιο αποτελεσματικό μέχρι σήμερα είναι ένα μέσο που περιέχει FBS. Το μέσο θα πρέπει να παρέχει θρεπτικά συστατικά, ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες, έτσι ώστε τα μυϊκά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται πριν μετατραπούν σε μύες και συνεπώς να παράγουν τεράστια ποσότητα κρέατος από περιορισμένο αριθμό κυττάρων.

Χάρη στην τεχνική πρόοδο, το FBS έχει αντικατασταθεί, τουλάχιστον στα ερευνητικά εργαστήρια, αλλά ίσως όχι ακόμη σε βιομηχανικό επίπεδο. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι ορμονικοί αυξητικοί παράγοντες απαγορεύονται στα συμβατικά συστήματα εκτροφής για τη συμβατική παραγωγή κρέατος στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αυτό εξακολουθεί να αποτελεί ζήτημα.

Ωστόσο, η τεχνική αυτή είναι σε θέση να παράγει αποδιοργανωμένες μυϊκές ίνες που απέχουν πολύ από τους πραγματικούς μύς, και αυτό αποτελεί τεράστιο περιορισμό στην προσπάθεια αναπαραγωγής του ευρέος φάσματος κρέατος που

αντιπροσωπεύει την ποικιλία των ειδών και των φυλών των ζώων, καθώς και των μυών ή των τεμαχίων. Επιπλέον, ο ρόλος των αιμοφόρων αγγείων και του αίματος, του νευρικού ιστού, των ενδομυϊκών λιπών και του συνδετικού ιστού επηρεάζει τόσο τη γεύση του κρέατος. Πράγματι, ορισμένα από τα «καλά» μπιφτέκια με κρέας λαχανικών αποτυγχάνουν στην υφή και τη γεύση από την άποψη ότι είναι πολύ ομοιόμορφα.

Η διατροφική ποιότητα του τεχνητού κρέατος μπορεί θεωρητικά να ελεγχθεί με τη ρύθμιση των συνθέσεων λίπους που χρησιμοποιούνται στο μέσο παραγωγής. Αυτό ισχύει και για το συμβατικό κρέας, με τις πρόσφατα αναπτυχθείσες στρατηγικές που αυξάνουν την περιεκτικότητα του κρέατος σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα με τα σημερινά συστήματα κτηνοτροφίας. Ο έλεγχος, όμως, της σύνθεσης των μικροθρεπτικών συστατικών του καλλιεργημένου κρέατος εξακολουθεί να αποτελεί ερευνητικό ζήτημα. Τέλος, ο αντίκτυπος της κατανάλωσης καλλιεργημένου κρέατος στην ανθρώπινη υγεία θα πρέπει να ελεγχθεί και να τεκμηριωθεί προσεκτικά.

Όσον αφορά τα αέρια του θερμοκηπίου, δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με τα πιθανά πλεονεκτήματα όσον αφορά τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου του κρέατος που καλλιεργείται στο εργαστήριο σε σύγκριση με το συμβατικό κρέας σε βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη βάση.

Παρά την τρέχουσα υψηλή τιμή του, το κόστος παραγωγής του καλλιεργημένου κρέατος θα μειωθεί πιθανότατα στο εγγύς μέλλον. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην αποδοχή από τους καταναλωτές, παρά την έντονη απόρριψη των ονομασιών που αναφέρονται στην τεχνολογία κρέατος «in vitro» ή «καλλιεργημένου» κρέατος. Από την άλλη πλευρά, το καλλιεργημένο κρέας θα βρίσκεται σε ανταγωνισμό με άλλα υποκατάστατα κρέατος που κυκλοφορούν ήδη στην αγορά και είναι καλύτερα αποδεκτά από τους καταναλωτές, όπως τα προϊόντα φυτικής προέλευσης.

