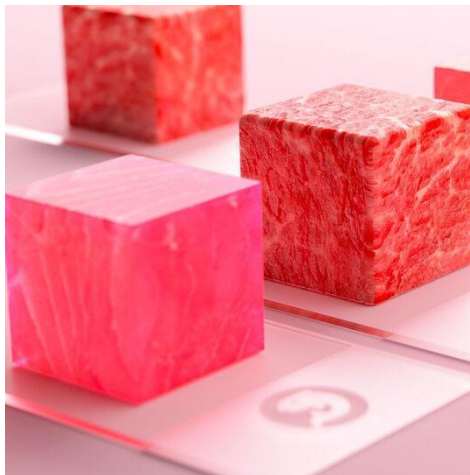


## ИНФОРМАЦИЯ

### Биотехнологични и технически предизвикателства, свързани с производството на култивирано месо



(Source: Merck)

Тази статия и изказаните от авторите твърдения в нея не отразяват позицията на Центъра за оценка на риска по хранителната верига.

*Центърът за оценка на риска по хранителната верига представя една статия на екип италиански учени от няколко университета – Катедра по ветеринарни и животновъдни науки (DIVAS) и CRC „Иновации за благополучие и околна среда (I-WE)“ на Университета в Милано, Катедрата по машинно инженерство на Политехническият университет в Милано и Катедра по химия, материали и химическо инженерство. Този екип италиански учени е разработил статията в отговор на призива на научното списание Applied Sciences (ISSN 2076-3417) за неговото специално издание „Последна тенденция в изследването на култивираните меса“.<sup>1</sup>*

*„Повечето от настоящите твърдения за „месо“, произведено от in vitro култивирани мускулни клетки, известно като „култивирано месо“ или „изкуствено месо“, се ръководят до голяма степен от привържениците на тази нова технология или от частни компании, работещи в тази област. От друга страна, мненията на (конвенционални) производители на месо или учени по животновъдни науки могат да се възприемат в полза на традиционната месна индустрия.“*

Това специално издание на списанието Applied Sciences има за цел да предостави балансиран мнения в тази област, като покани експерти както в производството на „култивирано месо“, така и/или „животновъдни науки“. Експертите са поканени да представят и обсъждат всякакви изследвания, свързани с тази тема и това включва, наред с другото, екологични, технологични, хранителни, сензорни и въпроси за безопасността. Интердисциплинарните и първични изследвания, описващи най-новите резултати, са

<sup>1</sup> A special issue of Applied Sciences (ISSN 2076-3417). "Latest Trend in Cultured Meat Study"; [https://www.mdpi.com/journal/applsci/special\\_issues/artificial\\_meat](https://www.mdpi.com/journal/applsci/special_issues/artificial_meat)

повече от добре дошли, тъй като научната литература, въпреки големия брой рецензии в тази област, е скромна, докато статиите в пресата и в обществените медии, насърчаващи „култивираното месо“, са, напротив, многобройни. Повече информация на: [https://www.mdpi.com/journal/applsci/special\\_issues/artificial\\_meat](https://www.mdpi.com/journal/applsci/special_issues/artificial_meat)

## Резюме

Постоянният растеж на населението тласна изследователите да намерят нови източници на протеини. Възможно решение на този проблем някои намират в **клетъчното земеделие**, по-специално в производството на култивирано месо. В следващия преглед са идентифицирани ключовите стъпки за производството на *in vitro* месо, както и най-важните предизвикателства. Основните биологични и технически подходи са взети под внимание и обсъдени, като избор на животински, свободни от животни алтернативи на фетален говежди серум (FBS), взаимодействия на клетъчни биоматериали и прилагане на мащабируеми и устойчиви системи за биофабрикация и култивиране. В светлината на констатациите, колкото и обещаващо да е производството на култивирано месо, повечето от обсъжданите предизвикателства са в начален етап. Следователно научните изследвания трябва да преодолеят тези предизвикателства, за да се осигури ефективно широкомащабно производство.

## Ключови думи:

[култивирано месо](#) ; [клетъчно земеделие](#) ; [FBS алтернативи](#) ; [3D скеле](#) ; [3D биопринтиране](#) ; [ядливо биомасило](#) ; [устойчивост](#) ; [ин витро месо](#)

## 1. Въведение

Сегашното глобално население е приблизително 8 милиарда, число, което се очаква да расте бързо до 2050 г., когато се изчислява, че броят на хората на Земята ще достигне 9–11 милиарда [ [1](#) ]. Такова значително увеличение на населението ще доведе до експоненциален ръст в търсенето на хранителни продукти, достигайки 50% до 2030 г. и удвоявайки се до 2050 г., в който момент търсенето ще бъде трудно за посрещане без отрицателно въздействие върху здравето на околната среда [ [2](#), [3](#) ]. Продуктите с голямо търсене са тези от животински произход, особено месото и млечните продукти. През 2012 г. Организацията по прехрана и земеделие (FAO) изчисли, че глобалното търсене на месо се очаква да достигне 455 милиона тона до 2050 г., което е 76% увеличение от 2005 г. Тази тенденция се отнася и за рибовъдството, където количеството риба, добито от аквакултурата се е увеличила от 4,7 на 66,6 милиона тона само за 32 години, а глобалното търсене се очаква да достигне 140 милиона до 2054 г. [ [2](#), [4](#) ].

Следователно, за да се отговори на огромното търсене на животински продукти, до голяма степен се прилага интензивно земеделие. Въпреки успеха си след процеса на индустриализация през 60-те години на миналия век, животновъдните системи се оказаха изключително крехки.

Настоящите системи за развъждане в индустриален мащаб са били обект на дебат относно хуманното отношение към животните, опазването на околната среда и общественото здраве.

От 80-те години на миналия век интензивното животновъдство е източник на множество кризи в общественото здраве, като луда крава и, по-късно, заразяването на отглежданите във ферми пилешко, говеждо, свинско, мляко и продукти от съомга с диоксин, а наскоро и свински грип и птичи грип [ [2](#) ]. Друг проблем, свързан с

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



интензивното животновъдство, е въздействието върху околната среда. Интензификацията на животновъдството и селскостопанското производство е свързана с емисиите на парникови газове (ПГ), особено метан (CH<sub>4</sub>) и азотен оксид (N<sub>2</sub>O). Както се съобщава от Guerci et al., селското стопанство допринася с 10–12% от всички общи емисии, докато животновъдството, особено преживните животни, допринася с общо 14,5% [ 5, 6]. Това твърдение обаче е в противоречие с доклада на Chriki и Hocquette. Според тези автори, докато е вярно, че животновъдството има въздействие върху околната среда, особено по отношение на емисиите на CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O и въглероден диоксид (CO<sub>2</sub>), също така е вярно, че последният е основният източник на емисии на *in vitro* месото, дължащо се на изкопаемата енергия, изразходвана за осигуряване на клетъчен растеж и пролиферация [ 7]. В подкрепа на това твърдение, Lynch et al. потвърди как въздействието на култивираното месо ще бъде незначително само в краткосрочен план (в рамките на 20 години), но не и в дългосрочен план (след 100 години), тъй като CO<sub>2</sub>, за разлика от CH<sub>4</sub>, се натрупва за дълги периоди в атмосферата [ 8].

Освен това, въпреки че животните, предимно преживни, консумират храна, която не е предназначена за хората, те заемат около 70% от глобалната земеделска земя и консумират около 35% от земеделските култури, като се конкурират пряко с производството на култури за консумация от човека и с потенциални алтернативни земеползвания, включително опазване на природата [ 9]. Земеделският сектор е изключително богат на ресурси и продължава да се трансформира с нарастването на населението. Световното производство на храни е най-големият потребител на прясна вода и използва около 38% от земята. Останалите 62% от земната площ в световен мащаб се оценяват като неподходящи за култивиране поради климат, топография, лошо качество на почвата, градско развитие или защото е покрита с естествени земи като гори. Следователно остава малко обработваема земя за разширяване на селското стопанство без отрицателно въздействие върху здравето на околната среда [ 10].

### ***Клетъчно земеделие и култивирано месо***

Индустриалната биотехнология притежава възможен ключ към осигуряването на човечеството с питателна, безопасна и здравословна храна, като същевременно минимизира използването на ресурси като енергия, вода и земя [ 3 ]. Това решение се нарича „клетъчно земеделие“ и включва производство на хранителни продукти като месо или риба от отделни клетки, а не от цели организми като животни, чийто приоритет е производството на продукти, които са подобни на молекулярно ниво на тези, произведени чрез традиционни техники [ 11]. С методите на клетъчното земеделие е възможно да се произвежда изкуствено месо, наричано още култивирано или чисто месо, чрез диференциация на мускулни сателитни клетки *in vitro* [ 12].

Култивираното месо представлява *in vitro* производство на месо без умъртвяване на животни. По-конкретно, той се произвежда от клетки с помощта на техники за тъканно инженерство. Производството включва основно генерирането на скелетна мускулна тъкан. Въпреки това, често включва адипоцити за производство на мазнини, фибробласти и/или хондроцити за генериране на съединителна тъкан и ендотелни клетки за осигуряване на васкуларизация [ 13].

**Към днешна дата производството на култивирано месо е горещо обсъждана тема, с противоречиви мнения относно неговата действителна осъществимост и устойчивост.** Поради тази причина следващият преглед има за цел да обсъди *in vitro* процеса на производство на месо, като подчертае основните му предимства и предизвикателства както от биотехнологична, така и от техническа гледна точка.

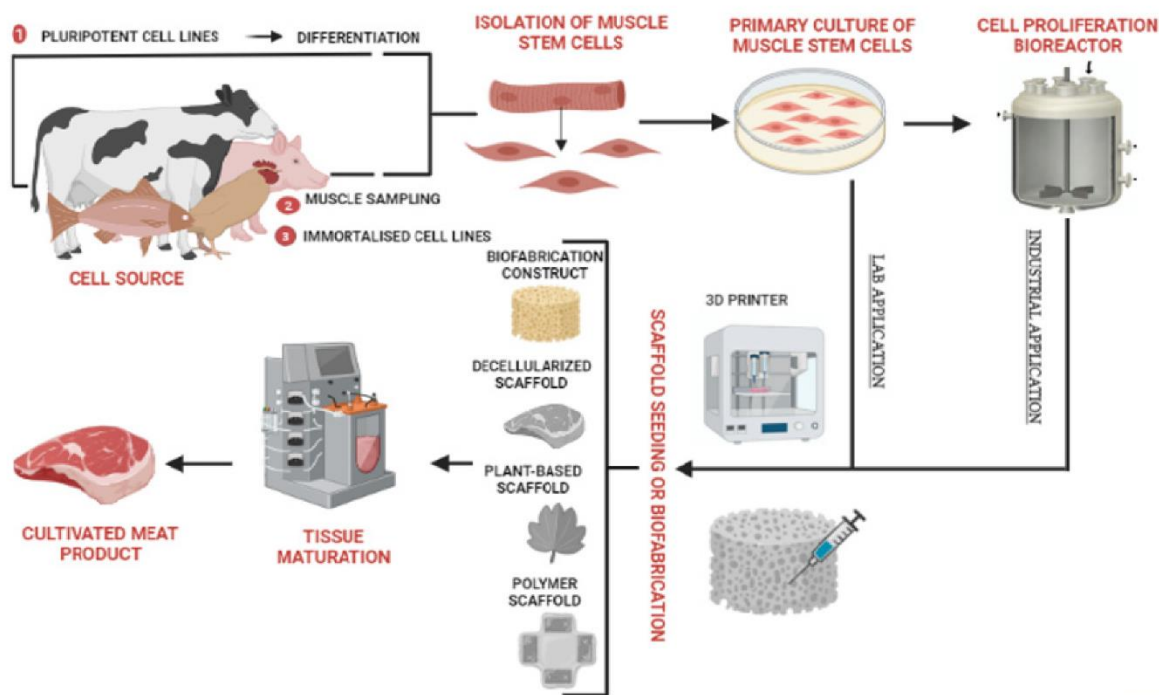
☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



## 2. Процес на производство на култивирано месо

Производството на култивирано месо следва прецизен работен процес, който е обобщен накратко във [Фигура 1](#).



