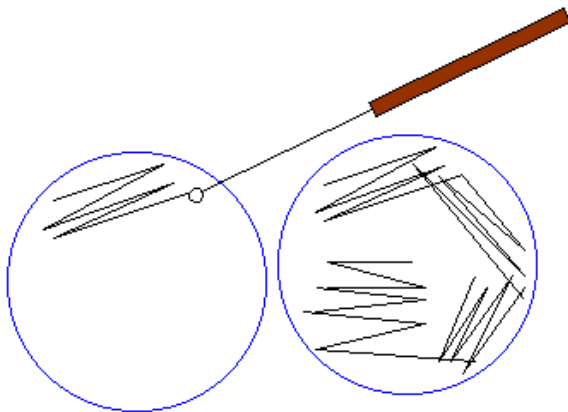


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

- **ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Ιωάννα Β. Χήνου
Καθ. Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ**

Αθήνα 2020

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

1.ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Η **Βιοτεχνολογία** (Biotechnology) είναι όρος ελληνικής προέλευσης, (βίος+τεχνολογία). Περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες που αφορούν την αξιοποίηση ιδιοτήτων ζωντανών οργανισμών, για την παραγωγή ή/και την βελτίωση υπαρχόντων. Στην Βιοτεχνολογία άρα, χρησιμοποιούνται βιολογικά υλικών και μέσω τεχνικών διεργασιών παράγονται προϊόντα που υπάρχουν στην φύση ή είναι νέα.

Ο ορισμός αυτός δείχνει ότι η Βιοτεχνολογία είναι μία διεπιστημονική δραστηριότητα με εφαρμοσμένους στόχους. Οι βασικοί επιστημονικοί άξονές της είναι η Μικροβιολογία, η Βιοχημεία, η Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία, η Γενετική και η Χημική Μηχανική. Περιλαμβάνει αντιδράσεις και διαδικασίες που πραγματοποιούνται από μικροβιακά, ζωικά ή φυτικά κύτταρα, από κυτταρικά οργανίδια ή από ενεργά βιομόρια όπως π.χ. τα ένζυμα.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η Βιοτεχνολογία δεν είναι νέο επιστημονικό πεδίο. Έχει ιστορία χιλιάδων χρόνων, αφού οι πρόγονοί μας χρησιμοποιούσαν τις ιδιότητες και τις δυνατότητες των ζωντανών οργανισμών, μέσω των ζυμώσεων για παράδειγμα, για να παράγουν προϊόντα όπως ψωμί, κρασί, μπύρα, ξύδι κλπ. Τα τελευταία 35 χρόνια, με την εξέλιξη και τις νέα δυνατότητες των μοριακών τεχνικών έχει γίνει δυνατή η αξιοποίηση αυτής της γνώσης για διάφορες εφαρμογές.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι σπουδαιότεροι σταθμοί στην ιστορική εξέλιξη της Βιοτεχνολογίας.

Πιν. 1 Ιστορική εξέλιξη της Βιοτεχνολογίας

Πριν το 3.000 π.Χ.	Ζύμωση ψωμιού. Αλκοολική ζύμωση χυμών φρούτων
Πριν το 300 π.Χ.	Παραγωγή μορφής μπίρας Σουμερία, Βαβυλωνία, Αίγυπτος
1150 μ.Χ.	Παραγωγή αλκοολούχων ποτών από οίνο
1400	Βιομηχανική παραγωγή ξυδιού (Βιομηχανία στην Ορλεάνη)
1663	Ανακάλυψη των κυττάρων από τον Leeuwenhoek
1818	Ανακάλυψη ιδιοτήτων μικροοργανισμών από τον Erxleben
1830	Ανακάλυψη των πρωτεϊνών από τον Muller
1857	Ο Pasteur ανακαλύπτει τη γαλακτική ζύμωση
1858	Παραδοχή εξάρτησης των ζυμώσεων από τα ένζυμα
1881	Μικροβιακή παραγωγή γαλακτικού οξέως
1897	Ένζυμα αλκοολικής ζύμωσης στις ζύμες-Buchner
1900	Βιομηχανικές εγκαταστάσεις καθαρισμού αποβλήτων πόλεων
1914-1919	Βιομηχανική παραγωγή ζύμης (αρτοποιία-βιομηχανία τροφίμων)
1915	Βιοτεχνολογική παρασκευή βουτανόλης-ακετόνης Weizmann
1920	Χρωμοσωμική θεωρία κληρονομικότητας από τον Morgan
1929	Ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Fleming
1937	Μικροβιακές μετατατροπές από Memoli & Vercellone
1938	Καλλιέργεια ιστών εκτός οργανισμού
1941	Ανακάλυψη σχέσης γονιδίων-ενζύμων (Beadle & Tatum)
1941-1942	Παραγωγή πενικιλίνης σε βιομηχανική κλίμακα
1944-1948	Ανακάλυψη στρεπτομυκίνης & χλωροτετρακυκλίνης (Schatz, Waksman και Duggar)
1944	Ανακάλυψη του DNA ως μέσου μεταφοράς κληρονομικών χαρακτηριστικών (Avery, Mcleod και McCarthy)
1949	Παραγωγή οξικού οξέως από μικροοργανισμούς. Μικροβιακή παραγωγή βιταμίνης B12
1950	Ανακάλυψη πολλών αντιβιοτικών
1953	Ανακάλυψη της δομής του DNA από τους Watson και Crick, αρχή Βιοτεχνολογίας και θεμέλιο της γενετικής μηχανικής
1956	Ανακάλυψη των μηχανισμών σύνθεσης RNA και DNA
1960-1961	Προσδιορισμός γενετικών μηχανισμών σύνθεσης πρωτεϊνών (Monod και Jacob)
1966	Επίτευξη ακινητοποίησης ενζύμων (Chibata και Tanabe)
1969	Σύνθεση ενζύμων
1970	Σύνθεση ολόκληρου γονιδίου
1972	Ανάπτυξη τεχνικών ανασυνδυασμού DNA
1977	Έκφραση γονιδίων παραγωγής της ορμόνης σωματοτροπίνης, από κύτταρα θηλαστικών σε βακτήρια
1978	Παραγωγή ινσουλίνης σε πιλοτική κλίμακα με χρήση γενετικής μηχανικής από μικροοργανισμούς
1982-1983	Παραγωγή βιομορίων (ορμονών, εμβολίων) με μεθόδους Γενετικής Μηχανικής, Βελτιώσεις βιοαντιδραστήρων
1984	Δημιουργία τράπεζας Πληροφοριών γονιδιακής σύνθεσης
1985	Κλωνοποίηση DNA
1988-σήμερα	Ανάπτυξη Βιοτεχνολογίας με παραγωγή βιομορίων, γονιδιακές θεραπείες, περιβαλλοντικές εφαρμογές)

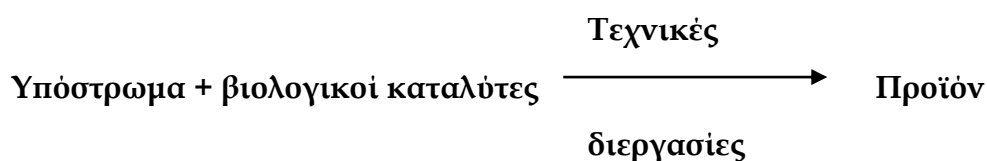
Θεωρητικά λοιπόν η πρώτη οργανική ένωση που παρασκευάστηκε βιοτεχνολογικά ήταν η «αιθυλική αλκοόλη». Το «κρασί» ήταν ήδη γνωστό 2.000 χρόνια π.Χ. στην Ασσυρία. Η «μπύρα» αναφέρεται σε μνημεία των Σουμερίων και σε άλλα ιστορικά ευρήματα των Βαβυλωνίων και των Αιγυπτίων προϊστορικής εποχής. Άλλα προϊόντα ζύμωσης γνωστά από την αρχαιότητα υπήρξαν το ψωμί και το ξύδι στην Ασσυρία, Βαβυλωνία και την Αίγυπτο. Το πρώτο προϊόν που παρασκευάστηκε βιομηχανικά ήταν το ξύδι στην Ορλεάνη της Γαλλίας στο τέλος του 14^{ου} αιώνα. Την εξήγηση της παρασκευής αλκοόλης από σάκχαρα έδωσε τον 18^ο αιώνα ο Lavoisier. Όμως ως θεμελιωτής της Βιοτεχνολογίας θεωρείται ο Pasteur λόγω των παρατηρήσεών του στους μικροοργανισμούς, ενώ ο Koch ανέπτυξε την τεχνική καλλιιεργειών μικροοργανισμών.

Η βιοτεχνολογία προχώρησε στην παρασκευή χημικών ουσιών όπως γλυκερίνης, μίγματος βουτανόλης/ακετόνης και κιτρικού οξέος. Μετά την ανακάλυψη της αντιμικροβιακής δράσης της πενικιλίνης το 1928-29 από τον Alexander Fleming προέκυψε η ανάγκη για παρασκευή καλλιιεργειών σε βιομηχανική κλίμακα. Η μοριακή βιολογία με την γενετική μηχανική άνοιξαν νέους ορίζοντες και την δεκαετία του '80 οι επιστήμονες προχώρησαν σε επεμβάσεις στο DNA *in vitro* βάζοντας τα θεμέλια στις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA. Έτσι στις μέρες μας μικρόβια μπορούν να συνθέσουν ανθρώπινες ορμόνες (π.χ. ινουλίνη), παράλληλα με τις μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA επιτυγχάνεται η σύνθεση νέων επιθυμητών προϊόντων όπως στην παραγωγή πρωτεϊνών, επειδή οι πρωτεΐνες είναι κατά κύριο λόγο το άμεσο προϊόν των γονιδίων. Οι έρευνες έστρεψαν επίσης ενδιαφέρον τους στην παρασκευή ανασυνδυασμένου DNA, που έχει την ικανότητα να εκτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες. Για παράδειγμα, παρασκευάστηκε ανασυνδυασμένο DNA, που συγκεντρώνει την ικανότητα εκτέλεσης 29 κατεργασιών για την παρασκευή ερυθρομυκίνης. Σήμερα η βιοτεχνολογία εξελίχθηκε στην τεχνολογία υβριδωμάτων, στην χρησιμοποίηση κυττάρων ή ενζύμων ακινητοποιημένων και στην ικανότητα παραγωγής φυτών από απλά κύτταρα. Οι επεμβάσεις στο DNA θεωρούνται ως

το σημαντικότερο επίτευγμα της βιοτεχνολογίας όχι μόνο γιατί ανοίγει νέα επιστημονικά μονοπάτια, αλλά και γιατί είναι και το μόνο που απέφερε εξαιρετικά οικονομικά οφέλη (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα, διαγνωστικά αντιδραστήρια, εμβόλια, βιομόρια κλπ.).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ

Ο ορισμός για τις περισσότερες βιοτεχνολογικές διεργασίες θα μπορούσε να εκφραστεί με την εξίσωση



Το υπόστρωμα, η αρχική δηλαδή πρώτη ύλη μπορεί να είναι βιολογικό υλικό, χημική ένωση ή μίγμα συστατικών, αποτελείται από πηγές C, N, ανόργανα άλατα και άλλα στοιχεία.