Από ηθική άποψη, το καλλιεργημένο κρέας στοχεύει στη χρήση σημαντικά λιγότερων ζώων από τη συμβατική κτηνοτροφία, γεγονός που καθιστά το προϊόν ελκυστικό για τους χορτοφάγους και τους vegans. Ωστόσο, μερικά ζώα θα πρέπει ακόμη να εκτραφούν, ώστε τα κύτταρά τους να μπορούν να συλλεχθούν για την παραγωγή κρέατος in vitro.

Επιπλέον, οι θρησκευτικές αρχές εξακολουθούν να συζητούν αν το in vitro κρέας είναι Kosher (καταναλώσιμο σύμφωνα με τους εβραϊκούς διατροφικούς νόμους), Halal (για τους μουσουλμάνους καταναλωτές, σύμφωνα με τους ισλαμικούς νόμους).

Εν κατακλείδι, φαίνεται σαφές ότι τα ερευνητικά προγράμματα για το καλλιεργημένο κρέας είχαν περιορισμένη εμβέλεια, καθώς η ανάπτυξη του κρέατος *in vitro* βρίσκεται ακόμη στα σπάργανα. Το προϊόν θα εξελίσσεται συνεχώς σύμφωνα με τις νέες ανακαλύψεις και εξελίξεις που βελτιστοποιούν την παραγωγή, την ποιότητα και την αποτελεσματικότητα της κυτταρικής διαίρεσης. Επομένως, δεν είναι ακόμη γνωστό το αν αυτή η πρόοδος θα είναι αρκετή ώστε το τεχνητό κρέας να είναι ανταγωνιστικό σε σύγκριση με το συμβατικό κρέας και τον αυξανόμενο αριθμό υποκατάστατων κρέατος.

Το κύριο σημαντικό πλεονέκτημα της παραγωγής κρέατος με καλλιέργεια είναι ο καλύτερος ο έλεγχος της σύνθεσης και της ποιότητας του κρέατος με τη χειραγώγηση της σύνθεσης του μέσου καλλιέργειας ή τη συγκαλλιέργεια με άλλα κύτταρα όπως η γεύση, η σύνθεση των λιπαρών οξέων, η περιεκτικότητα σε λίπος και η αναλογία κορεσμένων προς πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα επιβλαβή κορεσμένα λιπαρά θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από υγιεινά λίπη, όπως τα ωμέγα-3. Από την άλλη πλευρά, για την ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας θα μπορούσαν να προστεθούν ορισμένες βιταμίνες στα μέσα καλλιέργειας.

Οι συμβατικές πρακτικές παραγωγής κρέατος ενέχουν ορισμένους κινδύνους όπως ζωνοόσοι, έλλειψη βοσκοτόπων, ασθένειες ανθεκτικότητας στα φάρμακα στο περιβάλλον και επίσης αυξάνονται οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου κ.λπ. το σύστημα παραγωγής κρέατος *in vitro* είναι ότι οι συνθήκες ελέγχονται και χειραγωγούνται ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος. Θα είναι ευκολότερο να διατηρηθεί τον έλεγχο της παθογόνου μόλυνσης στην παραγωγή κρέατος σε καλλιέργεια, αλλά το *in vitro* κρέας συνδέεται με περισσότερους κινδύνους μόλυνσης των υποστρωμάτων και λιγότερους κινδύνους όσον αφορά τη μικροβιακή μόλυνση.

Η καλλιέργεια κρέατος είναι ένα ολοκληρωμένο στυλ διατροφής. Οι χορτοφάγοι τρώνε κάποια ζωικά προϊόντα, όπως αυγό, γάλα, λευκό κοτόπουλο και ψάρι, αλλά απαγορεύουν το κρέας από βοοειδή, πρόβατα, κατσίκια και τα παρόμοια. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα ενδιαφέρον όταν εντάσσεται το καλλιεργημένο κρέας. Στην παραγωγή τροφίμων με κρέας αυτής της κατηγορίας, δεν υπάρχει ζωικό, δεν υπάρχει εκμετάλλευση, δεν υπάρχει σφαγή, απλώς η ανάπτυξη των κυττάρων σε μια δεξαμενή ζύμωσης. Ακόμα και ένας χορτοφάγος θα μπορούσε, σε αυτό το να καταναλώσει κατ' αρχήν καλλιεργημένο κρέας.