Фигура 1. Процес на производство на култивирано месо (Source Biorender, Торонто, Онтаро, Канада).

**Събиране на клетки.** Основната стъпка в производството на култивирано месо е клетъчното снабдяване, за което се използват три метода.

- Клетъчна или тъканна биопсия се взема от живо животно или се възстановява постмортално. Получените по този начин клетки се наричат първични линии.
- Използват се плурипотентни клетки, като ембрионални стволови клетки или индуцирани плурипотентни стволови клетки [ 14 ].
- Безсмъртни клетъчни линии.

Въпреки че първичните клетъчни култури позволяват да се изследват механизмите на производството на култивирано месо в кратки времеви мащаби, те **претърпяват краен брой деления, преди да достигнат стареене.**

**Безсмъртните** или непрекъснатите клетъчни линии, от друга страна, не претърпяват стареене и следователно могат да претърпят безкрайни деления, което позволява да се получи по-последователно култивирано месо без необходимост от непрекъснати животински биопсии. **Понастоящем обаче няма обезсмъртени клетъчни линии,** подходящи за култивирано месо, достъпни за изследователите и разработчиците. Най-сходните съществуващи клетъчни линии са миобластите на моделни видове, често използвани в изследванията, като мишки, плъхове, хамстери и японски пьдпъдъци. **Тези клетъчни линии се характеризират с липсата на вкус, хранителна стойност и текстура на традиционното месо.** Следователно,

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



непрекъснатите линии, използвани за производството на култивирано месо, трябва да бъдат разработени от видове клетки и видове, които са познати на потребителите и които са вкусни, питателни и безопасни за храна [15].

Работата с тъканни биопсии включва допълнителна стъпка. Необходимо е да се изолират отделни мускулни стволони клетки от останалите влакна, което се постига с помощта на протеази, включително трипсин, проназа, диспаза и колагеназа. След ензимната дисоциация е от решаващо значение да се премахнат фрагменти от влакна, тъканни остатъци и съединителни тъкани, за да се осигури ефективен процес на селекция [16].

**Следващата стъпка е да се поддържат събраните клетки в култура, за да се постигне първо клетъчна пролиферация и след това клетъчна диференциация и/или узряване с крайната цел увеличаване на биомасата.**

**Пролиферация.** Първоначално клетките се оставят да пролиферират в малки колби, в които могат да растат в двуизмерни листове, закотвени към повърхността. Този метод представлява стандарт за лабораторни методи за клетъчно култивиране, посветени главно на изследователски дейности. Въпреки това, за широкомащабно промишлено производство на клетки, се изискват суспензионни култури в биореактори, за да се повиши ефективността на процеса: тези системи изискват генериране на голям брой клетки с минимална консумация на енергия и ресурси (т.е. културална среда, консумативи), време и стъпки за обработка [17].

Настоящият метод за култивиране на клетки включва използването на **специфична среда за растеж**, която съдържа всички вещества, необходими за осигуряване на клетъчна пролиферация, като глюкоза, неорганични соли, аминокиселини, витамини, растежни фактори, антибиотици и противогъбични средства.

Други вещества могат да бъдат добавени за **придаване на органолептични свойства, като протеини или пигменти, които придават цвят, подобен на месо** [18]. Към днешна дата обаче се търсят **жизнеспособни алтернативи на класическата културална среда, където целта е да се въведат в средата ядивни странични продукти, за да се осигури бърз растеж на клетките. Същият принцип трябва да се прилага към фетален говежди серум (FBS), който е от съществено значение за клетъчната пролиферация, но изобщо не е етичен и устойчив.**

**Скеле.** Процесите на производство и узряване на тъкани могат да бъдат осъществени **само ако на клетките е осигурена правилната среда, в която те могат да се прилепват, пролиферират и диференцират** [19, 20]. Скелетата са триизмерни структури, характеризиращи се с правилна поръзност, текстурна архитектура и механични и химични свойства, подходящи за узряване на специфичен клетъчен тип. Освен това, като се имат предвид целите на хранителното инженерство, **скелетата трябва да бъдат биоразградими или годни за консумация, или и двете, и тяхната структура също участва в крайните органолептични свойства на крайния продукт** [20]. Традиционният подход, базиран на тъканно инженерство, включва производство на скеле и последващо клетъчно засяване в 3D култура. Скелетата могат да бъдат получени **чрез децелуларизация на тъкан/орган или могат да бъдат произведени.** Има няколко различни техники за производство на скеле. Най-използваните са леене с разтворител и порогено извличане (SCPL), фазово разделяне, разпенване с газ, синтероване, електроспининг, самосглобяване и 3D печат (3DP) техники (напр. 3D печат на прахово легло, моделирано слято отлагане и стереолитография) [18].

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Биофабрикация.** Напоследък друг подход придобива все по-голямо значение: биофабрикацията [ 19 ]. Този процес



Снимката не е от оригиналната статия;  
Източник: <https://labgrownmeat.com/what-is-3d-bioprinting/>

позволява производството на натоварени с клетки конструкции, като се използват материали, съдържащи смесени клетки и биологични молекули. Основното предимство е възможността да се произведат по-дебели структури и да се контролира пространственото разположение на клетките, дори от множество типове, които са основните ограничения на конвенционалните методи на скеле [21]. **3D биопринтирането (3DBP)** е технология за биофабрикация, базирана на адитивно производство (AM), позволяваща прецизно позициониране на клетките, отлагане на плътност и прецизен контрол на структурата

и съотношението между различните популации в случай на многоклетъчни конструкции. Смесите от клетъчни материали, използвани в процеса, се наричат **биомасила** [ 22 ]. **3DBP представлява възможна промяна в играта в областта на ин витро производството на месо, като осигурява висока мащабируемост, процес без сложност, минимален разход на енергия и по-ниски емисии на N<sub>2</sub>O** [22]. Основните методи за биопечат са базирани на екструзия, мастиленоструйни, стереолитографски и лазерни и светлинни методи [ 23 ].

**Тъканна диференциация и биореактори:** Каквато и да е конструкцията, клетките вътре в 3D скелето трябва да бъдат **поставени в биореактор за узряване**. Необходими са



Снимката не е от оригиналната статия; Източник: <https://stonepierpress.org/goodfoodnews/cultured-meat-progress>

механични, химични и евентуално електрически стимули за завършване на този етап чрез специални системи за култивиране [ 24 , 25 ]. Биореакторите са затворени, автоматизирани системи, в които клетките могат да пролиферират, диференцират и узряват в конструкцията, образуваща тъканта. Биореакторите осигуряват прецизен контрол върху съответните променливи като температура, концентрации на кислород, рН и клетъчна плътност [ 18 ]. Използват се няколко типа биореактори, като най-често срещаните са статична култура, въртяща се колба и перфузионни биореактори (напр. резервоар с разбъркване или въртяща се стена) [25]. Вътре в биореакторите клетките преминават през пролиферация и диференциация. Последният

процес се задейства чрез промяна на скелето и хранителната среда и чрез добавяне на елементи като протеини, аминокиселини и минерали [ 24 ]. Липсата на клетъчна адхезия и създаването на структури, подходящи за клетъчен растеж, са критичните точки на тази сложна процедура.

**От лабораторни до промишлени мащаби:** Броят на клетките, необходими за производството на 1 kg протеин от мускулни клетки, е в диапазона от  $2,9 \times 10^{11}$  до

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



$8 \times 10^{12}$  [ 25 ]. За да се постигнат тези огромни числа, е необходимо да се появи етап на клетъчна пролиферация в **мащабни биореактори** [ 26 ], така че клетките да могат да растат и да се репликират от порядъка на 5000 L [ 27 ]. Според Zidaric et al., биореакторите ще бъдат от съществено значение в процеса на промишлено производство на култивирано месо [ 26 ].

Развитието на тъканта би изисквало **най-малко два различни етапа:**

(i) **фазата на клетъчна пролиферация**, за да се осигури достатъчен брой клетки за конструктивно производство (напр., като се използва биореактор с разбъркван резервоар), и

(ii) **тъканната диференциация до етап** (напр. поресто скеле, поставено вътре в перфузионен биореактор), което ще доведе до крайното парче месо, осигурявайки подходящите химични, механични, електрически стимули [ 26, 27 ]. **Съществуващите продукти и процеси в химическата и биомедицинска индустрия не отговарят на изискванията за широкомащабни клетъчни и тъканни култури, главно по отношение на разходите и устойчивостта.** Според Specht et al., има перспектива за разработване на методи и технологии за постигане на целта за чисто *in vitro* месо в близко бъдеще [ 28 ]. Въпреки това, извън промишлените изисквания, малките лабораторни месни култури също са изправени пред няколко общи предизвикателства. **Клетките, използвани за производство на култивирано месо, изискват места за закрепване**, за да растат и да се размножават. Решение на този проблем, особено в рамките на 3D принтиране и биопринтиране, е **оптималната формула на биоматериали и биомастила и смесване на продукти като полистирен, желатин, колаген или добавки на базата на протеини, за да осигурят точки на адхезия за клетките**, предотвратявайки оставането им окачени в конструкцията [ 29 ]. Такива места за закрепване са критични, за да позволят на клетките да растат върху скелета и структурите, специално текстурирани, за да осигурят диференциация на мускулните клетки. Такива скелета са отговорни за осигуряването на култивирани месни продукти с множество структурни свойства, включително клетъчна форма и подредба [ 14 ]. **Скелетата могат да бъдат създадени от много материали**, които могат да бъдат от **естествен произход** (целулоза, децелуларизирани растения, алгинат, хитозан, колаген и желатин) или **синтетичен** (полиетилен гликол или полиакриламид) [18 ]. Към днешна дата голямо безпокойство е, че продуктите от животински произход са най-подходящите и ефективни за клетъчния афинитет и прикрепване [ 29 ], но те са неадекватни от гледна точка на метода без животни за процеса на култивирано месо. Освен това, тъй като крайният продукт трябва да бъде годен за консумация, **тъканните скелета, ако не са годни за консумация, трябва да бъдат поне биоразградими и нетоксични или алтернативно проектирани да могат да се отстраняват преди консумация** [14 ,18 ].

След като достигне зрялост, крайният продукт трябва да бъде събран, което добавя стъпка в процеса, увеличавайки сложността на процедурата. Тази стъпка може да бъде извършена чрез ензимно, химично или ръчно използване, като първите две са за предпочитане [ 30 ].

Следователно култивираното месо и мащабирането на индустриалния процес за търговски цели е сложен и мултидисциплинарен въпрос, който изисква синергични усилия от биологичната, химическата, техническата и промишлената област. Основният изследователски фокус трябва да бъде разработването и подобряването на наличните клетъчни линии за създаване на клетъчна култура и хранителна среда, биореактори, клетъчни линии, скелета и биофабрикация.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



### 3. Предизвикателства, свързани с производството на култивирано месо

Ползите от производството на култивирано месо са широко дискутирани в литературата. Производството на култивирано месо би довело до 89% намаление на използваната вода, 99% намаление на използваната земя и 96% намаление на парниковите газове (ПГ) в резултат на отдалечаване от интензивно животновъдство [14, 31]. **Въпреки че тези аспекти са интересни, но все още противоречиви**, също така е вярно, че има множество аспекти относно ин витро производството на месо, които трябва да бъдат разгледани, както от биотехнологична, така и от технологична гледна точка (Таблица 1).