Οι βιολογικοί καταλύτες περιλαμβάνουν τα ένζυμα, τους μικροοργανισμούς, ιστούς, κύτταρα ή τμήματα κυττάρων και μετατρέπουν το υπόστρωμα σε προϊόν.

Το τελικό προϊόν μπορεί να είναι κυτταρική μάζα, μεταβολικό προϊόν (π.χ. αιθανόλη), βιομάζα (πχ.μαγιά) ή μόριο που έχει υποστεί βιομετατροπή της χημικής του δομής.

Οι τεχνικές διεργασίες περιλαμβάνουν **1.**την μεθοδολογία παραγωγής ή μετατροπής και **2.** τις διεργασίες της **ανάκτησης** του στην τελική μορφή.

Στην περίπτωση χρησιμοποίησης μικροοργανισμών ή διεργασία παραγωγής ή μετατροπής ονομάζεται **ζύμωση** και μπορεί να γίνει παρουσίας αέρα (**αερόβια**) ή απουσία του (**αναερόβια**) σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από αυστηρές συνθήκες στον **βιοαντιδραστήρα**.

Ο σχεδιασμός και η λειτουργία των βιοαντιδραστήρων σε βιοτεχνολογικές διαδικασίες αποτελεί βασικό σημείο στις βιοτεχνολογικές διαδικασίες. Η Βιοτεχνολογία συνδυάζει τις γνώσεις των επιστημών της

βιολογίας, βιοχημείας, μικροβιολογίας, μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, χημείας, φυσικής, βιομηχανικής και τεχνικής χημείας και μηχανικής κλπ. Έτσι είναι δυνατόν να σχεδιάζεται και να ελέγχεται η πορεία της κάθε βιοτεχνολογικής διαδικασίας καθώς και η απόδοση του τελικού προϊόντος με την εξασφάλιση ειδικών συνθηκών.

ΣΤΟΧΟΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Στις επιστημονικές καινοτομίες που αποτέλεσαν σταθμούς στην ανάπτυξη της σύγχρονης Βιοτεχνολογίας περιλαμβάνονται:

-Βασικές ανακαλύψεις σε σχέση με την δομή του DNA με στόχο τη δημιουργία νέων μορφών ζωής με επιθυμητά χαρακτηριστικά

-Βελτίωση των τεχνικών χειρισμού κυττάρων και βιομορίων υπό ελεγχόμενες συνθήκες για την παραγωγή προϊόντων (το παραγόμενο προϊόν να είναι σταθερής μορφής)

-Βελτίωση της απόδοσης των διεργασιών ανάκτησης βιοπροϊόντων με την χρήση προηγμένης τεχνολογίας (η διεργασία να γίνεται κατά τον οικονομικότερο τρόπο δηλ. χωρίς σπατάλη βιοκαταλυτών μετά από μακροχρόνιες μελέτες και εφαρμογή συνθηκών ώστε να αυξάνεται η απόδοση των τελικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Μεταξύ των στόχων της Βιοτεχνολογίας που σήμερα θεωρούνται εφικτοί είναι:

Τομέας υγείας

- Ραγδαία επέκταση χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων, ως διαγνωστικών μέσων, κατά του καρκίνου κλπ.
- Στην φαρμακολογία: Για την μελέτη του τρόπου λειτουργίας των καρκινογόνων παραγόντων, των μηχανισμών δράσεως των διηθητικών και του ρόλου των αυτο-ανοσοδιαταραχών.
- Γονιδιακή θεραπεία
- Χρήσης της Γενετικής μηχανικής για τον εντοπισμό των αιτίων που προκαλούν κληρονομικές ασθένειες (περισσότερες από 3.000).

- Κατανόηση του μηχανισμού ανοσολογικής ανεπάρκειας και της αντιμετώπισης σχετικών ασθενειών.

Φαρμακευτική βιομηχανία

- Σχεδίαση νέων φαρμάκων παραγομένων μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών, όπως η παρασκευή ορμονών (αυξητική ορμόνη, κορτιζόνη, οιστρογόνα, ινσουλίνη), αντιβιοτικών, εμβολίων, αντιφλεγμονωδών, αλκαλοειδών, βιταμινών κλπ.
- Μετατροπή χημικής δομής ουσιών για την παραλαβή φαρμάκων: αυτή συντελείται με διάφορους τρόπους πχ. Υδρόλυση, απομεθυλίωση, υδροξυλίωση, αναγωγή διπλών δεσμών.
- Παρασκευή διαγνωστικών μέσων: **α)** βιοδιαγνωστικά μέσα για τον έλεγχο διαταραχών στην λειτουργία του οργανισμού όπως μονοκλωνικά αντισώματα για διάγνωση καρκίνου, εμφραγμάτων κλπ. **β)** βιοκαταλύτες για την χημική ανίχνευση ουσιών όπως ένζυμα για την ανίχνευση ουσιών σε τροφές ή σε βιολογικά υγρά.
- Πρόληψη απόρριψης μοσχευμάτων πχ. μοσχευμάτων των νεφρών με μονοκλωνικά αντισώματα (ιστοσυμβατότητα).
- Στόχευση φαρμάκων σε συγκεκριμένους υποδοχείς (drug targeting) όπως συμβαίνει με την χημειοθεραπεία για την θεραπεία του καρκίνου.
- Βελτίωση της εισαγωγής φαρμάκων στους βιολογικούς οργανισμούς μέσω εγκλωβισμών σε λιποσώματα, εγκαψυλίωσης κλπ..
- Δημιουργία κατευθυνόμενων προς τον στόχο (μη υγιή κύτταρα) φαρμάκων όπως εμβολίων, αντισωμάτων κλπ. (targeting).
- Παραγωγή πολυπεπτιδικών ορμονών μέσω Γενετικής μηχανικής
- Παρασκευή αμινοξέων και ενζύμων. Σήμερα βιοτεχνολογικά παρασκευάζονται περί τα 25 ένζυμα καθώς και πολλά αμινοξέα.

Χημική βιομηχανία και άλλες εφαρμογές

- Εξοικονόμηση χρόνου: Οι βιομετατροπές λόγω μεγάλης εξειδίκευσης των βιοκαταλυτών είναι πολύ ταχύτερη σε σύγκριση με τις κλασσικές οργανικές συνθέσεις.

- Μικρότερο κόστος: Ορισμένα προϊόντα μπορούν να παραχθούν με πολύ «ηπιότερο» τρόπο (π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλού κόστους πρώτες ύλες).
- Αξιοποίηση φθηνών υλικών για παραγωγή προϊόντων υψηλότερης αξίας πχ. από τον ορρό γάλακτος μπορεί να παραχθεί αιθανόλη.
- Υψηλή απόδοση: Οι αποδόσεις των βιομετατροπών είναι πάρα πολύ υψηλές για παράδειγμα δεν παράγονται υποπροϊόντα.
- Φιλικές προς το περιβάλλον οι βιοτεχνολογικές διεργασίες. Η ανακύκλωση με βιολογικούς καταλύτες συντελεί στη μείωση της ρύπανσης.
- Στην βιομηχανία τροφών: Για την παρασκευή νέων τύπων ή βελτίωση των γνωστών προϊόντων (τυρί, κρασί κλπ.).
- Στην ανακύκλωση, δηλαδή είτε καθαρισμό υποστρώματος ώστε να ξαναχρησιμοποιηθεί, είτε δραστική μετατροπή του ώστε να παραχθεί άλλο προϊόν με διαφορετική χρήση (πχ. χρωστικές, αρωματικές ενώσεις, ενώσεις για βιολογικό καθαρισμό).

Γεωργία-Αγροτικές εφαρμογές

- Αύξηση παραγωγής φυτών: Στην γεωργία, όπου οι ανάγκες για σίτιση του πληθυσμού είναι αυξημένες.
- Αύξηση ποσοστού δευτερογενών μεταβολιτών: Αυτό γίνεται για να βελτιωθεί η ποιότητα του φυτού καθώς και η αντίστασή του σε έντομα, ασθένειες ή απόκτηση ειδικών χαρακτηριστικών.
- Αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών είτε πρόκειται για φάρμακα, είτε για παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του φυτού (άρωμα, γεύση, χρώμα - σε καλλωπιστικά φυτά-) είτε για αυτοάμυνα του φυτού σε παθογόνους παράγοντες

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Στην εφαρμογή των βιοτεχνολογικών διεργασιών αντιμετωπίζονται προβλήματα και υπάρχουν και μειονεκτήματα όπως:

- Ανενεργοποίηση των ενζύμων πχ. όταν η συγκέντρωση του προϊόντος υπερβεί κάποιο όριο, το ένζυμο καθίσταται ανενεργό.
- Απαιτηση στείρων συνθηκών: αυτή αυξάνει το κόστος των εγκαταστάσεων.
- Οι *retro*- αντιδράσεις: Σε μερικές περιπτώσεις η αντίδραση υποστρώματος- τελικού προϊόντος μπορεί να γίνει προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η ταυτόχρονη και έγκαιρη απομάκρυνση του επιθυμητού προϊόντος με διάφορους τρόπους μπορεί να αυξήσει το κόστος.
- Η πρώτη ύλη απαιτείται να είναι σταθερή, γι' αυτό οι συνθήκες αποθήκευσης και προετοιμασίας της (αν πχ. είναι ογκώδης) απαιτείται παραπάνω έξοδα (πχ. ξύλο ή χαρτί → γλυκόση).
- Η συντήρηση των μικροοργανισμών μερικές φορές απαιτεί έξοδα (ειδικές συνθήκες φύλαξης, άλατα διατροφής τους).
- Η απαίτηση σταθεροποιητών ενζύμων .Στις περιπτώσεις που τα ένζυμα καθίστανται ανενεργά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σταθεροποιητές γι' αυτά, οι οποίοι όμως ανεβάζουν το κόστος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Primrose S.B. Modern Biotechnology, Blackwell Scientific Publ.Oxford 1987
2. Χαρβάλα Α., Χήνου Ι., Βασικές αρχές στη βιοτεχνολογία-Βιολογικοί έλεγχοι. Φοιτητικές σημειώσεις Φαρμακευτικού Τμήματος. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 1997
3. Prave P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.A. Basic Biotechnology-A Student's Guide VCH 1989

2.ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Είδη μικροοργανισμών-Χαρακτηριστικά

Οι Μικροοργανισμοί έχουν απλή βιολογική οργάνωση σε σύγκριση με τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Οι σπουδαιότεροι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον περιγράφονται παρακάτω.