Περιβαλλοντικές επιπτώσεις του καλλιεργημένου κρέατος σε σύγκριση με συμβατικά παραγόμενο κρέας, συνεπάγεται περίπου 45% χαμηλότερη χρήση ενέργειας, μόνο τα πουλερικά έχουν χαμηλότερη χρήση ενέργειας, 87% χαμηλότερη

χρήση θερμοκηπίου αερίων, 99% χαμηλότερη χρήση γης και 89% χαμηλότερη χρήση νερού. ανάλογα με το συγκρινόμενο προϊόν. Παρά την υψηλή αβεβαιότητα, είναι το συμπέρασμα ότι οι συνολικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις του καλλιεργημένου κρέατος παραγωγής είναι σημαντικά χαμηλότερες από εκείνες του συμβατικά παραγόμενου κρέατος.

Οι αρνητικές επιπτώσεις της συμβατικής παραγωγής κρέατος είναι οι περιβαλλοντικές διαταραχές και η συρρίκνωση των πόρων. Στην περίπτωση της καλής διαβίωσης των ζώων η παραγωγή κρέατος *in vitro* αντιμετωπίζεται θετικά και είναι αποδεκτή από τους ακτιβιστές των ζώων και τους ειδικούς σε θέματα κρέατος. ως «κρέας χωρίς θύματα» Το *in vitro* κρέας παρακάμπτει τις ηθικές συνέπειες της τυπικής παραγωγής κρέατος, αποφεύγοντας εντελώς το θάνατο των ζώων, τυπικά αφαιρώντας κύτταρα από το ζώο-δότη μέσω βιοψίας και καλλιεργώντας κύτταρα σε μέσο που περιέχει εκχύλισμα μανιταριού αντί για αίμα ζώου. ορό ζώων. Θεωρητικά, ένα και μόνο ζώο φάρμας μπορεί να παράγει και να προμηθεύει τον παγκόσμιο πληθυσμό. Εάν δέκα βλαστικά κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται συνεχώς για δύο μήνες, θα μπορούσαν να αποδώσουν 50.000 μετρικούς τόνους κρέατος.

Ακόμη περισσότερο η δραματική μείωση της χρήσης της γης ανοίγει την προοπτική ότι μεγάλο μέρος αυτής της γης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλους σκοπούς ή απλώς να επιστραφεί στην άγρια φύση, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην αποκατάσταση πολλών απειλούμενων ειδών.

Η καλλιέργεια κρέατος έχει επιπτώσεις για διαστημικές αποστολές ή ταξιδιωτικούς οικισμούς. Η τρέχουσα τάση, η προμήθεια και η φυσικοχημική αναγέννηση, του νερού και οξυγόνου, είναι οι πιο αποδοτικές, αλλά για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους και μόνιμες βάσεις, η βιολογική αναγέννηση γίνεται πιο ελκυστική. Ένα ελεγχόμενο οικολογικό σύστημα υποστήριξης της ζωής, όχι μόνο θα παρέχει φρέσκια τροφή στους αστροναύτες, αλλά και την αντιμετώπιση των αποβλήτων και την παροχή οξυγόνου και νερού.

Λόγω των ορθών πρακτικών παραγωγής, η συχνότητα εμφάνισης τροφιμογενών ασθενειών θα μπορούσε να μειωθεί σημαντικά, καθώς η πιθανότητα μόλυνσης του κρέατος θα ήταν μικρότερη ελλείψει ενός δυναμικά οργανισμού. Επιπλέον, οι κίνδυνοι έκθεσης σε άλλους κινδύνους που συνδέονται με τα συμβατικά συστήματα παραγωγής κρέατος όπως τα φυτοφάρμακα, το αρσενικό, οι διοξίνες και οι ορμόνες, θα μπορούσαν να μειωθούν σημαντικά.