**Таблица 1. Основните биотехнологични и технически предизвикателства за производството на култивирано месо.**

<b>Биотехнологични предизвикателства</b>	<b>Технически предизвикателства</b>
Избор на животно за събиране на клетки Избор на място за събиране Методи за събиране на клетки FBS: етични предизвикателства Висока клетъчна пролиферация и генетична нестабилност Хранителни и функционални свойства на култивираното месо FBS алтернативи Система за контрол на храната за производство на скеле за култивирано месо	Алтернативи на производството на скеле Биофабрикация и 3D биопечат Биореактори Увеличаване на индустриалния процес

#### 3.1. Биотехнологични предизвикателства

##### 3.1.1. Избор на животно за събиране на клетки

Първото предизвикателство при производството на култивирано месо е изборът на животно, от което да се извърши клетъчна биопсия. Изборът не трябва да е случаен, а трябва да вземе предвид множество променливи, включително възраст, пол и условия на отглеждане, тъй като те влияят върху наличието или отсъствието на сателитни клетки (стволови клетки на възрастни скелетни мускули).

С възрастта на животното концентрацията на сателитни клетки в мускула намалява. Най-бързото намаляване на броя на сателитните клетки се наблюдава през първите няколко месеца след раждането. В допълнение, тъй като сателитните клетки при по-млади животни са претърпели по-малко митотични клетъчни деления, те могат да запазят способността си за диференциация за по-дълъг пролиферативен период [14, 31].

Полът на животните е друг фактор, участващ в пролиферацията на мускулни стволови клетки.

Половите хормони като естроген и тестостерон могат да повлияят на клетъчния растеж. В сравнение с женските животни, мъжките животни се характеризират с по-

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





високо съдържание и активност на сателитни клетки, благодарение на положителното влияние на тестостерона [ 16 ]. Това благоприятно действие е подчертано и от Mulvaney et al., които демонстрират, че кастрираните животни показват по-ниска концентрация на активност на сателитни клетки в сравнение с некастрираните, тенденция, обърната с прилагането на тестостерон пропионат [ 32 ].

Условията на отглеждане на животните също играят важна роля за състава на мускулните влакна. Vestergaard и др. показаха, че екстензивно отглежданите животни имат по-голям брой мускулни влакна тип I, но също и намаление на мускулните влакна тип II в сравнение с интензивно отглежданите животни. Тази разлика според авторите се дължи на различните диети, на които са подложени животните; по-точно до количеството консумиран груб фураж, което е по-високо при животни, отглеждани при екстензивни условия [ 33 ].

### 3.1.2. Избор на място за събиране

Друг основен параметър, който трябва да се вземе предвид, е мястото на биопсия. Концентрацията на сателитни клетки варира между мускулите или мускулните групи. Доказано е, че тип I, бавно съкращаващи се влакна, се характеризират с по-голям брой сателитни клетки за разлика от тип II бързо съкращаващи се мускулни влакна, в които концентрацията е по-ниска [31 ] .

По-конкретно, при говедата, мускулите, принадлежащи към плешката, съдържат предимно влакна от тип I, докато тези от кръглите съдържат предимно влакна от тип II [ 31 ].

### 3.1.3. Методи за събиране на клетки

Друг фактор, който трябва да се има предвид, е методът на вземане на клетъчна биопсия. Сателитните клетки могат да бъдат събрани или по време на клането на животното, което не е приет начин за клетъчно земеделие, или чрез биопсии на мускулна тъкан. Тъканната биопсия, процедура, широко използвана във ветеринарната медицина, включва използването на биопсия с игла. Въпреки че тази техника е бърза и причинява малко стрес на животното, тя позволява да се вземе ограничена проба, около 0,5 g, и не е много прецизна поради сляпото естество на пробата [31 ] . Вторият вариант включва малък разрез на мястото на вземане на проби, което позволява вземане на повече проби, около 15 g, и по-голям успех, въпреки че се характеризира с по-голяма инвазивност за животното [31 ] .

За да се намали броят на донорите, необходими за производството на култивирано месо, е желателно да се увеличи максимално броят на биопсиите, взети от всяко животно, като се имат предвид нивата на стрес и причинения дискомфорт. Както се съобщава от Melzener et al., възможен подход за събиране на мускулни биопсии за производство на култивирано месо може да включва вземане на множество биопсии (до четири) от всяко животно донор в една сесия на всеки три месеца, като се използва техниката на иглена биопсия, като по този начин се гарантира благосъстоянието на животните като им се дава подходящ времеви период за възстановяване. [ 31 ].

### 3.1.4. Фетален говежди серум (FBS): етични предизвикателства

Един от крайгълните камъни на клетъчното земеделие е да се гарантира устойчивостта на производствения процес. **Днес почти всички клетъчни култури включват добавяне на FBS към хранителната среда**, за да се осигури оптимален растеж. **Fetal Bovine Serum** е изключително сложна смес, която в допълнение към осигуряването на голям брой съставки като мастни киселини, липиди, витамини, въглехидрати, неорганични соли, протеини (повече от 1800) и повече от 400 метаболита,

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



осигурява основни хормонални фактори за клетъчен растеж и пролиферация. Паралелно с хранителната функция, FBS осигурява фактори на адхезия и дифузия, които действат като точки на покълване за прикрепване на клетките. Освен това позволява минимизиране на физическите щети, причинени от боравене с пипета и разбъркване [34, 35]. Въпреки че положителните аспекти на използването на FBS са широко демонстрирани и обсъждани в литературата, също така е вярно, че **той представлява множество проблеми, свързани с устойчивостта и етиката, като се сблъсква с основния принцип на клетъчното земеделие.**

Добиването на FBS винаги е предизвиквало противоречия и спорове. Когато бременна крава бъде заклана, плодът се отстранява и се прави сърдечна пункция във все още биещото сърце, за да се вземе серум при възможно най-асептични условия, **причинявайки първо огромно страдание и след това смърт** [34]. От съществено значение е фетусите да са на възраст най-малко 3 месеца, за да се гарантира анатомичното формиране на сърцето, за да се осигури перфектно събиране на серум [36].

Точното количество произведен и продаден FBS в света не е известно. **Изчислено е обаче, че приблизително 800 хиляди литра FBS се продават годишно, което означава приблизително 2 милиона умъртвени фетуса** [35]. Очаква се обаче тези числа да се увеличат експоненциално поради нарастващата употреба на клетъчни култури за рекомбинантни протеини, ваксини и терапевтични диагностични лечения [37]. От гледна точка на устойчивостта на процеса пазарът на FBS е силно динамичен, което води до непрекъснато колебание на цените и го прави неустойчив в голям мащаб [38]. Цената и наличността варират поради промените в броя и цената на добитъка, отглеждан по света, регулациите за внос, цените на говеждото и млечните продукти, разходите и метеорологичните условия [34].

Тъй като FBS е животински продукт, се характеризира с качествени и количествени разлики в зависимост от партидата, към която принадлежи и следователно от животното, използвано за вземане на проби, което налага тестването на продукта преди употребата му [39]. В допълнение към проблемите, свързани с променливостта, серумът може да **съдържа различни количества ендотоксини, хемоглобини и други фактори, неблагоприятни за клетъчния растеж, както и да бъде потенциален източник на микробни замърсители като гъбички, бактерии, микопlasма, вируси или приони, замърсили го по време на вземането му** [34].

**В допълнение, много други вещества в рамките на FBS са все още неизвестни, което ни пречи да изучаваме и познаваме възможните ефекти върху жизнеспособността на клетките** [40].

Следователно е необходимо да се намерят жизнеспособни алтернативи на FBS, за да се подпомогне широкомащабното производство на култивирано месо.

### 3.1.5. Висока клетъчна пролиферация и генетична нестабилност

Производството на култивирано месо включва обработката на клетки, характеризиращи се с висок пролиферативен капацитет. **Винаги обаче съществува възможност за генетична нестабилност, която може да доведе до образуването на ракови клетки в културата, без да бъде ясно идентифицирана.** Тези клетки, макар и безвредни, тъй като са мъртви по време на консумацията на месо и следователно не са включени живи в тялото, **представяват голямо предизвикателство за приемане за потребителя** (тъй като клетките впоследствие се усвояват в стомаха), поради което **процесът трябва да бъде допълнително проучен, за да се гарантира пълната липса на рискове** [41].

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



### 3.1.6. Хранителни и функционални свойства на култивираното месо

Едно от най-големите предизвикателства за **култивираното месо** е **съпоставянето на хранителните, функционални и органолептични свойства, типични за конвенционалното месо**. Крайната цел на производството на култивирано месо е да се създаде продукт, който е възможно най-близък до оригиналния. **Към днешна дата обаче сме далеч от постигането на това**.

Що се отнася до **консистенцията на крайния продукт**, тя не може да бъде подобна на тази на оригиналното месо, което става крехко едва след клането на животното, когато престане подаването на кислород, което предизвиква множество биохимични промени, които водят до образуването на млечна киселина, отговорна за намаляването на рН, която активира различни семейства ензими, необходими за разграждането на мускулните протеини и последващото омекване на месото, за да стане крехко. Този процес се нарича съзряване и към днешна дата е по-малко разглеждан проблем в литературата, но не по-малко важен за задълбочаване с по-нататъшни изследвания [ 41, 42 ].

Друга **противоречива характеристика е цветът на крайния продукт**. Цветът на месото варира според два основни параметъра: концентрация на миоглобин и желязо. **Цветът на изкуствено произведените влакна е жълт**, различен от розово-червения цвят на истинското месо [ 41 ]. Това несъответствие възниква, защото миоглобинът се потиска от култивираните клетки в присъствието на кислород и тъй като често използваните културелни среди като IMDM, RPMI1640 и DMEM имат минимално съдържание на желязо. Този проблем може да бъде разрешен, ако средите се допълват с желязо, но тази добавка остава ограничена [ 41, 42, 43 ].

Друг **проблем е свързан с вкуса**. Много от биохимичните метаболити, присъстващи в истинското месо, са нетни продукти от приема на храна и биологичния метаболизъм, но не произлизат от самия мускул [ 42 ]. Освен това животинското месо е резултат от сложно взаимодействие на протеини, въглехидрати, аромати на липидната фракция, нерви и кръвоносни съдове, които придават на продукта характерния краен вкус [ 41 ]. Изследователските групи **разработват съвместни култури с мастни клетки, за да постигнат тази цел, както и да осигурят микронутриенти като витамин В12, който е от съществено значение за човешкото здраве и лесно се въвежда в диетата чрез консумация на месо, но рискува да бъде загубен с производството на култивирано месо [ 41 ].**

През годините интензивното развъждане е претърпяло дълбоки промени, спомагайки за получаването на безопасни, хранителни и качествени продукти за потребителя.

**Червеното месо** всъщност се счита за източник с високо съдържание на протеин, който осигурява около 20-24 g протеин на 100 g. Тази стойност, заедно със съдържанието на мазнини, гарантира висок енергиен прием. Последният е основният източник на енергия в човешката диета и съдържанието му варира според вида на разглежданото месо. Профилът на мастните киселини в червеното месо варира в зависимост от пропорциите на постно месо и налична мазнина. Първият е по-богат на полиненаситени мастни киселини (PUFA), докато мазнините се характеризират с високо съдържание на наситени мастни киселини (SFA), съдържащи около 37 g SFA на 100 g месо.