Βακτήρια (Σχιζομύκητες)

Μορφολογικά χαρακτηριστικά-Διατροφή

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δείχνουν ότι τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί με μικρό μέγεθος (0.5-3μm)

Είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί (δεν έχουν μιτοχόνδρια-πλαστίδια) και οι γενετικές τους πληροφορίες δεν είναι ετοπισμένες σε χρωμοσώματα, αλλά είναι ελεύθερες στο πρωτόπλασμα.

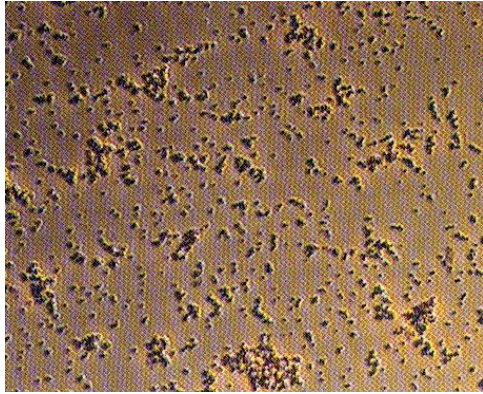


Από άποψη διατροφικών απαιτήσεων τα βακτήρια διακρίνονται σε αυτότροφα και ετερότροφα (σαπρόφυτα ή παράσιτα). Τα πρώτα χρησιμοποιούν CO₂ σαν μοναδική πηγή άνθρακα ενώ τα δεύτερα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν CO₂ για τον ίδιο σκοπό και χρειάζεται να προσλαμβάνουν τον άνθρακα από το περιβάλλον σε σχετικά πολύπλοκη μορφή, όπως υπό μορφή σακχάρων. Εκτός από τις ουσίες αυτές, απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξή τους είναι επίσης ανόργανα άλατα και παράγοντες ανάπτυξης.

Το σχήμα των βακτηρίων μπορεί να είναι σφαιρικό, ραβδόμορφο ή σπειροειδές.

Τα βακτήρια διαιρούνται σε :

1. Κόκκοι: σφαιρίδια διαμέτρου 0.5-1μm που χωρίζονται σε:



α. Διπλόκοκκοι: δύο σφαιρίδια προς μία διεύθυνση

β. Στρεπτόκοκκοι: πολλά σφαιρίδια προς μία κατεύθυνση σχηματίζοντας αλυσίδα

γ. Τετράκοκκοι: τέσσερα σφαιρίδια δύο διευθύνσεων

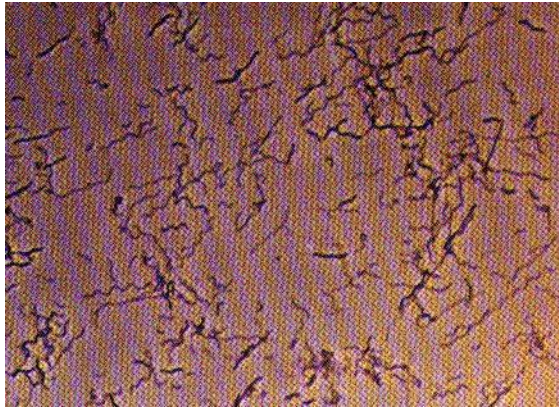
δ. Σταφυλοκόκκοι:σφαιρίδια πολλά προς τρεις διευθύνσεις, μη συγκεκριμένης κατανομής

2. Κόλλυδροι κυλινδρικά κώτταρα πλάτους 0.-2.2 μm και μήκους 1.2-7.0μm που υποδιαιρούνται σε:

α. Βάκιλλοι, βακτήρια κυλινδρικού σχήματος

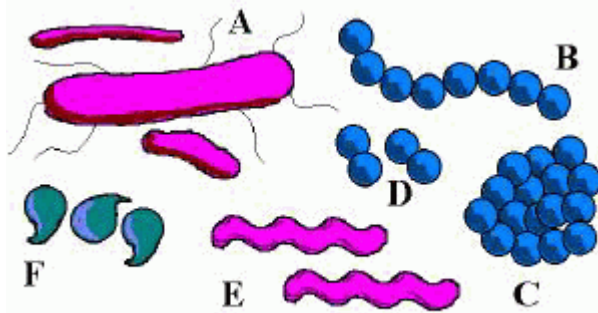


β. Δουάκια: (vibriosis) σχήματος κόμμα



γ. Σπειροειδή:(σπειρύλλια-σπειροχαίτες)

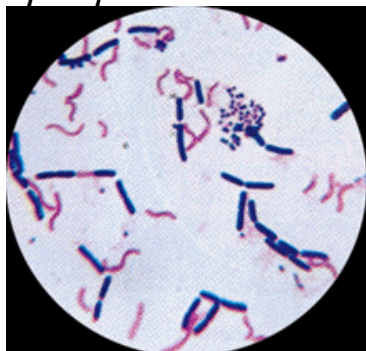
Σχηματικά φαίνονται στο παρακάτω σχήμα



- A. Βακτήρια κυλινδρικού σχήματος (Βάκιλλοι)
- B. Πολλά σφαιρίδια προς μία κατεύθυνση (Στρεπτόκοκκοι)
- C. Σφαιρίδια πολλά προς τρεις διευθύνσεις (Σταφυλοκόκκοι)
- D. Ζεύγη σφαιριδίων (Διπλόκοκκοι)
- E. Σπειροειδή (σπειρύλλια-σπειροχαίτες).
- F. Κόμμη (Δουάκια *vibriosis*)

Το κυτταρικό τους τοίχωμα έχει υψηλές αντοχές στην υψηλή ωσμωτική πίεση του εσωκυττάρου περιεχομένου (5-20 ατμόσφαιρες) που αναπτύσσονται λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης μορίων στο κύτταρο. Πολλά βακτήρια δημιουργούν έξω από το κυτταρικό τοίχωμα την κάψουλα (ένα μαλακό στρώμα) για προστασία έναντι ικών προσβολών. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος προσδιορίζει την ταξινομική διαφοροποίηση τους σε θετικά και αρνητικά κατά Gram. Ενώ τα βακτήρια συνήθως δεν φωτοσυνθέτουν υπάρχουν είδη του γένους *Rhodospirillum* που διαθέτουν φωτοσυνθετικές ικανότητες.

Χρώση κατά Gram



Γίνεται χρώση του μικροβιακού παρασκευάσματος με:

α. Κρυσταλλικό ιώδες

β. Lugol (ιώδες χρώμα)

γ. Αιθανόλη ή ακετόνη ή μίγμα αιθανόλης ακετόνης 50:50

Μετά και της προσθήκη του γ. το μικροβιακό παρασκεύασμα είτε διατηρεί το ιώδες χρώμα (Gram + χρώση ή Gram + βακτήρια) είτε αποχρωματίζεται (Gram - χρώση ή Gram - βακτήρια). Η διατήρηση ή μη της χρώσης οφείλεται στη διαφορετική μορφολογία των τοιχωμάτων των βακτηρίων (τα Gram + έχουν τοίχωμα πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά) είτε στη διαφορά στον πολυμερισμό του ριβονουκλειικού μαγνησίου). Στις διαφορές αυτές οφείλονται σπουδαίες ιδιότητες, ευαισθησία στα αντιβιοτικά κλπ..

Ορισμένοι γένη θετικών κατά Gram βακτηρίων σχηματίζουν υπό δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος (ακραίες τιμές pH, υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού ή θρεπτικών συστατικών, έκθεση σε τοξικές ουσίες κ.ά) ένα σπόριο στο εσωτερικό του κυττάρου που ονομάζεται **ενδοσπόριο**. Τα **ενδοσπόρια** δημιουργούν προβλήματα κατά την αποστείρωση λόγω θερμοανθεκτικότητας, γεγονός που επιβάλλει εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών (μεγαλύτερων από 120° C).

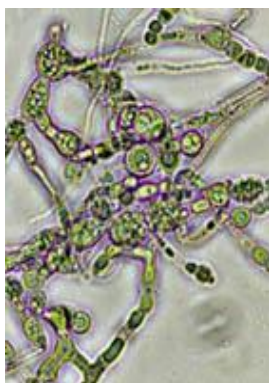
Πολλαπλασιασμός

Ο συνήθης τρόπος πολλαπλασιασμού των βακτηρίων είναι με κυτταρική διαίρεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Ο χρόνος διπλασιασμού διαρκεί από 9-10 λεπτά της ώρας έως μερικές ώρες.

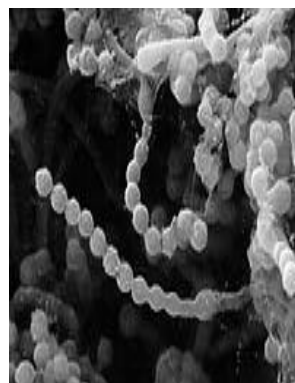
ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι **μύκητες** (*Fungi*) είναι οργανισμοί αυτοί κατατάσσονται στο βασίλειο των φυτών. Ο αριθμός των ειδών τους δεν είναι απόλυτα γνωστός ξεπερνά πάντως τις 50.000, ενώ πολλοί θεωρούν ότι φτάνουν τις 100.000. Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, ετερότροφοι οργανισμοί. Χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα είναι η έλλειψη πλαστιδίων και η απουσία αμύλου ως αποταμιευτικής ουσίας, ενώ το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται κυρίως από χιτίνη. Στους μύκητες βρίσκονται επίσης διάφορες χρωστικές και προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού τους, με μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο (αλκαλοειδή, αντιβιοτικά κ.ά.).