Από την άλλη πλευρά, οι τεχνικές αυτές είναι μόνο ικανές να παράγουν κρέας χωρίς κόκαλα, όπως χάμπουργκερ ή λουκάνικα. Όμως η παραγωγή κρέατος

υψηλότερης δομής, όπως η μπριζόλα, είναι πολύ περίπλοκη. Η *in vitro* παραγωγή κρέατος είναι θεωρητικά δυνατή, αλλά αντιμετωπίζει μεγαλύτερες τεχνικές δυσκολίες, καθώς και οικονομικές προκλήσεις οι οποίες είναι το σημαντικότερο πρόβλημα.

Επιπλέον, η αφύσικη φύση του καλλιεργημένου κρέατος και η πηγή του ζώου γίνεται αντιληπτή ως ένα από τα ισχυρότερα εμπόδια για την αποδοχή από το κοινό, όπως το *halal* στο Ισλάμ, οι Εβραίοι και οι χορτοφάγοι. Οι άνθρωποι μπορεί να αισθάνονται το κρέας *in vitro* ως τεχνητό κρέας και ως πραγματικό και ως εκ τούτου υποτιμούν την αξία του του κρέατος με τον ίδιο τρόπο που θα υποτιμούσαν τα τεχνητά λουλούδια ή τα συνθετικά διαμάντια.

Η παραγωγή κρέατος σε εμπορικό επίπεδο εξακολουθεί να απαιτεί σημαντική σε βάθος έρευνα, διότι στο εγγύς μέλλον, το καλλιεργημένο κρέας θα είναι ένα ουσιαστικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Παρ' όλα αυτά, βραχυπρόθεσμα, το εξαιρετικά υψηλό κόστος του τεχνητού κρέατος αποτελεί το κύριο εμπόδιο για την εφικτή εμπορευματοποίησή του, έτσι ώστε οι ερευνητές δύσκολα να αφιερώνουν τις γνώσεις και το χρόνο τους για να βελτιώσουν την ελαχιστοποίηση του κόστους παραγωγής και την εμπορευματοποίηση.

Μια μεγάλη πρόκληση για την παραγωγή ενός ανταγωνιστικού *in vitro* παραγόμενου προϊόντος κρέατος είναι η διασφάλιση της παρουσίας όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Διατροφικά μέταλλα και οι βιταμίνες που δεν συντίθενται από τα μυοκύτταρα συχνά απαιτούν δεσμευτικές πρωτεΐνες στο μέσο και αποτελεσματικούς μηχανισμούς μεταφοράς για είσοδο στα κύτταρα. Η γνώση του πολύπλοκου μεταβολισμού κάθε κρίσιμης βιταμίνης και ανόργανου συστατικού είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενός διατροφικού πολύτιμου προϊόντος κρέατος. Κατά τον προσδιορισμό του κατάλληλου προφίλ θρεπτικών συστατικών θα είναι ένα σημαντικό εμπόδιο που θα πρέπει να ξεπεραστεί.

Μελλοντικά η σκοπιμότητα της *in-vitro* παραγωγής κρέατος θα επιλύσει πολλά προβλήματα που σχετίζονται με τη συμβατική παραγωγή κρέατος. Όμως οι διαδικασίες αυτές απαιτούν την ανάπτυξη βιοαντιδραστήρων και τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο μιμούνται το φυσικό κρέας από όλα τις απόψεις, δομικά, μορφολογικά και από διατροφική αξία. Εκτός από το κόστος παραγωγής, η δημόσια αποδοχή και τεράστια κεφάλαια απαιτούνται σε μεγάλο βαθμό για την περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτό, έτσι ώστε η παραγωγή του καλλιεργημένου κρέατος να γίνει εμπορικά εφικτή.