Като цяло постното червено месо съдържа подобни пропорции на мононенаситени мастни киселини (MUFAs) и SFAs, въпреки че точните пропорции варират в зависимост от вида месо. Основните SFA, открити в червеното месо, са палмитинова киселина (C16:0) (около половината) и стеаринова киселина (C18:0) (около една трета). Докато

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



първият изглежда повишава нивата на холестерола в кръвта, последният има неутрален ефект върху общия и LDL холестерола. Червеното месо също съдържа по-малки количества миристинова киселина (C14:0) и лауринова киселина (C12:0), за които се смята, че повишават холестерола в кръвта по-силно от палмитинова киселина. В допълнение, въпреки че съдържа ниски нива на PUFAs, червеното месо представлява значителна част от диетата, осигурявайки 18% от n-6 PUFAs (линолова киселина) и 17% от n-3 PUFAs ( $\alpha$ -линолова киселина), допринасяйки за около 23% от общия прием на мазнини [ 44 ].

Следователно култивираното месо трябва да включва тези характеристики, за да бъде хранително конкурентен продукт. **И накрая, трудно е да се мисли, че в близко бъдеще може да има предлагане на in vitro месо, така че на потребителите да се предлага разнообразие от мускули или разфасовки от животни. Всъщност сензорното качество на месото се различава между видовете, породите, родовете и видовете животни, както и условията, при които се отглеждат [ 7 ].**

### 3.1.7. Алтернативи на FBS

Както беше съобщено по-рано, за да се спазват принципите на клетъчното земеделие, е необходимо да се намерят надеждни алтернативи на FBS за култивиране на клетки, които гарантират устойчивост и етично развитие.

Проведени са няколко проучвания, за да се отговори на търсенето на ядлива алтернатива на FBS. Повечето от проучванията в литературата обаче изглежда са в конфликт с принципите на клетъчното земеделие, тъй като те прилагат алтернативи на животинска основа на FBS като **фетален серум от други видове (напр. коза)** или други странични животински продукти (напр., **говежда очна течност**), които, макар и много ефективни, се характеризират със същите проблеми като FBS [ 35 , 45 ].

По същия начин, **човешкият тромбоцитен лизат** също се разглежда поради способността му да насърчава пролиферацията на стволови клетки, получени от човешка мастна тъкан, но тъй като е произведен от хора, той не е подходящ за консумация [34 , 46 ] .

Когато се работи с клетъчна култура, използването на **химично синтезирани среди** (рекомбинантен протеин и растежни фактори) е обичайна практика. Те, въпреки че са етични и подходящи за човешка консумация, се характеризират с **висока цена**, която ги прави неподходящи за широкомащабно приложение.

Поради това е от съществено значение да се изследват новоразработени матрици, които, когато се добавят към културалната среда, могат да поддържат клетъчната пролиферация и жизнеспособност както в краткосрочен, така и в дългосрочен план, като по този начин гарантират устойчивостта и етичността на производствения процес.

Възможни матрици, тествани върху пролиферацията на различни клетъчни култури, са тези, докладвани от Но et al. [ 47 ] ( [Таблица 2](#) ). Въпреки това, въпреки че повечето от тях могат да бъдат добри кандидати като алтернатива на FBS поради високия им пролиферативен капацитет върху клетката, те трябва да бъдат обсъдени от гледна точка на устойчивост и етика.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



**Таблица 2. Приложения и анализ на различни матрици в клетъчни култури. Модифицирано от Ho et al. [47].**

Матрици	Тип клетка	Ефекти	Реф.
Растителни пептони (Plant peptones)	CHO-320 (CHO K1 clone)	Подобрено култивиране и продуктивност на човешки интерферон гама	[48]
Дрожден хидролизат (Yeast hydrolysate)	CHO rCHO (recombinant CHO)	По-висока продуктивност на човешки бета интерферон; По-висок клетъчен растеж	[49,50]
Оризов протеин хидролизат (Rice protein hydrolysate)	CHO-320 Човешки HepG клетки	Защита срещу окислителен стрес от водороден пероксид	[51,52]
Соеви пептони (Soy peptones)	CHO DG44	Подобрено производство на клетки	[53]
Пшенични хидролизати (Wheat hydrolysates)	CHO	Подобрена клетъчна жизнеспособност	[54]
Морска цианобактерия (Spirulina maxima)	Човешки белодробен карцином	Подобрена клетъчна жизнеспособност и пролиферация	[55]
Екстракт от <i>Chlorella vulgaris</i>	CHO-K1 and MSC	Насърчава клетъчния растеж	[56]
Питки от рапичен шрот (Rapeseed caked)	CHO-C5	Насърчава клетъчния растеж	[57]
Копринен серицин хидролизат (Silk sericin hydrolysate)	CHO and Hela cells	Подобрен клетъчен растеж и пролиферация	[58]
Суроватъчен протеин (Whey protein)	CHO K1 JURKAT E6.1	Подобрена клетъчна жизнеспособност и пролиферация	[59]

Матриците, показани в [таблица 2](#), са тези, които са постигнали обещаващи резултати в клетъчната пролиферация и жизнеспособност. Повечето от тях са от растителен произход (растителни пептони, ориз, соева пшеница, морска цианобактерия *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris* и рапица), в светлината на принципа на клетъчното земеделие. Особено внимание трябва да се обърне на хидролизатите. Сравнително ниската им цена ги прави много привлекателни като компоненти за замяна на FBS. Въпреки това, тъй като хидролизатните продукти не са напълно характеризирани, по-

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



нататъшното разбиране на техните компоненти и механизма, чрез който те влияят върху растежа и поддържането на клетките, е от решаващо значение за тяхното широкомащабно приложение [47 ].

**Серицинът** е макромолекулен, кълбовиден, биоразградим и биосъвместим протеин, произведен в централната жлеза на копринените буби. Получава се чрез дегумиране на пашкула на *Bombyx mori*. Дълго време се смяташе за отпадъчен продукт от обработката на коприна, докато изследователите не проучиха потенциала му във фармацевтични, биомедицински и козметични приложения [ 35, 60 ]. В допълнение към тези полета, серицинът намира приложение като ядлив материал за покритие в хранителни продукти поради способността си да забавя окислителната активност при увреждане на полифенолите, откривайки интересен дебат относно възможната му употреба като алтернатива на FBS при поддържането на клетъчна култура [61] . Тъй като е продукт от животински произход, употребата му не би удовлетворила напълно изискванията за етика и ядливост. Въпреки това трябва да се повтори, че това е отпадъчен продукт от копринената промишленост и използването му в друг сектор може да отговаря на принципа на кръговата икономика.

**Сураватъчният** протеин е един от основните компоненти на млякото. По-конкретно, това е страничен продукт от млечната промишленост, характеризиращ се с висока биологична стойност благодарение на своите антиоксидантни, противовъзпалителни, антивирусни и антитуморни свойства, изразени както при индивидуална консумация, така и като добавка в други храни [ 62, 63, 64 ]. Тези функции могат да бъдат приписани на отличния му хранителен състав; състои се главно от  $\alpha$ -лакталбумин, албумин,  $\beta$ -галактоглобулин и имуноглобулин [ 62 ]. Поради тези причини, той е изследван като заместител на FBS в културни среди.

Отново, това е продукт от животински произход. Въпреки това, това е отпадъчен продукт с голямо замърсяване на околната среда, както се съобщава от Veskoukis et al. [ 62 ]. Наистина е изчислено, че неговият замърсяващ потенциал е равен на биохимичното потребление на кислород приблизително 175 пъти по-високо от канализационната система на съвременните градове. Поради това причинява сериозни екологични проблеми, когато се изхвърли [ 62 ].

Поради тази причина, въпреки че е от животински произход, може да се обмисли използването му като алтернатива на FBS. Освен това производството му е високо; това би позволило да се отговори на високото пазарно търсене, типично за FBS.

Като цяло е от първостепенно значение да се намерят подходящи алтернативи за FBS, като се има предвид комбинираното използване на продукти на растителна основа (напр. тези, докладвани в [таблица 2](#) ). Въпреки това, поради голямата вариабилност в техния химичен състав и механизъм на действие на тези матрици, е необходимо да се изследват ефектите от тяхната комбинация върху клетъчните култури.

### 3.1.8. Система за контрол на храните за култивирано месо

Основен аспект във всяко производство е **мониторингът по цялата производствена верига**. Както беше съобщено от Chriki и Hocquette, имаше много дискусии относно **стандартите за безопасност на култивираното месо**. Привържениците на ин витро месото го смятат за много по-безопасен продукт от конвенционалното, поради факта, че се произвежда в затворена и контролирана среда без възможен контакт с външни патогени. Този аспект играе ключова роля, особено по

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



време на процеса на клане на животното, където патогенни чревни бактерии като *E. coli*, *Salmonella* или *Campylobacter* могат да замърсят месото, което впоследствие се предлага на пазара [ 7 ]. Въпреки това, целта за пълно **елиминиране на възможните рискове по цялата производствена верига е трудно постижима** и затова е необходимо да се възприемат подходящи контроли за идентифициране на тези рискове преди пускане на пазара на продукта. В същото време е безспорно, че въпреки че има епизоди на хранителни заболявания, всяка година наблюдението на веригата за производство на месо повишава стандартите за качество, осигурявайки все по-безопасни продукти. Следователно производството в затворена и контролирана среда, съчетано с наблюдение по цялата верига на доставки, характерно за конвенционалното производство, би направило производството на култивирано месо възможен безопасен продукт.

#### 4. Технически предизвикателства при производството на култивирано месо

Основното техническо предизвикателство при производството на култивирано месо е **възпроизвеждането на 3D среда на реални мускули**, в която клетките могат да узреят в лаборатория или фабрика, **за да имитират тъканта**. Този сложен процес включва голям брой задачи и нерешени проблеми, които могат да бъдат глобално агрегирани на по-високо йерархично ниво в три основни категории: скелета, биоматериали или биомастила и тяхното взаимодействие с клетките, процедури за производство и процеси на култивиране на клетки, техники за пролиферация и диференциация [ 65, 66 ]. От техническа гледна точка се използват утвърдени методи и процеси от тъканното инженерство и регенеративната медицина, които след това са адаптирани към конкретната цел [ 67 ]. В следващите раздели са представени конвенционалните скелета към авангардни технологии, като биопечат, по отношение на текущото им състояние и перспективи. Освен това са описани най-разпространените биореактори като културни системи.

##### 4.1. Изработка на скеле

Скелето може да има пореста, тръбна или подобна на тъкан структура. Най-важните параметри са порьозността и състава на материала. Типът и структурата на скелето зависят от конкретното приложение, за което е проектирано.

Въпреки това, общите изисквания, които трябва да бъдат изпълнени, са по същество да се позволи на клетките да се залепят и да се позволи транспортирането на материала през неговата структура.

Следващите раздели представят няколко метода за производство на поресто скеле, разделени на конвенционални ( Фигура 2 ) и неконвенционални техники за производство.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





**Фигура 2.** Представяне на процеса на конвенционални технологии за производство на поресто скеле и пример за скеле, съответно (a) SCPL, (b) фазово разделяне, (c) разпенване с газ, (d) синтероване.

#### 4.1.1. Технологии за производство на конвенционални порести скелета

- **Отливане с разтворител и извличане на пороген (SCPL)** [ 68 ]: Този процес включва смесване на полимерен разтвор, разтворен в органичен разтворител, съставен от неразтворими частици (пороген). След това сместа се излива във форма или мембрана и разтворителят се изпарява. Накрая структурата се потапя във воден разтвор за извличане на частиците в структурата. Порьозността, по отношение на форма, размер и еднородност, зависи от избора на частици, обикновено частици сол. Основните недостатъци са липсата на контрол на вътрешната архитектура и еднородност, намалена възпроизводимост, образуване на кожен слой поради удебеляване на полимера, което може да ограничи достъпа до вътрешни пори, ограничена дебелина (2–3 mm) [69], слаби механични свойства, и възможна цитотоксичност поради остатъчен разтворител и пороген [ 70 ].