Τό σώμα των μυκήτων αποτελείται σε ορισμένες περιπτώσεις από ένα κύτταρο (**ζυμομύκητες ή ζύμες**), στους περισσότερους όμως απ' αυτούς είναι πολυκύτταρο και έχει τη μορφή μικροσκοπικών σωληνοειδών νημάτων που χαρακτηριστικά ονομάζονται **υφές**. Το σύνολο των υφών αποτελεί το **μυκήλιο**. Ολόκληρο το σώμα των μυκήτων χαρακτηρίζεται ως θαλλός.



Υφές μυκήτων



Μυκήλιο



Σπόρια μυκήτων



Κύτταρα ζυμομυκήτων

Αναπαραγωγή

Οι μύκητες αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς (με ασεξουαλικό και σεξουαλικό τρόπο). Οι κυριότεροι τρόποι **αγενούς αναπαραγωγής** είναι με διαίρεση του κυττάρου τους ή αποβλάστηση, με τεμαχισμό των υφών τους και με διάφορους τύπους σπορίων. Η **εγγενής αναπαραγωγή** παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία.

Τρόπος θρέψης

Οι μύκητες δεν έχουν χλωροφύλλη, άρα δεν φωτοσυνθέτουν. Είναι ετερότροφοι οργανισμοί που ανάλογα με τον τρόπο θρέψης τους μπορούμε να τους χωρίσουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες: τους **σαπροφυτικούς**, τους **παρασιτικούς** και τους **συμβιωτικούς**.

Οι **σαπροφυτικοί** μύκητες χρησιμοποιούν ως τροφή νεκρές οργανικές ουσίες. Σ' αυτούς ανήκουν τα περισσότερα από τα είδη που είναι ορατά με γυμνό μάτι. Οι **παρασιτικοί** μύκητες ζουν πάνω ή μέσα σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς (ξενιστές) απ' τους οποίους και τρέφονται. Διακρίνονται σε προαιρετικά παρασιτικούς και υποχρεωτικά παρασιτικούς. Τα όρια, πάντως, μεταξύ παρασιτισμού και σαπροφυτισμού είναι μερικές φορές δύσκολο να καθοριστούν. Από τις σημαντικότερες περιπτώσεις **συμβίωσης** των μυκήτων είναι αυτή που γίνεται με ορισμένα φύκη, οπότε σχηματίζουν τους λειχήνες.

Οικολογία - Πρακτική σημασία των μυκήτων

Οι μύκητες ζουν σε ποικίλα οικολογικά περιβάλλοντα, σε όλο τον πλανήτη μας. Τους βρίσκουμε στο έδαφος, πάνω στα ανώτερα φυτά, στο νερό των θαλασσών και λιμνών. Τα σπόρια τους είναι πολύ κοινά στον ατμοσφαιρικό αέρα. Πολλοί απ' αυτούς παρασιτούν σε φυτά, σε ζώα και στον άνθρωπο και προκαλούν διάφορες ασθένειες γνωστές με τη γενική ονομασία **μυκητιάσεις**. Υπάρχουν παρασιτικά είδη που είναι εξειδικευμένα και ζουν σε ορισμένο ή ορισμένους ξενιστές.

Οι μύκητες που παρασιτούν στα ανώτερα φυτά προκαλούν σ' αυτά σοβαρές ζημιές, που έχουν ως αποτέλεσμα μεγάλες οικονομικές απώλειες. Διάφοροι μύκητες προσβάλλουν και καταστρέφουν βιομηχανικά προϊόντα, όπως ξυλεία, υφάσματα, δέρματα, χρώματα, πλαστικά ακόμα και το γυαλί. Προσβάλλουν επίσης και καταστρέφουν διάφορα τρόφιμα.

Οι μύκητες που παρασιτούν στον άνθρωπο προκαλούν ασθένειες του αναπνευστικού, ουρολογιογεννητικού συστήματος, του δέρματος ή και γενικευμένες

μυκητιάσεις. Από σπόρια ή μυκήλια μυκήτων που προσλαμβάνονται από τους ανθρώπους ή τα ζώα προκαλούνται επίσης πολλές φορές διάφορες αλλεργίες. Από τη βρώση δηλητηριωδών ειδών μυκήτων (π.χ.,μανιτάρια) προκαλούνται δηλητηριάσεις που μπορεί να είναι πολύ σοβαρές και να καταλήξουν ακόμη και σε θάνατο, όπως συμβαίνει, π.χ., με βρώση των ειδών *Amanita phalloides* κ.ά. Στο γένος *Amanita* ανήκουν τα περισσότερα δηλητηριώδη μανιτάρια και σ' αυτά οφείλεται το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων. Επίσης, όμως πολλά είδη μυκήτων είναι εδώδιμα (φαγώσιμα) και θεωρούνται εκλεκτά εδέσματα, όπως, π.χ., το κοινό καλλιεργούμενο λευκό μανιτάρι (*Agaricus bisporus*), καθώς και εξαιρετικά ακριβές τρούφες.

Μεταξύ των μυκήτων υπάρχουν επίσης μερικά είδη που περιέχουν παραισθησιογόνες ουσίες. Κυριότερα απ' αυτά είναι είδη του γένους *Psilocybe*, που αφθονούν σε περιοχές του Μεξικού. Τα συμπτώματα που προκαλούν είναι παρόμοια με αυτά που προκαλεί η συνθετική χημική ουσία LSD (διαιθυλαμίδιο του α-λυσεργικού οξέος). Εκτός από τα εδώδιμα μανιτάρια, πολλοί μύκητες είναι χρήσιμοι στον άνθρωπο με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους και παίζουν σπουδαίο ρόλο στην τεχνολογία των φαρμάκων και τροφίμων.

Σε συντομία, οι ζυμομόκητες χρησιμοποιούνται στην παρασκευή του ψωμιού, του κρασιού και της μπύρας από τα αρχαία χρόνια. Είδη του γένους *Penicillium* χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ορισμένων τύπων τυριών (π.χ., *Penicillium roquefortii* για το "τυρί ροκφόρ" και *Penicillium camemberti* "τυρί καμαμπέρ").

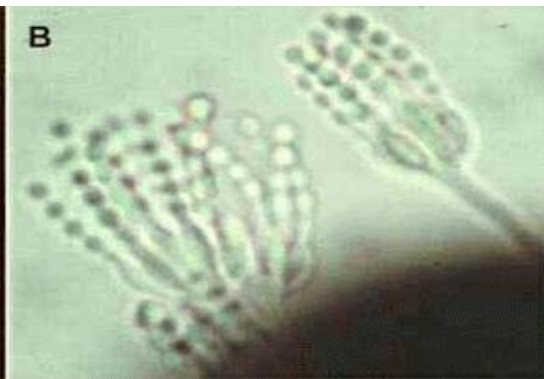
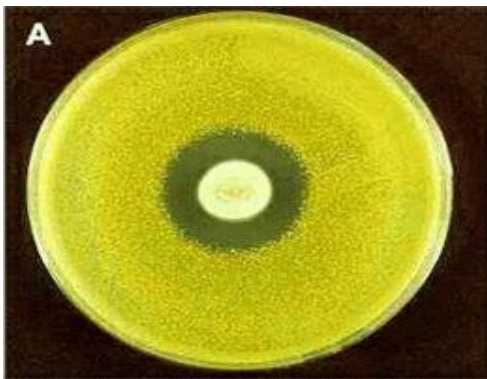
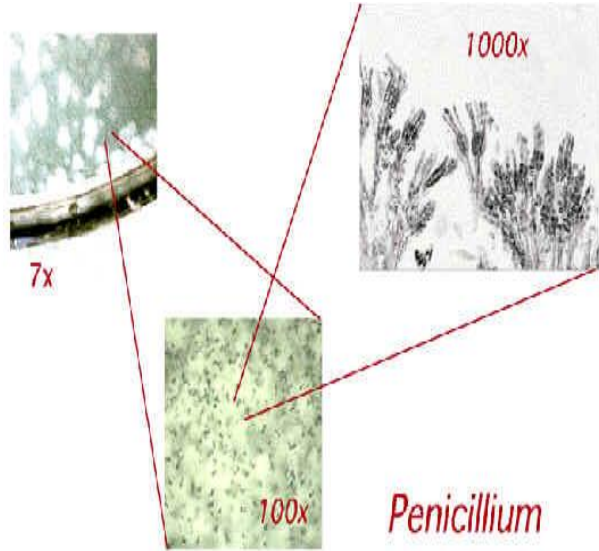
Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραγωγή από μύκητες πολλών αντιβιοτικών ουσιών στη Φαρμακευτική, όπως η **πενικιλίνη** από τα είδη *Penicillium notatum* και *Penicillium chrysogenum* και η **κεφαλοσπορίνη** από είδη του γένους *Cephalosporium*.



Psilocybe cubensis



Amanita phalloides



Το γένος *Penicillium*

Αναλυτικός πίνακας αντιβιοτικών ουσιών που προέρχονται από μύκητες		
Αντιβιοτικό	Μύκητας παραγωγός	Δράση
Πενικιλίνη	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gram-θετικών βακτηρίων
Κεφαλοσπορίνη	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Ευρέος φάσματος
Γριζεοφουλβίνη	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Δερματικών μυκητιάσεων
Ποολομιξίνη Β	<i>Bacillus polymyxa</i>	Gram- αρνητικών βακτηρίων
Αμφοτερικίνη Β	<i>Streptomyces nodosus</i>	Μυκήτων
Ερυθρομυκίνη	<i>Streptomyces erythreus</i>	Gram-θετικών βακτηρίων
Νεομυκίνη	<i>Streptomyces fradiae</i>	Ευρέος φάσματος
Στρεπτομυκίνη	<i>Streptomyces griseus</i>	Gram- αρνητικών βακτηρίων
Τετρακυκλίνη	<i>Streptomyces rimosus</i>	Ευρέος φάσματος
Βανκομυκίνη	<i>Streptomyces orientalis</i>	Gram-θετικών βακτηρίων
Γενταμυκίνη	<i>Micromonospora purpurea</i>	Ευρέος φάσματος
Ριφαμυκίνη	<i>Streptomyces mediterranei</i>	Φυματίωσης

Συνοπτικά - Χρήσεις μυκήτων σε τρόφιμα

Αρτοποιία. Χρήση του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast), που παράγει διοξείδιο του άνθρακα και φουσκώνει το ψωμί.

Σοκολατοποιία. Στις σοκολάτες χρησιμοποιούνται οι μύκητες *Candida krusei* και *Geotrichum* που προκαλούν κατάλληλη ζύμωση στα σπέρματα του κακάο.