Βιβλιογραφία

- Anderson S. (2007). Determination of fat, moisture, and protein in meat and meat products by using the FOSS FoodScan Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated Database: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90(4), 1073–1083.
- Anomaly J. (2015). What's Wrong With Factory Farming?. *Public health ethics*, 8(3), 246–254. <https://doi.org/10.1093/phe/phu001>
- Avesar, J., Rosenfeld, D., Truman-Rosentsvit, M., Ben-Arye, T., Geffen, Y., Bercovici, M., et al. (2017). Rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing using nanoliter arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E5787–E5795. doi: 10.1073/pnas.1703736114
- Bhat Z.F., Fayaz H. Prospectus of cultured meat - Advancing meat alternatives. *J. Food Sci. Technol.* 2011;48:125–140. doi: 10.1007/s13197-010-0198-7
- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Fayaz, H. (2015). In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60887-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60887-X)
- Broad, G. M. (2018). Effective animal advocacy: effective altruism, the social economy, and the animal protection movement. *Agric. Human Values*. 35, 777–789. doi: 10.1007/s10460-018-9873-5
- Chen, Y., Bloemen, V., Impens, S., Moesen, M., Luyten, F. P., and Schrooten, J. (2011). Characterization and optimization of cell seeding in scaffolds by factorial design: quality by design approach for skeletal tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* 17, 1211–1221. doi: 10.1089/ten.tec.2011.0092
- Choi, K. H., Yoon, J. W., Kim, M., Jeong, J., Ryu, M., Park, S., Jo, C., & Lee, C. K. (2020). Optimization of Culture Conditions for Maintaining Pig Muscle Stem Cells *In Vitro*. *Food science of animal resources*, 40(4), 659–667. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e39>

- Choudhury, D., Tseng, T. W., & Swartz, E. (2020). The Business of Cultured Meat. *Trends in biotechnology*, 38(6), 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.012>
- Damez, J.-L., and Clerjon, S. (2013). Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: an overview. *Meat Sci.* 95, 879–896. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.04.037
- Edelman, P. D., McFarland, D. C., Mironov, V. A., & Matheny, J. G. (2005). Commentary: In vitro-cultured meat production. *Tissue engineering*, 11(5-6), 659–662. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.659>
- Elliott, K. (2015). *Antibiotics on the Farm: Agriculture's Role in Drug Resistance*. *CGD Policy Paper* 59. Available online at: <https://www.cgdev.org/sites/default/files/CGD-Policy-Paper-59-Elliott-Antibiotics-Farm-Agriculture-Drug-Resistance.pdf>
- Friedman, N. D., Temkin, E., and Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 416–422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002
- Fu, X., Wang, H., & Hu, P. (2015). Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(9), 1663–1677. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1819-5>
- Gasteratos, K. S., and Sherman, R. (2018). *Consumer Interest Towards Clean Meat*. Available online at: <https://dash.harvard.edu/handle/1/34901168>
- Gaydhane, M. K., Mahanta, U., Sharma, C. S., Khandelwal, M., and Ramakrishna, S. (2018). Cultured meat: state of the art and future. *Biomanufact. Rev.* 3:1. doi: 10.1007/s40898-018-0005-1
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., et al. (2013). *Tackling Climate Change Through Livestock: A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
- Gilbert-Honick, J., & Grayson, W. (2020). Vascularized and Innervated Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*, 9(1), e1900626. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900626>
- Gilbert-López, B., Valdés, A., Acunha, T., García-Cañas, V., Simó, C., and Cifuentes, A. (2017). “Foodomics: LC and LC-MS-based omics strategies in food science