- **Разделяне на фази** [ 71 ]: Техниката се използва за създаване на скеле чрез разделянето на смес на две фази: богата на полимер и бедна на полимер. Това се постига при термодинамично нестабилни условия. Например, охлаждането на разтвора под точката на замръзване на разтворителя индуцира нуклеация на кристали вътре в разтвора; след това твърдият материал се сублимира, като се гарантира, че структурата е съставена само от бедната на полимер област с порьозност, тъй като разтворителят и богатата на полимер фаза се евакуират от скелето. Тази техника води до силно взаимосвързана порьозност, която може да се използва за възпроизвеждане на подобни на канали структури чрез прилагане на насочен температурен градиент. Независимо от това, контролът и оптимизирането на параметрите на процеса (напр. температура, концентрация на полимера, използване на повърхностноактивни вещества, кристален зародиш) са основните проблеми при управлението на размера и разпределението на порите [ 72 ]. Освен това, типичният постижим размер на порите често е по-малък от типичния размер в приложенията на тъканното инженерство (<200 μm).

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



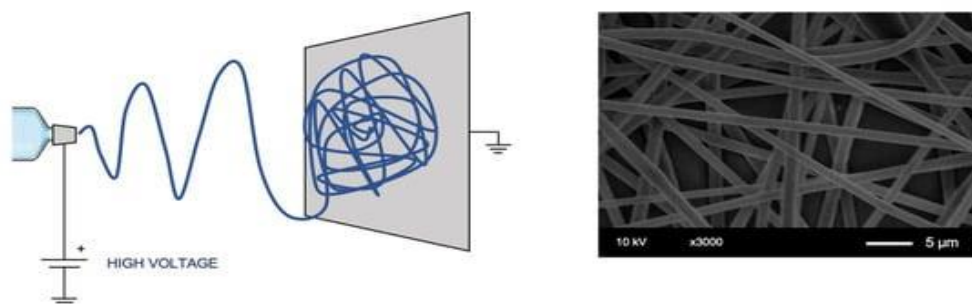


- **Разпенване с газ** [ 73 ]: Това е клас техники за производство на скеле, използващи разпенващ агент за генериране на газ вътре в материала, който действа като порообразуващ агент. Основното предимство е липсата на разтворители или порьозни материали, които могат да предизвикат цитотоксичност поради възможни остатъци. Образуването на газ може да бъде предизвикано химически или термично или чрез промяна на налягането. Основните недостатъци на техниката са слаб контрол върху размера на порите и взаимосвързаността, ниска възпроизводимост и структурна еднородност и трудности при включване на биологични молекули в термично индуцирани процеси [74 ,75 ].

- **Агломерирание** [ 76 ]: Техниката се използва за производство на кохезивни порести скелета чрез свързване на полимерна фаза и керамични частици или влакна. Обичайните процедури включват слой от произволно опаковани частици, свързани чрез нагряване до температура над температурата на встъкляване на основния материал, но по-ниска от неговата точка на топене, създавайки локална област на стопяване само в контактните повърхности, което води до пореста микроструктура. Алтернативни режими на синтероване са лека обработка с разтворител и налягане. Агломериранияте скелета се характеризират с по-ниска порьозност, малък размер на порите с трудности при прецизен контрол и разпределение и по-високи механични свойства и се използват главно в приложения за възстановяване на зъбите и костите [77 ].

#### 4.1.2. Неконвенционални технологии за производство на поресто скеле

- **Електроспининг** [ 78 ]: Методът се основава на електрическо поле, генерирано между система за доставяне на полимерен разтвор с контролирана скорост на потока и колектор, изтегляйки разтвора във влакно, илюстративен пример е показан на Фигура 3. Резултатът е мембрана от нетъкани влакна. Техниката, базирана на текстил, е създадена за възпроизвеждане на материали на основата на влакна, като тези, подобни на извънклетъчната матрица (ECM). Получената порьозност е взаимосвързана и достижимият размер на порите е по-нисък от този при други техники за скеле, постигайки влакна с диаметър до няколко нанометра [78] , което може да бъде предимство за специфични приложения (напр. съдови [ 79 ]), но има тенденция да ограничава клетъчната миграция до точка, в която неговата приложимост в тъканното инженерство се превръща в проблем. Няколко параметъра на процеса могат да се контролират, за да се настрои диаметърът и подравняването на влакното, като се адаптират текстурните свойства към специфичния тип клетки, които ще бъдат засети.



**Фигура 3. Илюстративен пример на метода на електроспининг за производство на скеле и изображение на конструкцията (адаптирано от [ 80 ]).**

- **Самосглобяване** [ 81 ]: Техниката включва специално проектирани амфифилни пептиди с капацитет спонтанно да се организират в подредени структури, включително нановлакна. Методът позволява много добър контрол на процеса, като се започне от

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



градивните елементи в подхода за проектиране отдолу нагоре за приложение в тъканното инженерство.

• **Хибридни скелета:** С цел контролиране на структурни и съставни характеристики, главно поръзност, при различни мащаби на дължина, се използват няколко подхода със смесени техники, като комбинация от SCPL и електропредене [82], многослойни електропредени композити с различни параметри [ 83 ], и комбинация от повече от две производствени техники [ 84 , 85 ].

• **Адитивно производство ( АМ ) :** Конвенционалните техники за производство на порести скелета, както и други нововъзникващи алтернативи, се прилагат за производство на скелета за пресъздаване на сложните микро- и макроструктури на биологичните тъкани. Въпреки това, всички те имат ограничения и позволяват тесен контрол върху важни текстурни параметри като форма на порите, размери и взаимосвързаност [ 86 ]. Едно нововъзникващо семейство от технологии, базирано на адитивни АМ техники, доказва, че позволява производството и контрола на сложни форми. АМ, популярно наричан 3D печат, е обща дефиниция и представлява голяма група от процеси, които могат да бъдат класифицирани по няколко начина [ 87 ]. В контекста на производството на поресто скеле, според Rey et al., някои от АМ технологиите могат да се използват за производство на скеле с висока пространствена разделителна способност, структурна сложност и контрол върху вътрешната архитектура на порите. Най-обещаващите техники са базирани на прахово легло 3DP, като селективно лазерно синтероване (SLS), и базирани на течни суровини 3DP, като стереолитография (SLA) [86 1].

## 4.2. Алтернативи на производството на скеле

### 4.2.1. Децелуларизация на тъканите

Алтернативен подход към инженерното скеле е децелуларизацията на растения или тъкани/органи. Този подход се основава на отстраняването на резидентни клетки и голяма част от основния комплекс за хистосъвместимост от тъкан, за да се получи естествено скеле, което да бъде засято. По този начин се запазва ЕСМ структурата [ 87 ]. Има няколко успешни примера в регенерацията чрез тъканно инженерство, които следват така наречената стратегия „like-to-like“, при която донорните и регенерираните тъкани са от един и същи тип [86 1]. Независимо от това, в случай на децелуларизация на тъкан/organ, доставянето на тъкан би изисквало използването на тъкани от животински произход, напълно в контраст с основната предпоставка за култивирано месо.

### 4.2.2. Микроносителни системи за клетъчни култури

Микроносителите са перли с типични размери между 100 и 200  $\mu\text{m}$  и те представляват възможно решение, тъй като клетките на бозайниците изискват повърхност, върху която могат да растат [ 17 ]. За приложения в тъканното инженерство, особено за хранителни продукти, системите, базирани на микроносителни, се запазват като основна система за култивиране за постигане на голям обем клетки, тъй като те могат да осигурят голяма повърхност на единица обем среда [88 1]. Verbruggen и др. предлага система за производство на миобластни клетки, базирана на микроносителни, суспендирани в клетките и среда в резервоар с разбъркване биореактор, постигайки обещаващи резултати по отношение на клетъчния растеж за ефективно и рентабилно развитие на култивирано месо [88 1]. Vodiou и др. предостави три сценария, базирани на култури с микроносителни: временна култура на микроносителни за пролиферация, негодни за консумация, но разградими микроносителни и годни за консумация микроносителни, вградени в крайния продукт. Според автора третият е най-перспективен

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



за производство на култивирано месо [ 89 ]. Освен големите възможности, основният недостатък на използването на микроносители или агрегати е, че клетките могат да образуват кълстери, които не пролиферират по правилния начин, поради което, ако не се модифицира, фазата на клетъчна пролиферация би била трудна за контролиране [17].

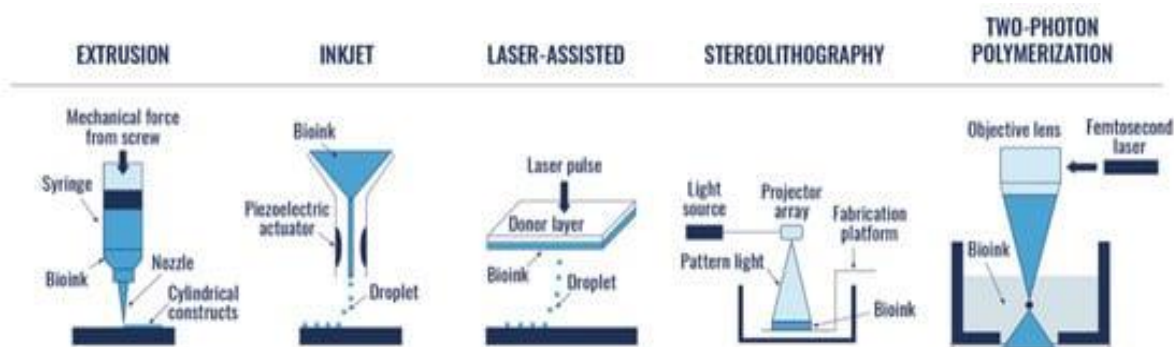
### 4.3. Биофабрикация и 3D биопечат

Биофабрикацията се отнася до производството на **сложни биологични продукти, съчетаващи клетки, матрици, биоматериали и биомолекули, особено за тъканно инженерство, регенеративна медицина и хранително инженерство.** Това нововъзникващо поле беше силно стимулирано от развитието на базирани на АМ технологии [ 90 ].

Директното 3D принтиране на биологичен материал, включително клетки, се определя като **3D биопринтиране**. Основното предизвикателство е да се адаптират технологиите, разработени за разтопени пластмаси и метали, за работа с чувствителни, меки и биологични материали (биомастила). Централната цел е да се възпроизведе сложната микро-архитектура на извънклетъчната матрица (ЕСМ) по-добре от други методи и да има по-висок контрол върху клетъчната плътност и отлагане [ 91 ]. Основният недостатък на техниките за скеле, които биофабрикацията цели да преодолее, е ограничената клетъчна миграция вътре в порестите скелета. Според Sachlos et al., клетките не разпознават непременно повърхността на скелето и, най-важното, те не мигрират на повече от 500  $\mu\text{m}$  от повърхността [ 92 ]. Има няколко 3DBP стратегии, характеризиращи се с различни характеристики, използвани за биофабрикаране на 3D клетъчни структури. Най-разпространените методи са екструзия, мастиленоструен и стереолитографичен биопечат, докато хидрогеловите обикновено се използват като основни материали за биомастило [ 93 ].

#### 4.3.1. Стратегии за 3D биопринтиране

Има различни стратегии за биопринтиране, всяка със своите плюсове и минуси (предоставени в [таблица 3](#). Фигура 4 предоставя графично най-често срещаните методи или тези на висшето изследване). Според Vijayavenkataraman et al., нито един метод не може да бъде ексклузивно използван за постигане на целта за биофабрикация на сложен тъкан, настоящата тенденция е изследване в разработването на хибридни методи [ 94 ].