Οινοποιία, ζυθοποιία. Χρησιμοποιείται ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* στην παρασκευή μπύρας, κρασιών, σαμπάνιας και άλλων εποχιακών αλκοολούχων ποτών, κατά τη φάση της ζύμωσης, που ο μύκητας παράγει αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα

Φαγώσιμα μανιτάρια. Τα είδη μυκήτων που έχουν προαναφερθεί καταναλώνονται, με προσοχή σε εκείνα τα οποία είναι επικίνδυνα και μπορούν να προκαλέσουν θάνατο.

Κιτρικό οξύ. Παραγωγή κιτρικού οξέος σε όλα τα αναψυκτικά τύπου κόλα, από τον μύκητα *Aspergillus niger*.

Γαλακτοκομικά προϊόντα. Παραγωγή των τυριών ροκφόρ, μπρι, καμεμπέρτ από στελέχη μυκήτων του γένους Penicillium.

ΦΥΚΗ

Τα φύκη απαντώνται σε μεγάλη ποικιλία βιοτόπων. Ζουν σε γλυκά αλλά και θαλάσσια νερά. Πολλά είδη είναι χερσαία και χρησιμοποιούν ως βιότοπους υγρά εδάφη, βράχους και δέντρα ενώ άλλα ζουν στη θάλασσα ή/και μέσα σε σπόγγους και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς και χαρακτηρίζονται από υψηλή δομική οργάνωση. Ορισμένα διαθέτουν όργανα μετακίνησης (μαστιγία) και σημεία ευαίσθητα στο φως που τα βοηθούν να κατευθύνονται προς την πηγή του. Τα μπλε-πράσινα φύκη είναι οι πλέον απλούστεροι οργανισμοί από άποψη θρεπτικών και ενεργειακών απαιτήσεων. Από το ηλιακό φως παίρνουν ενέργεια, από το CO₂ άνθρακα, από την ατμόσφαιρα άζωτο και από το νερό ηλεκτρόνια για την φωτοσυνθετική αναγωγή του CO₂ και την παραγωγή σακχάρων. Πιστεύεται ότι τα φύκη αυτά ήταν οι πρώτοι μικροοργανισμοί που αποίκισαν εδαφικές επιφάνειες κατά την εξέλιξη των ειδών. Ορισμένα φύκη σχηματίζουν αποικίες που φθάνουν μέχρι και τα 50 μέτρα.

Σε ορισμένα φύκη έχουν παρατηρηθεί πολύπλοκες δομές εξωτερικών σκελετών από πυριτικά άλατα (διάτομα). Τα διάτομα αυτά αποτελούν το σημαντικότερο μέρος του φυτοπλαγκτόν. Θεωρητικά το 50-70% του ατμοσφαιρικού οξυγόνου της γης προέρχεται από θαλάσσια φύκη.

Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία (τροφίμων, φαρμάκων-ως πηγή ιωδίου, υφαντουργίας κ.ά), ως τροφή (ιδίως λαών της Ανατολικής Ασίας) και κάποια γένη για λίπασμα.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε μεγάλη αφθονία στην φύση. Συνήθως συλλέγονται από κάποιο δείγμα χώματος, νερού, αέρα και επιλέγονται ορισμένα είδη τα οποία αφήνονται να αναπτυχθούν. Για να γίνει η επιλογή αραιώνεται το θρεπτικό μέσο με αποστειρωμένο νερό ή ισοτονικό διάλυμα, ώστε να διαχωρίζονται οι οργανισμοί σε είδη εφόσον αναπτυχθούν σε επόμενο τριβλίο. Μετά από επώαση δίνουν απλές αποικίες οι οποίες παραλαμβάνονται με ειδικές βελόνες και τοποθετούνται σε άλλα τριβλία. Έτσι δημιουργούνται οι διάφορες «συλλογές» από όπου μπορεί κανείς να προμηθευτεί τους μικροοργανισμούς. Από την πληθώρα των μικροοργανισμών που υπάρχουν μόνο μικρός αριθμός τέτοιων «συλλογών» διατίθεται για βιοτεχνολογική χρήση. Για την καλύτερη αποδοτικότητά τους σ' αυτό το πεδίο, εκτός από την προσεκτική «επιλογή» είναι δυνατόν να υποστούν και μεταλλάξεις π.χ. με ακτίνες Χ ή υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να ληφθούν καλύτερα στελέχη π.χ. το *Penicillium notatum* δίνει 2mg πενικιλίνης /λίτρο, ενώ *P.chrysogenum* που έχει υποστεί μετάλλαξη δίνει 20g/λίτρο.

Πως λειτουργούν

Οι μικροοργανισμοί όταν εμβολιαστούν σε κάποιο θρεπτικό υλικό, εάν και μόλις προσαρμοστούν, αναπτύσσονται όσο υπάρχει υπόστρωμα για τροφή, αν δεν υπάρχει πεθαίνουν, δηλαδή αρχικά δεν αυξάνονται σε αριθμό μέχρι να προσαρμοστούν στο υπόστρωμα, μετά πολλαπλασιάζονται με λογαριθμική ταχύτητα και τέλος σταθεροποιούνται αριθμητικά, ενώ μόλις καταναλωθεί το θρεπτικό υπόστρωμά τους πεθαίνουν. Με μαθηματικούς υπολογισμούς μπορεί να βρεθεί ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων και φυσικά η συγκέντρωσή τους στο υπόστρωμα. Στη Βιοτεχνολογία όμως, το θρεπτικό υπόστρωμα της μικροβιολογίας ταυτίζεται με το προϊόν-υπόστρωμα που θα υποβληθεί σε βιο-μετατροπή. Πολλοί μικροοργανισμοί ενεργούν σαν βιοκαταλύτες. Χρησιμοποιούνται όταν ο υπεύθυνος παράγων της

βιοκατάλυσης δεν είναι απομονωμένο ένζυμο, αλλά λειτουργικό κομμάτι του μικροοργανισμού. Μερικοί μικροοργανισμοί στον μεταβολικό κύκλο τους καταλύουν μια σειρά αντιδράσεων.

Μέτρηση μικροοργανισμών

Στην περίπτωση των ενζύμων η ποσότητά τους υπολογίζεται από την δραστηρότητά τους. Στους μικροοργανισμούς μετριέται η βιομάζα δηλαδή το άθροισμά τους σε ένα μέσον. Η βιομάζα μπορεί να μετρηθεί με πολλούς τρόπους.

1. Με μικροσκόπιο: σε ειδικές κυψελίδες όπου μετριέται ο αριθμός τους σε ορισμένο όγκο και υπολογίζεται το σύνολο.
2. Με ειδικά φίλτρα: οι μικροοργανισμοί αφήνονται να διηθηθούν μέσω ειδικών προζυγισμένων φίλτρων που μετά από επαναζύγιση υπολογίζεται το συνολικό βάρος τους.
3. Νεφελομετρικά: Αυτό προϋποθέτει ότι όλα τα άλλα συστατικά του υποστρώματος είναι απολύτως διαλυτά και το συνολικό διάλυμα διαυγέστατο.
4. Με την μέτρηση ολικών πρωτεϊνών: Οι μικροοργανισμοί καθαρίζονται με εκπλύσεις με νερό σε συσκευή φυγοκέντρου, προστίθεται HCl. και η μέτρηση γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Τι επηρεάζει την απόδοση των μικροοργανισμών

Η εφαρμογή της μικροβιακής τεχνολογίας στη βιομηχανική πράξη έδειξε ότι ο πιο σπουδαίος συντελεστής της παραγωγής είναι συνήθως ο βιολογικός. Για την επιτυχία όμως μίας βιολογικής βιομηχανίας χρειάζεται η προσαρμογή του βιολογικού παράγοντα στις συνθήκες παραγωγής. Αυτό περιλαμβάνει ένα σύνολο χειρισμών των μικροοργανισμών που αναφέρονται στη δημιουργία κατάλληλου περιβάλλοντος ανάπτυξης και δράσης τους. Είναι προφανές ότι δημιουργώντας τις καλύτερες συνθήκες κατά την βιοαντίδραση επιτυγχάνεται η καλύτερη απόδοση των μικροοργανισμών. Γενικά δε οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε υλικά (υποστρώματα) περιέχονται όλα

τα αναγκαία θρεπτικά στοιχεία κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η απλοποιημένη μορφή της χημικής εξίσωσης της μικροβιακής ανάπτυξης γράφεται όπως παρακάτω:

Πηγές C και ενέργειας + πηγές N + άλλα θρεπτικά στοιχεία + ειδικές θρεπτικές ουσίες + O₂ -----> Κύτταρα + προϊόν + νερό + CO₂ + θερμότητα

1. **Το υπόστρωμα:** Για να έχουμε καλή και σταθερή σε ποιότητα απόδοση, πρέπει να υπάρχει μια καλή και όσον το δυνατόν σταθερή σύσταση του υποστρώματος, που πρέπει να περιέχει τα απαραίτητα για τον μικροοργανισμό συστατικά: C, N, άλατα. Κάθε μικροοργανισμός έχει και τα φυσικά υποστρώματά του τα οποία χρησιμεύουν ως θρεπτικό υλικό. Είναι δυνατόν, αλλάζοντας ορισμένα υλικά στο υπόστρωμα να αλλάξει και η δράση του μικροοργανισμού.

2. **Θερμοκρασία:** όπως οι χημικές αντιδράσεις έτσι και η μικροβιακή ανάπτυξη επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Γενικά το μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται σε θερμοκρασιακό εύρος από 25 έως 30° C. Υπάρχουν όμως μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 0° C και υψηλότερες από 93° C. Από άποψη θερμοκρασιακών απαιτήσεων οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε **ψυχρόφιλους, μεσόφιλους και θερμόφιλους**. Η θερμοκρασία γενικότερα μπορεί να επηρεάσει τόσο την αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών όσο και σε δεύτερο στάδιο την αύξηση παραγωγής του τελικού επιθυμητού προϊόντος.