- and nutrition,” in *Liquid Chromatography, 2nd Edn*, eds S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, M-L. Riekkola (Amsterdam: Elsevier), 267–299. doi: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00010-4
- Goodwin, J. N., and Shoulders, C. W. (2013). The future of meat: a qualitative analysis of cultured meat media coverage. *Meat Sci.* 95, 445–450. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.05.027
- Guan, X., Lei, Q., Yan, Q., Li, X., Zhou, J., Du, G., Chen, J. (2021). Trends and ideas in technology, regulation and public acceptance of cultured meat. *Future Foods.* 3:100032. doi: 10.1016/j.fufo.2021.100032.
- Handral, K., Hua, H., Tay, S., Wan Chan, W., & Choudhury, D. (2022). 3D Printing of cultured meat products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(1), 272–281. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1815172>
- Heher, P., Maleiner, B., Prüller, J., Teuschl, A. H., Kollmitzer, J., Monforte, X., et al. (2015). A novel bioreactor for the generation of highly aligned 3D skeletal muscle-like constructs through orientation of fibrin via application of static strain. *Acta Biomater.* 24, 251–265. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.033
- Hocquette J. F. (2016). Is in vitro meat the solution for the future?. *Meat science*, 120, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.036>
- Jairath, G., Mal, G., Gopinath, D., Singh, B. (2021). A holistic approach to assess the viability of cultured meat: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 110, 700-710. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.024>.
- Joshi, V. K. & Satish Kumar. (2015). Meat analogues: plant based alternatives to meat products-a review. *Int. J. Food Ferment Technol.* 5, 107, <http://dx.doi.org/10.5958/2277-9396.2016.00001.5>
- Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O. P., & Verma, A. K. (2017). Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(5), 923–932. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939739>
- L'honoré, A., Commère, P. H., Negroni, E., Pallafacchina, G., Friguet, B., Drouin, J., Buckingham, M., & Montarras, D. (2018). The role of Pitx2 and Pitx3 in muscle stem cells gives new insights into P38 α MAP kinase and redox regulation of muscle regeneration. *eLife*, 7, e32991. <https://doi.org/10.7554/eLife.32991>

- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., et al. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* 2016:3182746. doi: 10.1155/2016/3182746
- Luckett, C. R., Kuttappan, V. A., Johnson, L. G., Owens, C. M., and Seo, H.-S. (2014). Comparison of three instrumental methods for predicting sensory texture attributes of poultry deli meat: texture of poultry deli meat. *J. Sens. Stud.* 29, 171–181. doi: 10.1111/joss.12092
- Mateti, T., Laha, A. & Shenoy, P. (2022). Artificial Meat Industry: Production Methodology, Challenges, and Future. *JOM* 74, 3428–3444. <https://doi.org/10.1007/s11837-022-05316-x>
- Mitchell, A. D. (2007). Impact of research with cattle, pigs, and sheep on nutritional concepts: body composition and growth. *J. Nutr.* 137, 711–714. doi: 10.1093/jn/137.3.711
- Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., Fukada, S., Yamamoto, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., & Heike, T. (2010). Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2245–2253. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137174>
- Monte, D. F., Mem, A., Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvão, J. A., et al. (2017). Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e02718–16. doi: 10.1128/AAC.02718-16
- Nguyen, N. T., Nguyen, H. M., Nguyen, C. V., Nguyen, T. V., Nguyen, M. T., Thai, H. Q., et al. (2016). Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern vietnam and its association with resistance in commensal *escherichia coli* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3727–3735. doi: 10.1128/AEM.00337-16
- Post, M. J. (2012). Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat Sci.* 92, 297–301. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.04.008
- Post, M. J. (2014). Cultured beef: medical technology to produce food. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(6), 1039–1041. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6474>