Фигура 4. Различни техники за 3D биопринтиране, адаптирани от Santoni et al. [ 95 ].

**Екструзионен<sup>2</sup> биопринт:** Най-разпространеният 3DBP метод е този, базиран на екструзия, главно защото е универсален и достъпен, а на пазара се предлагат няколко

<sup>2</sup> Хим. Процес за получаване на термопластични материали чрез разтапяне и смесване на изходните вещества чрез термична обработка.

биопринтера от начално ниво [ 95 ]. Kang et al., например, успешно го използват за биоотпечатване на месоподобни конструкции [ 96 ]. Екструзионният биопечат обикновено разчита на разпределителна система, като например спринцовка с подходяща дюза или игла, инсталирана върху печатаща глава, използвана за прецизно отлагане на биомасила върху печатащо легло. Разпределителната система може да бъде задвижвана под налягане, бутало или винт: първата позволява по-добра жизнеспособност на клетките, но с нисък контрол върху скоростта на потока на материала и прецизността на формата [ 91, 93 ]. Основните предимства на метода, базиран на екструзия, са мащабируемост, възможност за печат на широка гама от материали с висок вискозитет и висока концентрация на клетки [ 94 ]. Независимо от това, разделителната способност е най-ниската в сравнение с другите методи и е свързана с диаметъра на дюзата, тъй като намаляването е ограничено от последващия спад на жизнеспособността на клетките [ 94 ]. Освен това жизнеспособността на клетките след отпечатване зависи от вискозитета на биомасилото и клетъчната концентрация [ 97 ]. Допълнителни недостатъци са запушването на дюзите и ограничението, дължащо се на реологията<sup>3</sup> на материала: могат да се използват само биомасила със свойство на изтъняване при срязване [ 94 ].

**Мастиленоструен биопечат:** Използва се система за разпръскване на течни капки, базирана на температура или пиезоелектрическа технология за задвижване. Поради естеството на процеса, мастиленоструйният биопечат се характеризира с висока скорост и разделителна способност и е свързан с по-ниски разходи. Въпреки това, той може да се използва само с материали с нисък вискозитет и е силно ограничен от механизма за запушване на дюзите. Освен това, за да се подобри и улесни образуването на капчици, се допуска ниска клетъчна концентрация [ 91, 94 ].

**Стереолитография и биопечат на базата на двуфотонна полимеризация.** Стереолитографията се основава на полимеризацията на светлочувствителни полимери; UV или видими светлини могат да се използват за фото-втвърдяване на материала слой по слой [ 23 ]. Това е метод без дюзи и затова не се сблъсква с проблема със запушването на дюзите, което представлява голямо ограничение в описаните по-горе методи. Освен това позволява получаване на много висока резолюция и висока скорост на печат. Могат обаче да се използват само светлочувствителни полимери, а UV светлините, както и UV-активирани фотоинициатори, могат да увредят клетките и постоянно да намалят жизнеспособността след отпечатване [23, 94, 97, 98 ]. На базата на тази технология е разработена цифрова светлинна обработка (DLP) за фотовтвърдяване на полимери. Методът използва проектор, излъчващ видима светлина, за да се преодолеят проблемите, дължащи се на UV облъчване [ 98 ]. С появата на стереолитография, базирана на двуфотонна полимеризация, се постига наномасщабна разделителна способност. Най-високата пространствена разделителна способност е сред техниките за биофабрикация, но със скъпи системи [ 94, 99 ].

**Лазерно подпомаган биопечат.** Методът се основава на принципа на лазерно индуциран трансфер [ 100 ]: той използва импулсен лазерен лъч, който действа чрез система за фокусиране върху лента, съставена от поддържащ материал за транспортиране на донор, покрит с абсорбиращ лазерна енергия и биологичен материален слой. Фокусираните лазерни импулси върху абсорбиращия слой генерират мехурчета под високо налягане, които задвижват материала срещу колекторен субстрат, обърнат към лентата. LAB е технология без дюзи, способна на биопечат с висока скорост и висока плътност на клетките. Въпреки това, той е по-рядко срещан от

<sup>3</sup> Реологията е дял от механиката, изучаващ пластичните деформации на непрекъснатите среди при приложено напрежение

мастиленоструйния принтер и екструзията, главно поради цената на технологията и трудността при производството на ленти. Освен това е трудно да се разрасне за производство в голям обем [ 91 ].

**Таблица 3. Сравнение на основните методи за биопечат, като се вземат предвид няколко свойства, предимства и недостатъци и основни приложения. Таблица, адаптирана от [ 23, 94, 95 ].**

Свойства	Екструзия	Мастилено-струйно	Лазерно-асистирано	Стереолитография	Два фотона
Скорост	Бавно	Бързо	Средно	Бързо	Много бързо
Цена	Умерена	Ниска	Висока	Ниска	Много висока
Клетъчна жизнеспособност	85–95%	80–95%	<85%	25–90%	>80%
Клетъчна плътност	Висока	Ниска	Средна	Средна	Средна
Мащабируемост	Висока	Висока	Ниска	Средно висока	–
Разделителна способност	100–500 µm	100–500 µm	20–100 µm	20–100 µm	0.1–10 µm
Вискозитет на биомасило	6–30 × 10 <sup>7</sup> mPa·s	<10 mPa·s	1–300 mPa·s	Без граница	Без граница
Предимства	прост е, печата различни биоматериали, висока плътност на клетките	печата биоматериали с нисък вискозитет, голяма скорост на производство, ниска цена и висока разделителна способност	висока разделителна способност, без дюзи и може да отлага биоматериали в твърдо вещество или течна фаза	Без дюзи, с висока сложност и висока разделителна способност	Без дюзи, с висока сложност, с най-висока разделителна способност и висока жизнеспособност на клетките
Недостатъци	Само за вискозни течности, разделителна способност	Ограничена до течности с нисък вискозитет, разделителна способност, плътност на клетките	Висока цена, термично увреждане поради наносекундно/фемтосекундно лазерно дразнене, мащабируемост, цена	Липса на многоклетъчен печат, повреда на клетката по време на фототвърдяване.	Липса на многоклетъчен печат, цена
Приложения	Тъканни модели за клетъчни изследвания, тестване на лекарства и регенеративна медицина, конструкции, аналогични на месо [101]	В допълнение към други технологии	Прецизно отлагане на клетки	Скелети и сложни структури с канали	Прецизно отлагане на клетки Скелета и сложни структури с канали Васкуляризиращи и високо прецизни модели

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



### 4.3.2. Формулировка на Bioink (биомасило)

Формулирането на биомасило е един от най-важните клонове в изследванията на биопечата, с около 25% от общите публикации в тази област [ 95 ]. Тези материали обикновено се базират на цитосъвместими хидрогелове и трябва да имат няколко ключови свойства, както от механична (напр. вискозитет, възможност за печат и твърдост), така и биологична (напр. цитосъвместимост и взаимодействие клетка-материал) гледна точка [101 ] .

**Хидрогеловите** са клас хидрофилни полимери, които могат да бъдат омрежвани, образувайки 3D мрежа, способна да абсорбира и задържа голямо количество вода (дори над 100 пъти сухото им тегло). Това свойство позволява на полимерите да достигнат нивата на хидратация, открити в повечето тъкани. Освен това порестата мрежа позволява голяма степен на дифузия на хранителни вещества и отпадъци извън материала. Тези хидрогелове могат да бъдат химически стабилни или могат да се разградят и разтворят [ 102 ]. Следователно, те предлагат възможност за пресъздаване на проектирани микросреда, подходящи за клетките, имитиращи свойствата на естествените извънклетъчни матрици (ЕСМ) и естествената клетъчна ниша, важна за регенерацията на тъканите [ 86 ]. Хидрогеловите могат да бъдат образувани с помощта на **естествени биополимери, синтетични биополимери или комбинации от двете**. Най-често срещаните са образувани с помощта на протеини (като колаген, еластин и фибрин), полизахариди (алгинат, агароза, хитин/хитозан и др.) и синтетични полимери (като полиетилен гликол, поливинил алкохол, полиакриламид и полимлечна киселина ) [ 86 ]. По-пълна рамка от материали, използвани за производство на хидрогел, е предоставена в [таблица 4](#) .

**Таблица 4. Хидрофилни полимери, използвани за синтезиране на хидрогел матрици, адаптирани от [ 102 ].**

Естествени полимери	Синтетични полимери	Комбинация от естествени и синтетични полимери
<b>Анионни полимери:</b> НА, алгинова киселина, пектин, карагенан, хондроитин сулфат, декстран сулфат	<b>Полиестери:</b> PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, PHB, P(PF-co-EG) ± акрилати, P(PEG/PBO терефталат)	P(PEG- ко-пептиди), alginate-g-(PEO-PPO-PEO), P(PLGA- ко-серин), колаген-акрилат, алгинат-акрилат, P(NPMA-g-пептид), P(HEMA/Matrigel®), HA-g-NIPAAm, GelMA
<b>Катионни полимери:</b> хитозан, полилизин	<b>Други полимери:</b> PEG-bis-(PLA-акрилат), PEG ± CDs, PEG-g-P(AAm-co-Vamine), PAAm, P(NIPAAm-co-AAc), P(NIPAAm-co-EMA), PVAc/PVA, PNVP, P(MMA-co-HEMA), P(AN-co-allyl sulfonate), P(biscarboxy-phenoxy-phosphazene), P(GEMA-sulfate)	
<b>Амфипатични* полимери:</b> колаген (и желатин), карбоксиметил хитин, фибрин		
<b>Неутрални полимери:</b> декстран, агароза, пулулан		

\* Амфифилност (на старогръцки: амφις, амфис заедно и на старогръцки: φιλία филиа любов) е свойството на химичните съединения да проявяват едновременно хидрофилни и хидрофобни характеристики. Такива съединения се означават като амфифилни или амфипатични. Амфифилни вещества са детергентите, към които се отнасят и сапуните.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



Основното предимство на **естествените полимери** е по-високата цитосъвместимост и наличието на разпознаваеми биологични части (обикновено само от животински източници), които могат да действат като сигнали и да модулират клетъчни реакции като прикрепване, пролиферация и диференциация. Въпреки това, те са засегнати от променливостта от партида до партида, често изискват строги протоколи за екстракция и пречистване и се сблъскват с проблеми с доставките, свързани с устойчивостта и наличността [ 27, 86 ]. Освен това тези от животински произход са полезни само за изследователски дейности, но са неадекватни за широкомащабно производство на култивирано месо.

Благодарение на техния източник, **синтетичните полимери** потенциално могат да достигнат по-висока възпроизводимост и еднаквост в механичните и реологични поведения, с висока контролируемост на физичните свойства. В допълнение към тези предимства, те имат най-лошото биологично поведение, като им липсват части, които да взаимодействат с клетките и да създадат подходяща среда. По този начин са формулирани няколко комбинации, които комбинират свойствата на двата класа. Алтернативно, процеси на функционализиране се прилагат към синтетични полимери, за да се подобри клетъчната адхезия [ 86, 102 ]. Като пример, Chaudhuri et al. показват благоприятния ефект от алгинатната модификация с пептидният мотив RGD (аргинин-глицин-аспарагинова киселина), интегрин-свързващ лиганд [ 103 ]. Интегрините са трансмембранни рецептори на клетките и се оказват фундаментални в тъканното инженерство, защото активират сигналната трансдукция и регулират клетъчния цикъл, включително клетъчно разпространение, миграция, насочване, пролиферация и апоптоза [103, 104 ].