3. **Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου:** Σε pH 5-7 συμβαίνουν σχεδόν όλες οι ζυμώσεις των μικροοργανισμών. Πέρα από αυτά τα όρια η απόδοση πέφτει κατακόρυφα, είτε γιατί καταστρέφεται το προϊόν, είτε γιατί σ' αυτά τα pH σταματά η δράση των μικροοργανισμών. Ειδικότερα η άριστη ανάπτυξη των βακτηρίων γίνεται σε pH 6.5-7.5. Κάτω από 5 και πάνω από 8.5 δεν αναπτύσσονται, εκτός από τα βακτήρια της οξεικής ζύμωσης (*Acetobacter suboxydans*) και της οξείδωσης του θείου που αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλό pH. Οι ζύμες και οι μύκητες εν γένει αναπτύσσονται σε pH 2.5-8.5 με άριστη τιμή 4-6. Η ικανότητα των ζυμών να πολλαπλασιάζονται σε χαμηλά pH τις

κάνει πλεονεκτικότερες αναφορικά με την πιθανότητα να μολυνθούν από βακτήρια που δεν αναπτύσσονται σε όξινο περιβάλλον. Για τους λόγους αυτούς ο έλεγχος του pH κατά την διάρκεια των βιοτεχνολογικών διεργασιών είναι πρωταρχικής σημασίας.

4. Συγκέντρωση άλλων ιόντων: Επειδή η παρουσία άλλων αλάτων από τα φυσικά του υποστρώματος επηρεάζει τις λειτουργικές δραστηριότητες μεταβολισμού των μικροοργανισμών, μπορεί να ελαττωθεί ή να διακοπεί η βιομετατροπή και γι' αυτό πάντοτε πρέπει να ελέγχεται η παρουσία και η περιεκτικότητά τους.

5. Οργανικές ενώσεις: Αυτές, είτε βρίσκονται τυχαία στον αντιδραστήρα, είτε προστίθενται εκ προθέσεως, ή αποτελούν το προϊόν της βιοαντίδρασης, μπορεί να βοηθήσουν για μια καλύτερη απόδοση ή αντίθετα, ν' αναστείλλουν την βιομετατροπή πχ. αιθανόλη+.

6. Η πίεση μέσα στον βιοαντιδραστήρα και ειδικότερα στα κλειστά συστήματα.

7. Η επιμόλυνση με άλλους μικροοργανισμούς: γι' αυτό θα πρέπει να γίνεται σωστή αποστείρωση.

8. Η συγκέντρωση του επιθυμητού προϊόντος: Επειδή η συγκέντρωση πάνω από 1 όριο μπορεί να έχει ανασταλτική επίδραση πρέπει να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα.

9. Η ανάδευση: ο τρόπος ανάδευσης πρέπει να έχει επιλεγεί ώστε να αποδίδει τα καλύτερα αποτελέσματα πχ. με πτερύγια, αερισμό, αιώρηση.

ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Αρκετά μαθηματικά μοντέλα έχουν προταθεί για την περιγραφή διαδικασιών παραγωγής μικροβιακών βιομηχανικών προϊόντων (αντιβιοτικών, ενζύμων, οργανικών οξέων, αλκοολών κ.ά). Το πλέον γνωστό και ευρύτερα εφαρμοζόμενο είναι το μοντέλο Luedeking-Piret

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

όπου α, β = σταθερές

P= συγκέντρωση προϊόντος

X = συγκέντρωση κυττάρων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Primrose S.B. *Modern Biotechnology*, Blackwell Scientific Publ.Oxford 1987
2. Χαρβάλα Α., Χήνου Ι., Βασικές αρχές στη βιοτεχνολογία-Βιολογικοί έλεγχοι. Φοιτητικές σημειώσεις Φαρμακευτικού Τμήματος. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 1997
3. Prave P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.A. *Basic Biotechnology-A Student's Guide* VCH 1989

ENZYMA

ΓΕΝΙΚΑ

Τα ένζυμα είναι ουσίες που παίζουν ρόλο βιοκαταλύτη, είναι πρωτεϊνικής φύσεως, όπου τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς ορισμένη διάταξη των αμινοξέων και ορισμένη διάταξη του συνόλου του μορίου στο χώρο. Επίσης έχουν ενεργό κέντρο, που είναι απόλυτα καθορισμένο σε θέση, όγκο και σχήμα όπου γίνεται η βιομετατροπή. Όποια αλλοίωση στο ενεργό κέντρο καταλήγει σε απενεργοποίηση του ενζύμου. Τα ένζυμα καταλύουν χημικές αντιδράσεις ελαττώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης τους με αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης. Η καταλυτική ενεργότητα των ενζύμων είναι δυνατόν να διατηρηθεί σε σημαντικό ποσοστό μετά την απελευθέρωση τους από το βιολογικό κύτταρο.

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Τα ένζυμα λαμβάνονται από διάφορες πηγές προέλευσης πχ. καρπούς: *Carica papaya* →παπαϊνη, χυμοπαπαϊνη, γαλακτώδεις οπούς: *Ficus spp* →φικίνη, βακτήρια: *Bacillus cereus*, *B. subtilis* →πενικιλινάση, βιολογικά υγρά: δάκρυα, βλεννογόνος ρινός → λυσοζύμη (= σφαιρίνη G), ούρα →ουροκινάση, γαστρικό υγρό →πεψίνη, ζωϊκά όργανα: όπως από το πάγκρεας η θρυψίνη και η παγκρεατίνη, από εγκεφάλους και πνεύμονες

ζώων η θρομβοκινάση. Εκτός από ορισμένα ζωϊκής και φυτικής προέλευσης η μέγιστη πλειοψηφία των ενζύμων παράγεται από μικροοργανισμούς.

Οι λόγοι είναι:

- Η παραγωγή είναι οικονομική λόγω γρήγορων ρυθμών ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό ελεγχόμενες συνθήκες (βιοαντιδραστήρες) και χρησιμοποίησης φθηνών θρεπτικών υποστρωμάτων.
- Με γενετικούς χειρισμούς οι αποδόσεις μπορούν να αυξηθούν από εκατοντάδες (βιο συνθετικά ένζυμα) μέχρι μερικές χιλιάδες φορές (καταβολικά ένζυμα).
- Στελέχη με επιθυμητές ιδιότητες μπορούν να επιλεγούν από μεγάλο πλήθος μικροοργανισμών με σχετική ευκολία.
- Ισοένζυμά του που καταλύουν την ίδια αντίδραση αλλά με διαφορετικές κινητικές ιδιότητες δίνουν λύση σε ειδικά προβλήματα εφαρμογής.
- Τα μικροβιακά ένζυμα χαρακτηρίζονται ως έσω και εξωκυτταρικά ανάλογα με το αν βρίσκονται μέσα ή έξω από το κύτταρο από όπου και απομονώνονται.

Πως ονομάζονται:

Συνήθως παίρνουν τα ονόματά τους είτε από : **1.**την προέλευσή τους πχ. πάγκρεας→παγκρεατίνη, *Papaya*→παπαϊνή. **2.**το υπόστρωμα πάνω στο οποίο δρουν πχ. φυσικό κολλαγόνο →κολλαγενάση

Δράση:

Ανάλογα με τον τύπο των χημικών αντιδράσεων που υποβοηθούν κατατάσσονται σε 6 ομάδες:

1. υδρολάσες : προκαλούν υδρολύσεις
- 2.οξειδάσες ή οξειδοαναγωγάσες: αντιδράσεις οξειδοαναγωγής
- 3.τρανσφεράσες :μεταφορά χημικής ομάδας πχ. CH_3
- 4.λυάσες: αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς
- 5.ισομεράσες: προκαλούν ισομερισμό

6.συνθετάσες ή λιγάσες :συμπύκνωση μορίων με δημιουργία δεσμών με χρήση ATP.

ΝΟΜΙΚΟ ΚΑΘΕΣΤΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYΜΩΝ

Η χρησιμοποίηση ενζύμων στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών ελέγχεται από εθνικούς και διεθνείς νόμους καταλληλότητας. Η εισαγωγή ενός νέου ενζύμου ή ενός ενζύμου που παράγεται από μη αποδεκτό (μη αβλαβή) οργανισμό προϋποθέτει μακροχρόνιες και δαπανηρές δοκιμές τοξικότητας, καρκινογένεσης κλπ. Μεταξύ των αβλαβών μικροοργανισμών παραγωγής ενζύμων της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών θεωρούνται οι παρακάτω:

Aspergillus oryzae, A. sojae, A. niger, A. awamori, A. foetidus, A. phoenicis, Bacillus subtilis, B. mesentericus, B. Amyloliquefaciens, Kluyveromyces lactis, Leuconostoc oemos, Mucor sp., Rhizopus arrhizus, Rh. Oligosporus, Rh. Oryzae, Sacharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ENZYΜΩΝ

Όλα τα μικροβιακά ένζυμα παράγονται με ζύμωση. Η διεργασία αυτή επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι:

Ο μικροοργανισμός

Το στέλεχος που θα επιλεγεί πρέπει:

1. Να έχει την καλύτερη δυνατή απόδοση στο μικρότερο δυνατό χρόνο.
2. Να μην παράγει τοξικές ουσίες, αντιβιοτικά ή άλλες ανεπιθύμητες ουσίες (π.χ. χρωστικές).
3. Να χρησιμοποιεί φθηνές οργανικές και ανόργανες πηγές θρεπτικών στοιχείων

Θρεπτικά μέσα

Τα θρεπτικά μέσα μπορούν να παραχθούν από συνθετικές και φυσικές ουσίες.

Οι φυσικές ουσίες είναι φθηνότερες

Τα θρεπτικά μέσα πρέπει να περιέχουν

1. Πηγές άνθρακα και ενέργειας

2. Πηγές αζώτου (όπως καζεΐνη, ζελατίνη)
3. Απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία και
4. Παράγοντες ανάπτυξης (π.χ. φυτικά έλαια)
5. Ουσίες επαγωγείς ενζύμων εφόσον υπάρχουν τέτοιες, ανάλογα με το είδος του ενζύμου (π.χ. άμυλο για την αμυλάση, ουρία για την ουρεάση κλπ.). Επίσης Συνένζυμα είναι δυνατόν να ενεργούν ως επαγωγείας (π.χ. η θειαμίνη αυξάνει την παραγωγή πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης).

Ζυμώσεις

Δύο βασικές μέθοδοι ζυμώσεων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μικροβιακών ενζύμων. Οι παρακάτω:

1. Επιφανειακή ζύμωση. Σε αυτήν ο μικροοργανισμός (μύκητας) αναπτύσσεται στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά στοιχεία και μεγάλη επιφάνεια (π.χ. πίτυρα).
2. Βυθισμένη ζύμωση. Είναι η περισσότερο διαδεδομένη μέθοδος. Όπου ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υγρή καλλιέργεια (βυθισμένη) σε βιοαντιδραστήρες (χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας ζύμωσης με βυθισμένη καλλιέργεια είναι εκείνη των αμυλασών από το βακτήριο *B. subtilis*).