- Ramachandraiah, K. (2021). Potential Development of Sustainable 3D-Printed Meat Analogues: A Review. *Sustainability*. 13: 938. doi: 10.3390/su13020938.
- Rodriguez, B. L., and Larkin, L. M. (2018). “12 - Functional three-dimensional scaffolds for skeletal muscle tissue engineering,” in *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*, eds. Y. Deng and J. Kuiper (Woodhead Publishing), 279–304. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00012-
- Sarlo, S. (2018). *Towards Healthy and Sustainable Diets: Perspectives and Policy to Promote the Health of People and the Planet*. Springer. Available online at: https://books.google.co.in/books?id=upRNDwAAQBAJ&redir_esc=y
- Scarborough, P., Appleby, P. N., Mizdrak, A., and Briggs, A. D. M. (2014). *Dietary greenhouse gas emissions of meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans in the UK*. *Climate Change*. Available online at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10584-014-1169-1>
- Schneider, K. (2013). Concentrating on healthy feeding operations: the national school lunch program, cultured meat, and the path to a sustainable food future. *J. Land Use Evtl. L.* 29:145.
- Shaikh, S., Lee, E., Ahmad, K., Ahmad, S. S., Chun, H., Lim, J., Lee, Y., & Choi, I. (2021). Cell Types Used for Cultured Meat Production and the Importance of Myokines. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2318. <https://doi.org/10.3390/foods10102318>
- Sharma, S., Thind, S. S., and Kaur, A. (2015). *In vitro* meat production system: why and how? *J. Food Sci. Technol.* 52, 7599–7607. doi: 10.1007/s13197-015-1972-3
- Slade, P. (2018). If you build it, will they eat it? Consumer preferences for plant-based and cultured meat burgers. *Appetite* 125, 428–437. doi: 10.1016/j.appet.2018.02.030
- Smith, S. B., Kawachi, H., Choi, C. B., Choi, C. W., Wu, G., and Sawyer, J. E. (2009). Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J. Anim. Sci.* 87, E72–82. doi: 10.2527/jas.2008-1340
- Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development*, 24(20), 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>

- Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., & Sexton, A. (2018). Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in food science & technology*, 78, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.010>
- Stephens, N., Sexton, A. E., & Driessen, C. (2019). Making Sense of Making Meat: Key Moments in the First 20 Years of Tissue Engineering Muscle to Make Food. *Frontiers in sustainable food systems*, 3, 45. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00045>
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., et al. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health* 1, e316–e327. doi: 10.1016/S2542-5196(17)30141-9
- Treich, N. (2021). Cultured Meat: Promises and Challenges. *Environmental & resource economics*, 79(1), 33–61. <https://doi.org/10.1007/s10640-021-00551-3>
- Trivedi, D. K., Hollywood, K. A., Rattray, N. J. W., Ward, H., Trivedi, D. K., Greenwood, J., et al. (2016). Meat, the metabolites: an integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. *Analyst* 141, 2155–2164. doi: 10.1039/C6AN00108D
- United States Department of Agriculture (2018). *Livestock, Poultry, & Grain Market News*. Available online at: <https://www.ams.usda.gov/mnreports/pywretailchicken.pdf>
- Van der Gucht, O. (2018). *Cultured Meat: Current State of the Art and Future Challenges*. Available online at: https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/481/330/RUG01-002481330_2018_0001_AC.pdf
- Verbeke, W., Marcu, A., Rutsaert, P., Gaspar, R., Seibt, B., Fletcher, D., et al. (2015). “Would you eat cultured meat?” Consumers' reactions and attitude formation in Belgium, Portugal and the United Kingdom. *Meat Sci.* 102, 49–58. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.11.013
- Welin, S. (2013). Introducing the new meat. Problems and prospects. *Etikk i Praksis-Nord. J. Appl. Ethics.* 7: 24–37. doi: 10.5324/eip.v7i1.1788.

Zhu, H., Wu, Z., Ding, X., Post, M.J., Guo, R., Wang, J., Wu, J., Tang, W., Ding, S., Zhou, G. (2022). Production of cultured meat from pig muscle stem cells, *Biomaterials*, Volume 287, 2022, 121650, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121650>.