**Мрежата на хидрогела** се формира чрез омрежване (фиксиране или желиране) с прекурсорни полимери на хидрогел. Това може да се извърши преди, по време или след 3D отпечатването и е от основно значение за запазване на формата и структурната цялост и избягване на колапс. Механизмите на желиране могат да бъдат разделени на две основни категории: химически и физически. Обикновено физическото омрежване е обратим процес, но свързан с лоша механична стабилност, докато химическите реагенти са в състояние да увеличат механичната стабилност чрез създаване на ковалентни омрежвания [ 101 ]. Омрежването може да бъде стимулирано от светлина (т.е. UV или видима), топлина или омрежваща баня (т.е. йонно омрежване).

Може да се преследва комбинация от механизми или стъпки за подобряване на процеса. Например, Colosi et al. предложи **смес от биомастила**, съставена от алгинат и желатин метакроил (GelMA) при ниски концентрации (<5% w/v), характеризираща се с нисък вискозитет, който влияе положително върху жизнеспособността на клетките по време на процеса на екструзия. Мاستилото се омрежва в две стъпки, CaCl<sub>2</sub> по време (използвайки коаксиална дюза) и след биопечат, и след това конструкцията се стабилизира допълнително чрез UV-омрежване [ 105 ].

Формулирането и подготовката на биомастилото и неговия биопечат е сложно поради **наличието на клетки и техните строги изисквания за стерилност и жизнеспособност**.

Що се отнася до възможността за печат, най-важните физико-химични параметри на хидрогела включват реологично поведение, свойства на набъбване, повърхностно напрежение, свойства на желиране и кинетика. Тези свойства трябва да бъдат настроени, като се вземе предвид техниката на биопечат (напр. екструзия или мастиленоструен) и вида на използваната клетка. По този начин характеристиките на биомастилото трябва да отговарят на механичните изисквания от гледна точка на процеса и в същото време да осигурят оцеляване на клетките след биопринтирането и в рамките на конструкциите

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

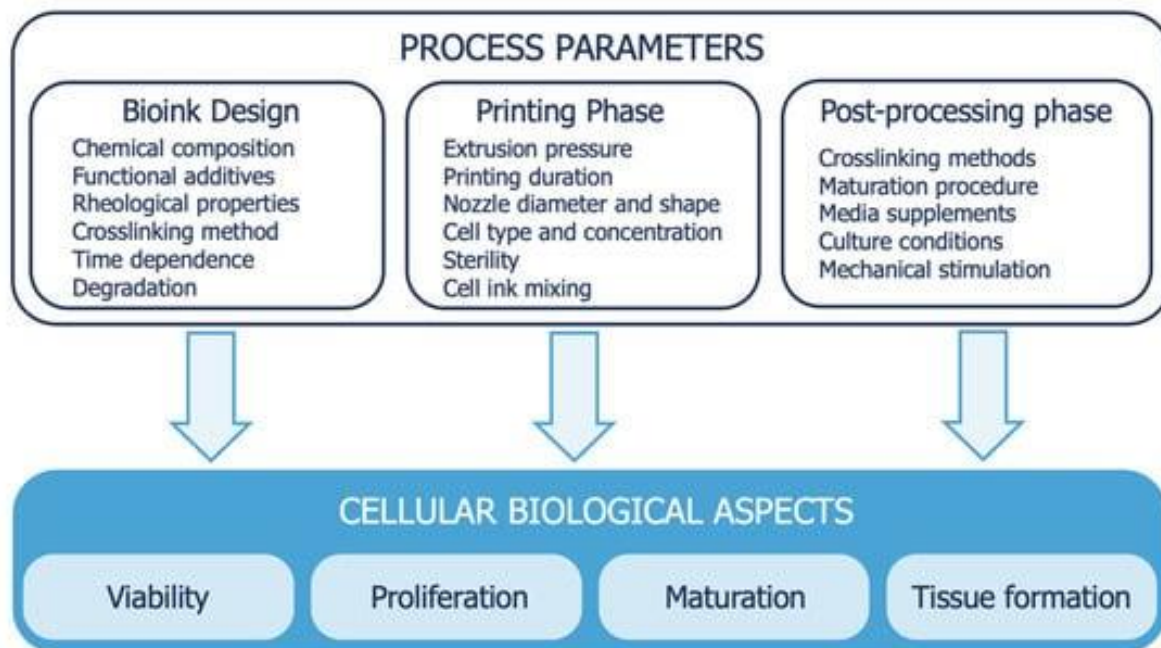
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



[ 101 ]. Повечето от последните статии очертават необходимостта да се намери най-добрият компромис между възможността за печат и специализацията за конкретния клетъчен тип или тъкан, които се анализират [ 95 ].

Според Rutz et al., оптималната формула на биомастилото трябва да вземе предвид цялостния процес. Авторът се позовава на екструзионния биопечат, който към днешна дата е най-разпространеният, и изброява основните фактори, отговорни за постигането на оптимален дизайн на биомастило, способен да достигне висока жизнеспособност на клетките, и оценява тяхното въздействие [106] ( [Фигура 5](#) ).



*Фигура 5. Схематично представяне на основните параметри на процеса, групирани по етапи на проектиране на биомастило, печат и след печат, и биологичното поведение на клетките, върху които параметрите могат да действат. Адаптирано от [ 106 ].*

Жизнеспособността се счита за ключово предизвикателство, тъй като влияе върху последващите клетъчни събития, като пролиферация, диференциация и образуване на тъкани, дори ако много фактори, влияещи върху клетъчния стрес и тяхната тежест, все още не са напълно разбрани.

Освен това, клетъчната плътност, клетъчните проекции и запазването на образуването на мрежа са от основно значение [ 106 ].

Според Rutz et al., основните фактори в дизайна на биомастилото, влияещи върху жизнеспособността на клетките и образуването на мрежа, са следните. Техният ефект е показан схематично в [таблица 5](#).

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





**Таблица 5. Връзка между свойствата на материала на биомасилото и клетъчната жизнеспособност и поведение, адаптирано от [ 106 ].**

Биомасило	Клетки
Налягане на печат ↑	↓ Жизнеспособност
Диаметър на дюзата ↓	↓ Жизнеспособност
Време за печат ↑	↓ Жизнеспособност
Степен на омрежване ↓	↑ Плътност в биомасило
Вискозитет ↓	↑ Плътност в биомасило

- Съществува кръгова връзка между клетките и реологията на биомасилото: първите влияят на реологията и по този начин на параметрите на процеса и обратно. Например Billiet et al. откриха двукратно понижаване на вискозитета на базирано на GeIMA биомасило, когато се приготвят с 0,5 и 1,5 милиона клетки/mL и четирикратно понижаване, когато се приготвят с 2,5 милиона клетки/mL [107]. Следователно е необходимо да се предвидят или тестват реологичните свойства на масилото с клетки вътре.
- Механичните натоварвания трябва да бъдат сведени до минимум, като се намали налягането при печат и се увеличи диаметърът на дюзата, тъй като клетките са механично чувствителни и понасят по-високи механични натоварвания.
- Модулът на гел-фазата силно влияе върху жизнеспособността на клетките и вероятно също върху молекулното тегло и полидисперсността. Механичните свойства на материала, обграждащ клетките, са решаващ аспект, който е слабо разбран.
- Омрежването след отпечатване също може да повлияе на жизнеспособността на клетките. Често биопринтираните конструкции са омрежени с UV и количеството облъчване, което клетките могат да понесат, не е ясно, вероятно между 30 s и няколко минути. Освен това крайната степен на омрежване може да попречи на клетъчните проекции и образуването на мрежа, важен механизъм за осигуряване на образуването на тъкан. Това може да стане важно, когато концентрацията на полимера се увеличи, за да се увеличи възможността за печат. Според автора, концентрацията на полимера трябва да бъде между 5 и 10%, но това очевидно е зависима от полимера величина.

Друг важен въпрос на фокус в наши дни са техниките за оценка за стандартизиране на оценката на пригодността за печат [ 108, 109 ]. Пакстън и др. предложи метод за оценка на възможността за печат за оценка на реологичните свойства на биомасилата за процеси на екструзия. Той е разделен на две стъпки: (1) качествен скрининг на образуването на влакна и възможностите за подреждане на слоеве и (2) реологична оценка, фокусирана върху свойствата за започване на потока, изтъняване при срязване и възстановяване след отпечатване [108].

Чрез анализ на изображението по време на биопринтиране могат да бъдат изчислени други параметри, свързани с прецизността на формата, като например

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



индексът на печатаемост (Pr), базиран на изчислението на кръговрата на решетъчна структура [109 [1](#)].

Изследванията за нови решения в разработването на биомасило за 3D клетъчна култура и за целите на биопринтирането могат да тласнат нововъзникващите технологии в тъканното инженерство и биопринтирането на храни.

Предизвикателството е да се постигне правилният баланс между химическите, морфологичните и структурните характеристики на материала, които имат положителен ефект върху процесите на клетъчния цикъл. Освен това за стандартизирането на производствения процес трябва да се избягват нерепликативни материали. В случай на материали, които могат да се използват повторно след узряване, може да се използва и материал от животински произход [ [65](#), [88](#) ]. По-конкретно за полето за биопечат на храни трябва да се направят допълнителни съображения. Според Post et al., най-важните нови изисквания за годни за консумация биомасила са свързани с биологични и екологични проблеми: устойчивост (т.е. потребление на вода и земя, енергиен и въглероден отпечатък), източник на суровини (постоянни, без животни, и мащабируеми), вкус и безопасност за човешка консумация [ [27](#) ].

#### 4.4. Биореактори

В контекста на тъканното инженерство биореакторите се използват за прилагане и контрол на параметрите и условията на околната среда към конструкции или клетъчни култури. Най-важните параметри за културата са температура, рН, CO<sub>2</sub> и други биологични, биохимични (като кислород, пренос на хранителни вещества или отстраняване на отпадъци) и физически (механични стимули) условия [ [25](#) ]. Специфичните изисквания и архитектурата на биореактора зависят от типа клетка или тъканна култура. Следователно те трябва да бъдат проектирани и произведени за специфични за тъканите цели [ [25](#) ].

- **Статични системи за култивиране:** Те са най-простите и осигуряват необходимите хранителни вещества в статична течна среда. По този начин средата трябва да се сменя често и тя перфузира чрез пасивна дифузия на течност [ [25](#) ]. Тези системи могат лесно да се свържат с носещи механизми, например, за да осигурят компресионно натоварване на конструираните тъкани [ [110](#), [111](#) ].
- **Спиннер колби:** Системите, базирани на центрофуга, се използват за прилагане на индуцирани от течност напрежения на срязване към конструкции, потопени в рециркулиращ и богат на хранителни вещества разтвор на среда [ [25](#) ]. Въпреки че тази система осигурява по-добра среда за конструиране по отношение на статичната култура, въртящите се колби може да не са оптимални поради турбулентния поток и свързаното с това генерирано по-високо деформиращо (компресионно) напрежение [ [112](#) ].
- **Перфузионни системи:** Лошото състояние на дифузия на статичната култура може да се подобри чрез перфузионни биореактори, особено във вътрешните части на порести скелета [ [113](#) ]. Тези системи се характеризират с биореактор с култура, съдове за средата (богата на хранителни вещества и кислород) и помпа, генерираща потока [ [27](#) ]. Нещо повече, системите за перфузия позволяват автоматична циркулация на средата, отстраняване на отпадъците и осигуряват компресионно напрежение, дължащо се на потока, което е полезно в специфични тъканни култури като дермата и хрущялните тъкани [ [23](#), [112](#) ].
- **Съд с въртящи се стени:** Алтернативен подход за намаляване на дифузионните ограничения на хранителни вещества и отпадъци с ограничено компресионно

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



напрежение е използването на биореактори с въртящи се стени на съдове [ 24 ]. Въпреки че компресионното напрежение е важно за узряването на клетките, прекомерната сила ще доведе до увреждане или до образуването на нежелани капсули около тъканта [ 112 ]. Този метод използва динамичен ламинарен поток, предизвикан от въртящата се течност вътре в биореактора, и е доказано, че е ефективен за клетъчни култури, особено хондроцити и сърдечни клетки [ 24 ]. Основният недостатък е неравномерният растеж на тъканите, дължащ се на силовото поле. Освен това, центробежната сила може да причини сблъсък между скелетата и стените на биореактора [ 112 ].