Δραστικότητα- απόδοση ενζύμων

Η δραστικότητα ενός ενζύμου εξαρτάται από το ενεργό κέντρο του. Ενώ η απόδοση ενός ενζύμου μετράται με την « μονάδα ενζυματικής δραστικότητας».

Μονάδα ενζυματικής δραστικότητας είναι η δραστικότητα «U” του ενζύμου που προκαλεί την κατάλυση ενός μικρο-γραμμομορίου υποστρώματος ανά λεπτό της ώρας υπό καθορισμένες συνθήκες. Μονάδα μέτρησης της είναι το katal (= kat), που αντιστοιχεί στην ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την βιομετατροπή (που καταλύει δηλαδή) ή 1mole υποστρώματος σε 1 sec.

Παράγοντες δραστηριότητας ενζύμων

Οι παράμετροι, που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν και να ρυθμίζονται για την καλύτερη δραστηριότητα των ενζύμων είναι οι παρακάτω:

1. **Η θερμοκρασία:** όπως στις χημικές έτσι και στις ενζυμικές δράσεις η ταχύτητά τους (U) αυξάνει με την θερμοκρασία σύμφωνα με τη σχέση του Arrhenius. Ενώ στην αρχή η αύξησή της επιταχύνει την κατάλυση, υπερβολική αύξηση πάνω από ένα θερμοκρασιακό όριο οδηγεί σε φαινόμενο αναστολής της ενζυμικής δράσης και καθιστά το ένζυμο ανενεργό.
2. **Το pH:** Η δραστηριότητα των ενζύμων επηρεάζεται από το pH. Για κάθε ένζυμο υπάρχει ιά περιοχή του pH όπου ανάλογα με το ένζυμο, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ, παρουσιάζεται η μέγιστη δραστηριότητα. Διακρίνουμε κυρίως δύο επιδράσεις του pH . Την αντιστρεπτή και την μη αντιστρεπτή. Αντιστρεπτή συμπεριφορά παρατηρείται μόνο σε στενές περιοχές pH , ενώ σε τιμές του pH απομακρυσμένες από την άριστη τιμή, το μόριο του ενζύμου υφίσταται μη αντιστρεπτές μεταμορφώσεις και η καταλυτική του δράση δεν επανέρχεται.
3. **Η παρουσία άλλων ουσιών ή ιόντων:** Η δράση των ενζύμων παρεμποδίζεται στερεοχημικά από την παρουσία ορισμένων ουσιών ή ιόντων. Αυτή μπορεί να είναι θετική δηλαδή να βοηθάει, να επιταχύνει την κατάλυση όπως π.χ. ιόντα Cl , φυσικά μέχρι μία ορισμένη συγκέντρωση, αλλά αντίθετα μπορεί είναι και αρνητική όπως πχ. η παρουσία βαρέων μετάλλων επειδή σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα τα οποία προκαλούν ανενεργοποίηση των ενζύμων.

ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Μετά την παραγωγή τους τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε **ακατέργαστη, καθαρή και ακινητοποιημένη μορφή.**

Η τελευταία είναι το προϊόν της διαδικασίας ακινητοποίησης κατά την οποία η κίνηση των μορίων ενός ενζύμου στο χώρο παρεμποδίζεται σε μέγιστο ή απόλυτο βαθμό με αποτέλεσμα μιάς αδιάλυτης φάσης στο νερό της **ενζυμικής**.

Ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα υπάρχουν στη φύση που καθόρισαν και την δημιουργία αυτού του μοντέλου. Τέτοια ενζυμικά συστήματα δημιουργούνται στο έδαφος από τα ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την αποσύνθεση των φυτικών και ζωικών μικροβιακών κυττάρων και προσρροφώνται στο χώμα όπου και δρουν σαν ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα. Η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων έναντι των ελεύθερων ενζύμων παρουσιάζει πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα.

Πλεονεκτήματα: α.συνεχής χρήση τους στον αντιδραστήρα, χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα ενζύμου β.Δίδονται προϊόντα απαλλαγμένα ενζύμου γ.Εύκολα και γρήγορα μπορεί να διακοπεί η ενζυμική αντίδραση δ.Χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την μελέτη παρόμοιων ενζυμικών αντιδράσεων βιολογικών συστημάτων που υπάρχουν σε κυτταρικά οργανίδια

Μειονεκτήματα: α.υπάρχουν δυσκολίες στην παρασκευή ακινητοποιημένων ενζύμων. β.μπορεί η σύνδεση με το στερεό πολυμερές να μην είναι αρκετά ισχυρή και γ.αν η σύνδεση είναι πολύ ισχυρή πιθανόν να μην είναι εύκολη η επαφή του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων.

1.Αδιάλυτα ένζυμα

Η ακινητοποίηση με τις παρακάτω τεχνικές έχει σαν αποτέλεσμα την καθήλωση του ενζύμου στο φορέα με αδιάλυτη μορφή και τον περιορισμό της δράσης του στο μικροπεριβάλλον του φορέα. Αυτή η διαδικασία έχει επίδραση στην ενεργότητα και τις κινητικές ιδιότητες του ενζύμου με

αποτέλεσμα η δράση του να διαφέρει από εκείνη του ελεύθερου (διαλυτού) ενζύμου.

Εκλωβισμός

Ο εγκλωβισμός βασίζεται στον εντοπισμό του ενζύμου σε πολυμερές ή μεμβράνη κατά τέτοιο τρόπο ώστε να εμποδίζεται η απελευθέρωση του και να είναι ελεύθερη η κίνησή του υποστρώματος και των προϊόντων της κατάλυσης. Στη μέθοδο αυτή υπάγονται οι τεχνικές

Α) Εγκλωβισμός σε πολυμερές (πηκτή)

Β) Εγκλωβισμός σε ίνες (π.χ. σε οξική κυτταρίνη)

Γ) Εγκλωβισμός σε μικροκάψουλες (π.χ. νιτροκυτταρίνης, πολυστυρένιου κ.ά)

Σύνδεση ενζύμου με φορέα

Δεν αποτελεί νέα μέθοδο μιάς και στη φύση χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση

Α) Φυσική προσρόφηση. Αποτελεί την απλούστερη μέθοδο και αφορά την φυσική προσρόφηση μορίων του ενζύμου στην επιφάνεια στερεών φορέων. Τέτοιοι φορείς είναι λεκιθίνες, ταννίνες κ.ά.

Β) Ιοντικός δεσμός. Στηρίζεται στη σύνδεση με ιοντικούς δεσμούς του ενζύμου με τον φορέα που περιέχει ιοντοανταλλακτικές ομάδες

Γ) Χηλικός δεσμός. Είναι ιά σχετικά νέα τεχνική που αφορά την χρήση ειδικών ουσιών για την ενεργοποίηση της επιφάνειας του φορέα και τη σύνδεσή του με το ένζυμο με χηλικούς δεσμούς, όπως η κυτταρίνη, το γυαλί κ.ά.

Δ) Ομοιοπολικός δεσμός. Η σύνδεση του ενζύμου με τον αδιάλυτο φορέα με ομοιοπολικό δεσμό είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ακινητοποίησης ενζύμων. Η ακινητοποίηση με την τεχνική αυτή γίνεται με ομοιοπολική σύνδεση ενεργών ομάδων του φορέα με ενεργές ομάδες του ενζύμου που δεν παίρνουν όμως μέρος στη κατάλυση.

Ε) Διασταύρωση ενζύμων. Η αρχή αυτής της τεχνικής στηρίζεται στην ένωση των μορίων των ενζύμων με ομοιοπολικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την

δημιουργία διασταυρωμένων συνόλων. Τα τελευταία είναι αδιάλυτα στο νερό και δεν χρειάζονται την ύπαρξη αδιάλυτου φορέα.

2. Διαλυτά ένζυμα

Η χρησιμοποίηση ενζύμων στη φυσική τους διαλυτή μορφή είναι δυνατή εφαρμόζοντας ορισμένες τεχνικές που περιγράφονται παρακάτω.

Ακίνητοποίηση χωρίς τροποποίηση του ενζύμου

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χρήση ενζύμων στη φυσική, διαλυτή τους μορφή πάνω σε ημιπερατές μεμβράνες, ίνες ή μεμβράνες υπερδιήθησης. Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις αδιάλυτων υποστρωμάτων ή υδατοδιαλυτών μεγαλομοριακών υποστρωμάτων.

Ακίνητοποίηση τροποποιημένων ενζύμων

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χρήση ενζύμων στη φυσική, διαλυτή τους μορφή με αντίδραση σύζευξης τους με ενεργοποιημένο πολυμερές ή συμπολιμερισμό μονομερών με ένζυμα, με στόχο τη δημιουργία ενός υδατοδιαλυτού συστήματος ενζύμου-πολυμερούς.

ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Ο βιοαντιδραστήρας είναι απαραίτητος σε όλες τις βιοτεχνολογικές διαδικασίες και αποτελεί σπουδαίο λειτουργικό και οικονομικό παράγοντα των διαδικασιών αυτών. Προσδιορίζεται σε επιστημονική και τεχνολογική βάση τις φυσικές και χημικές παραμέτρους του περιβάλλοντος της βιοκατάλυσης. Η βιοκατάλυση περιλαμβάνει την μετατροπή του υποστρώματος σε επιθυμητά προϊόντα με την βοήθεια των βιοκαταλυτών.

Ο βιοαντιδραστήρας βοηθά την προσπάθεια αυτή με την δημιουργία κατάλληλων συνθηκών (pH, , θερμοκρασία, αερισμό κ.ά) ανάπτυξης των κυττάρων και δράσης των ενζύμων.