- **Пулсиращ поток:** За сърдечно-съдови клетъчни култури, които изискват пулсираща стимулация, биореактори, използващи пулсиращ поток, се използват за имитиране на *in vivo* условия. Обикновено васкуларните клетки се култивират в тубулни скелета [ 112 ].

С технологични и дизайнерски инструменти могат да бъдат произведени все по-мощни биореактори, предназначени за специфично приложение, с висока специализация и ефективност [ 24 ]. Основното предположение в дизайна на биореактора е, че същите фактори и стимули, които определят фенотипната природа и функционалностите на тъканите и клетките *in vivo*, също определят прогресията на клетките *in vitro* [ 114 ]. Няколко тъкани се култивират, осигурявайки механични, електрически, химични и смесени системи, имитиращи средата на *in vivo* условия. Кожата и хрущялните тъкани са едни от най-успешно култивираните – последната главно поради своята аваскуларна природа – осигуряваща механична стимулация в рамките на статични или динамични култури [ 23, 115 ]. Освен това, силен поток, с компресионно напрежение, се използва за култура на костна тъкан [ 116 ]. Zimmermann et al. внедриха система, способна да прилага пасивно циклично механично разтягане вътре в системата за култивиране към конструкции за инженерство на сърдечна тъкан [ 117, 118 ]. За сърдечната тъкан, перфузионните биореактори, способни също да осигурят електрическа стимулация, са специално проектирани и тествани [ 119, 120, 121 ]. Други специфични биореактори се прилагат за сърдечни клапи и кръвоносни съдове [ 112, 120 ].

#### 4.5. Увеличаване на индустриалния процес

При производството на култивирано месо има **няколко технологични предизвикателства** за постигане на подходящо мащабиране. **В този контекст ключовият въпрос е свързан с широкомащабни биореактори за голям обем на клетъчно производство и създаване на тъкани.** Според Post et al., изследването ще тества други конфигурации и типове биореактори за постигане на по-висока плътност на клетките чрез минимизиране на използването на биоресурси и разходите, за да се превърне култивираното месо в стока [ 27 ].

Според същия автор, първоначалното производство на клетки и узряването на тъканите ще бъдат два отделни и различни етапа с различни проблеми.

- Първият е свързан с клетъчната пролиферация чрез подходящ коефициент на умножение – не по-нисък от  $\times 10^9$  - и има за цел да поддържа клетките в състояние на експоненциален растеж и да ги предпази от преждевременна диференциация.
- Вторият е свързан с осигуряването на правилни стимули и осигуряване на хранителни вещества по ефективен начин [ 88 ].

Индустриалният стандарт за клетъчни биореактори от бозайници са резервоари с разбъркване, в които клетките са в суспензия, агрегирани или прикрепени към **микроносители** [ 21, 31 ]. За да се създадат ефективни и рентабилни културни системи,

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



базиран на микроносители, трябва да се изправят няколко предизвикателства, като първото е повърхността и физическите свойства на микроносителите: заряд, покритие, повърхност и размер [88]. Освен това, според перспективата, предоставена от Vodiou et al., трябва да се обърне внимание на връзката между микроносителите и крайния продукт, като се вземат предвид технологичните възможности. Сценарият с временни микроносители представя нерешения проблем с отделянето и възстановяването на клетките, докато за другите два сценария (неядливи, но разградими микроносители и годни за консумация микроносители, вградени в крайния продукт), ядливите или биоразградимите материали, които ще се използват, и производствените технологии са първични проблеми [89]. В случай на скелета или натоварени с клетки конструкции в процеса на зреене, основните предизвикателства са свързани с правилните клетки за механична стимулация, изискващи правилно подравняване и, в крайна сметка, механично напрежение, и увеличаване на транспорта на материала за ефективно използване на средата, въвеждане на техники за рециклиране [24, 87, 88]. Според Martin et al., **преходът от лабораторна партида към индустриален биореактор ще изисква преход от гъвкави биореактори към високоспециализирани системи, оптимизирани и стандартизирани от гледна точка на биопроектирането** [24].

Промисленото мащабиране също представлява съществена стъпка за получаване на конкурентен продукт на пазара.

Първият пример за култивиран бургер беше представен през 2013 г. в Холандия и изискваше обща цена за производство от 300 000 \$ [42]. След тази презентация няколко компании и изследователски групи се опитаха да отговорят на това сложно предизвикателство. Според Guan et al., **настоящите (2020) прогнозни разходи за култивирани месни или рибни продукти варират от 66,4 \$/kg до 2200,5 \$/kg** в сравнение с няколко долара на килограм за конвенционалното месо и по-голямата част от разходите се приписват към клетъчно и тъканно култивиране [122].

От гореспоменатата дискусия основната цел за постигане на култивирано месо може да бъде постигната само ако бъдат намерени нови подходи за достъпни, мащабируеми и устойчиви системи за култивиране. Те трябва да бъдат изпълнени чрез използване на няколко метода за проектиране, включително *in silico* модели за производствения процес на биореактора [92]. Процесът трябва да бъде рентабилен, следователно използваните материали трябва да идват от изобилни източници без животни, а производственият процес трябва да бъде мащабируем, икономичен и устойчив, с минимално производство на отпадъци [27].

## 5. Приемане от потребителите

Въпреки че основната цел на този преглед беше да се разгледат и проучат технологичните и биотехнологични предизвикателства, необходимо е да се подчертае, че **приемането от потребителите играе ключова роля в разпространението на култивирано месо**. Брайънт и др. проведе систематичен преглед на няколко проучвания по тази тема [123]. Тази работа подчертава сложността при формулирането на пълна картина във възприятието на хората за култивирано месо. Различните проучвания отчитат различни резултати.

Средната степен на приемане на култивирано месо, отчетена от Wilks и Philip, е 63,5%, докато същият параметър, идентифициран от Hocquette, варира между 5% и 11% [124, 125]. Тези резултати са противоречиви поради популацията и разглежданата проба, както и структурата на въпросите (как е формулиран въпросникът, напр. **желание да се опита култивирано месо срещу желание да се яде редовно**) [126]. Най-честите възражения са свързани с **неестествеността на продукта, личното усещане, че е по-**

Red  Amber  Green  White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



малко безопасно и здравословно от истинското месо, и очакваното впечатление, че продуктът има по-лош вкус, текстура и външен вид, придружени от по-висока цена.

Обратно, положителните аргументи са свързани с хуманното отношение към животните и ползите за околната среда, но в същото време са придружени от съмнения относно осъществимостта и етичния статус [ 125 ]. Както е предложено от Марк Пост, водещ автор в областта на култивираното месо, приемането на този продукт от клиентите ще остане спекулативно, докато този продукт действително не бъде на пазара [ 66 ].

## 6. Изводи

Постоянното и бързо нарастване на световното население доведе до изследвания за намиране на нови източници на протеини, които да отговорят на нарастващото търсене. При този сценарий клетъчното земеделие, по-специално култивираното месо, предизвиква нарастващ интерес. Култивираното месо предизвиква интензивен дебат между онези, които го виждат като иновативен, етичен и устойчив продукт, и тези, които са скептични. Пълната реализация на този продукт ще се изправи пред множество предизвикателства, както от биотехнологична, така и от технологична гледна точка.

В първия случай изборът на животно и метод за събиране на клетки представлява решаваща стъпка в широкомащабното производство на култивирано месо, придружено от идентифициране на заместители на FBS, способни да поддържат клетъчната жизнеспособност и пролиферация както в краткосрочен, така и в дългосрочен план. Въпреки че, както беше съобщено по-рано, бяха направени първите стъпки в тази посока, **алтернатива, напълно свободна от животни, която може да съответства на характеристиките на ефективността на FBS, все още е далеч от осъществяване.**

Биотехнологичният подход също ще бъде от съществено значение за създаването на продукт, който е не само безопасен, но и отразява традиционното месо. Въпреки че е вярно, че промените в животновъдния сектор, **оказаха въздействие върху околната среда, също толкова вярно е, че те направиха възможно предлагането на нашите маси на продукти, характеризиращи се с високо хранително и функционално качество. Този втори аспект, освен че играе важна роля по отношение на приемането от страна на потребителите, представлява едно от най-трудните предизвикателства за преодоляване.** Следователно е необходимо всички тези органолептични и функционални характеристики, които в традиционното месо са пряко следствие от храненето и благосъстоянието на животните, да се възпроизведат в култивираните продукти.

**От техническа гледна точка предизвикателството е свързано с внедряването на надеждна и мащабируема производствена верига.** Общите предизвикателства са свързани както със системите за производство, така и със системите за култивиране. Що се отнася до производството, в литературата няколко подхода са показани като много обещаващи: от скеле, което е по-стара, но добре позната технология, до нейните алтернативи, накрая до биофабрикация и 3D биопринтиране. Последното може потенциално да представлява промяна на играта, дори ако трябва да се преодолеят няколко специфични предизвикателства, като например правилния избор на материали като баланс на химични, механични и биологични характеристики, оптимизирани както за обработваемост, така и за съвместимост на процеса на клетъчния цикъл. Освен това 3DBP може да доведе до затворена система и процес, предназначени да намалят риска от замърсяване [ 33 ] по мащабируем и модулен начин.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



Друга голям въпрос е свързан с диференциацията на клетките в рамките на конструктите (скелетата) чрез биореактори, което трябва да бъде постигнато нужните големи мащаби, а не просто в лабораторен мащаб.

В заключение, няколко биотехнологични и технически предизвикателства трябва да бъдат допълнително проучени, за да се постигнат целите за качество, безопасност и приемане от потребителите. При този сценарий е от първостепенно значение да се насърчават изследователски инициативи с характер на отворен достъп за разпространение на научни изследвания, резултати и решения между публични и частни партньори, участващи в производството на култивирано месо.

### Източници:

Lanzoni D, Bracco F, Cheli F, Colosimo BM, Moscatelli D, Baldi A, Rebucci R, Giromini C. Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production. Applied Sciences. 2022; 12(13):6771. <https://doi.org/10.3390/app12136771>  
<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/13/6771>

Всички препратки в настоящия превод можете да намерите в оригиналната статия.



*Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:*

<http://corhv.government.bg/>  
<http://corhv.government.bg/?cat=27>  
<http://corhv.government.bg/?cat=71>

### Както и следните материали на ЦОПХВ по темата за изкуственото месо и мляко:

*„ВНИМАНИЕ – ИЗКУСТВЕНО МЕСО! Отглежданите в лаборатории меса може да променят хранителната индустрия завинаги“;*

[bit.ly/3X9CDGn](http://bit.ly/3X9CDGn)

*„ВНИМАНИЕ – ИЗКУСТВЕНО МЛЯКО! Според изследователите лабораторните млечни продукти скоро ще заместят млякото;*

[bit.ly/3p5nI3C](http://bit.ly/3p5nI3C)

*Италия предлага забрана на лабораторното месо и брашно от насекоми в паста и пица – Унгария въведе строги изисквания за храната от насекоми*

[bit.ly/3X3ZIdA](http://bit.ly/3X3ZIdA)

Изготвил: Д-р Мадлен Василева; 14.06.2023 г., ЦОПХВ

Red    Amber    Green    White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