Κριτήρια επιλογής του βιοαντιδραστήρα

1. Είδος βιοκαταλύτη (ένζυμα ή μικροοργανισμοί)

2. Ιδιότητες των καλλιεργουμένων κυττάρων (σχήμα, μέγεθος, γενετική σταθερότητα, αερόβιος ή αναερόβιος τρόπος ανάπτυξης, καλλιέργεια βάθους ή επιφάνειας).
3. Το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Οι φυσικές (αέριο, υγρό, στερεό), ρεολογικές και βιοκινητικές ιδιότητες του υποστρώματος. Οι ρεολογικές ιδιότητες αφορούν κυρίως το ιξώδες, γιατί υποστρώματα με υψηλό ιξώδες παρουσιάζουν προβλήματα ανάμιξης και μεταφοράς οξυγόνου. Ενώ οι βιοκινητικές ιδιότητες του υποστρώματος αναφέρονται στην ικανότητά του να επηρεάζει την κινητική της κυτταρικής ανάπτυξης και ενζυματικής δράσης.
4. Βιοχημικές παράμετροι. Αναφέρονται κυρίως στην επίδραση της θερμοκρασίας, pH και αοξυγόνου στη ανάπτυξη των βιοκαταλυτών και στο πώς αυτές επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του βιοαντιδραστήρα. Π.χ. σε σχέση με την θερμοκρασία των βιοκαταλυτών, ο τρόπος ελέγχου της θερμοκρασίας προσδιορίζει το είδος του βιοαντιδραστήρα.

Βασικά είδη βιοαντιδραστήρων

1. Βυθισμένης καλλιέργειας
2. Μηχανικά αναδεδόμενοι
3. Αναδεδόμενοι με κυκλοφορία υγρού (αντλίες)
4. Επιφανειακής καλλιέργειας
5. Δίσκων
6. Σταθεράς κλίνης
7. Λειπού στρώματος
8. Βυθισμένης επιφάνειας
9. Βιοαντιδραστήρες ακινητοποιημένων ενζύμων
10. Αντιδραστήρες διαλείποντος έργου
11. Αντιδραστήρες συνεχούς έργου. α) Αναδεδόμενοι αντιδραστήρες συνεχούς ροής και β) αντιδραστήρες εμβολικής ροής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Primrose S.B. *Modern Biotechnology*, Blackwell Scientific Publ.Oxford 1987
2. Χαρβάλα Α., Χήνου Ι., Βασικές αρχές στη βιοτεχνολογία-Βιολογικοί έλεγχοι. Φοιτητικές σημειώσεις Φαρμακευτικού Τμήματος. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 1997
3. Prave P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.A. *Basic Biotechnology-A Student's Guide* VCH 1989
4. Prave P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.A. *Fundamentals of biotechnology*. VCH 1987
5. Atkinson B., *Biochemical reactors*. Pion Ltd. London, 1974

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ολοένα αυξανόμενη σημασία των καλλιεργειών ζωικών και φυτικών κυττάρων υπό ελεγχόμενες συνθήκες, στη διαδικασία παραγωγής βιοτεχνολογικών προϊόντων διαπιστώνεται από την ευρύτητα εφαρμογής αυτών των καλλιεργειών.

Στα περιεχόμενα του κεφαλαίου αυτού περιλαμβάνονται βασικές γνώσεις χειρισμού καλλιεργειών φυτικών και ζωικών κυττάρων. Επειδή οι καλλιέργειες φυτικών κυττάρων διαφέρουν σημαντικά από εκείνες των ζωικών, αυτά τα δύο συστήματα εξετάζονται χωριστά.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Η δραστηριότητα αυτή έχει σαν στόχους την παραγωγή ουσιών φυτικής προέλευσης υψηλής προστιθέμενης αξίας υπό ελεγχόμενες συνθήκες.
2. Την βελτίωση συνολικά των φυτικών καλλιεργειών.
3. Βιογεωργικές δραστηριότητες (biofarming)
4. Βιολογικό έλεγχο φυτικών εχθρών και ασθενειών (βιολογική γεωργία)
5. Βιοαποκατάσταση του περιβάλλοντος
6. Βιοκαλλυντικά
7. Βιοπροσθετικά τροφίμων(nutrochemicals) άλλα φυτικά προϊόντα (χρωστικές και φαρμακευτικές ουσίες κλπ.)

Η βιοτεχνολογία Φυτών μπορεί να διακριθεί σε:

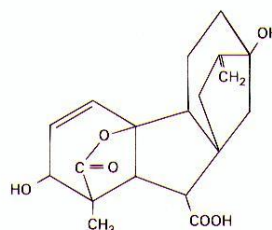
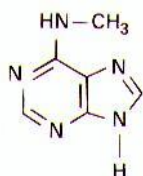
- **Μη μοριακή βιοτεχνολογία φυτών**, όπου περιλαμβάνονται όλες οι εφαρμογές της καλλιέργειας *in vitro* φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων.
- **Μοριακή Βιοτεχνολογία φυτών** ή Γενετική Μηχανική

Μη μοριακές βιοτεχνολογικές μέθοδοι

Καλλιέργειες φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων *in vitro*

Τα φυτά μπορούν να παραχθούν, όπως και πολλαπλασιάζονται, με εγγενή πολλαπλασιασμό, με την σύντηξη δηλαδή αρσενικού και θηλυκού γαμέτη και τη δημιουργία ζυγωτού, όπως δηλαδή συμβαίνει και με τους ζωικούς οργανισμούς. Τα φυτά όμως μπορούν να αναπαραχθούν και με αγενή πολλαπλασιασμό. Χρησιμοποιώντας δηλαδή κύτταρα ή τμήματα φυτικών οργάνων που ονομάζονται έκφυτα, και κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας αναπτύσσονται σε πλήρες φυτό.

Ιστορικά το 1839 ο Schwan διατύπωσε την άποψη ότι κάθε κύτταρο πολυκύτταρου οργανισμού πρέπει να μπορεί να δρα ανεξάρτητα και να αναπτύσσεται, να του δοθούν οι κατάλληλες συνθήκες, σε πλήρη οργανισμό. Βασισμένη σε αυτήν τη παραδοχή το 1876 έγινε η πρώτη υδροπονική καλλιέργεια. Ο Reclinger το 1893 περιέγραψε την δημιουργία κάλλου, δηλαδή ανοργάνωτης και αδιαφοροποίητης μάζας κυττάρων από τμήματα βλαστού και ρίζας. Ακολούθησε η θεωρία του Morgan το 1901 για το ολοδόναμο κύτταρο, το κύτταρο δηλαδή από το οποίο μπορεί να αναγεννηθεί ολόκληρος οργανισμός. Πρώτος Gottlieb Haberlandt το 1902 προσπάθησε να καλλιεργήσει κύτταρα μεσόφυλλου χωρίς επιτυχία. Αν και παρατήρησε αύξηση του όγκου, αλλαγή στο σχήμα και πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τα κύτταρα έζησαν επί 1 μήνα, όμως δεν έγινε διαίρεση. Αυτό οφειλόταν εν μέρει στο ότι τα κύτταρα που χρησιμοποίησε ήταν πολύ διαφοροποιημένα και εν μέρει στην άγνοια τότε των αυξητικών ορμονών.



Βέβαια πίστευε ότι τα κύτταρα δεν έχαναν την ικανότητά τους για διαίρεση αλλά απλώς δέχονταν κάποιο ερεθισμό από το σύνολο του οργανισμού ή ίσως κάποια συγκεκριμένα τμήματα του οργανισμού, σταματούσαν την διαίρεση και αυξάνονταν σε όγκο. Είχε ακόμα συλλάβει την έννοια των αυξητικών ορμονών που πίστευε ότι μπορεί να περιέχονται σε ορισμένα κύτταρα του οργανισμού πχ. άκρες του βλαστού ή υγρά του εμβρυϊκού ασκού. Οι πρώτες επιτυχείς καλλιέργειες φυτικών ιστών έγιναν στη δεκαετία του 1930 από τους White, Gautheret και Nobecourt. Το 1957 οι Skoog και Miller απέδειξαν, ότι διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξινών/κυτοκινών επηρέαζαν αντίστοιχα την ανάπτυξη εκφύτων καπνού. Το 1958 αναγεννήθηκε φυτό από κυτταροκαλλιέργειες καρότου και αργότερα το 1965 από κυτταροκαλλιέργειες καπνού.



Η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων (plant cell, tissue and organ culture) είναι η *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων, ιστών ή οργάνων σε κατάλληλο περιβάλλον (θρεπτικό υπόστρωμα, συνθήκες υγρασίας και φωτισμού και άσηπτες συνθήκες), με στόχο την αναγέννηση νέων φυτών.

Αυτές οι μέθοδοι βασίστηκαν στη μοναδική ιδιότητα των φυτικών κυττάρων, στο **ολοδυναμικό** (totipotent cell), που δίνει την δυνατότητα στα μη διαφοροποιημένα σωματικά φυτικά κύτταρα να αποδιαφοροποιούνται, να

επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και να αναπτύσσουν εκ νέου μιτωτική δραστηριότητα, κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας όπως προαναφέρθηκε. Η μάζα των αδιαφοροποίητων κυττάρων, που ονομάζεται **κάλλος**, είναι πιθανόν να εκφρασθεί διαφορετικό πρόγραμμα μορφογένεσης, ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση εξωγενών ρυθμιστικών ουσιών και παραγόντων. Η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων και ιστών είναι η βάση για την εφαρμογή των μοριακών βιοτεχνολογικών μεθόδων, αφού κάθε τροποποιημένος πρωτοπλάστης (=κύτταρο χωρίς την εξωτερική μεμβράνη), κύτταρο ή έκφυτο μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία ολόκληρου φυτού.

Παράγοντες που συντελούν στην επιτυχή *in vitro* καλλιέργεια φυτικών κυττάρων ιστών και οργάνων

Οι παράγοντες που συντελούν στην επιτυχή *in vitro* καλλιέργεια φυτικών κυττάρων ιστών και οργάνων χωρίζονται σε **ενδογενείς** και **εξωγενείς**.



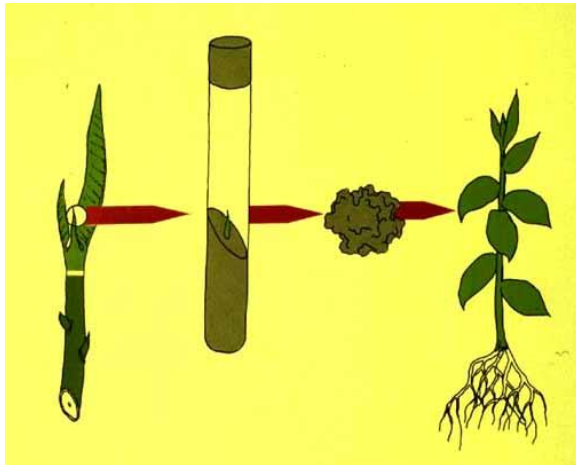
Ενδογενείς παράγοντες είναι οι παρακάτω:

1. Φυτικό είδος . Υπάρχουν φυτικά γένη που εύκολα θα λέγαμε αναγεννώνται και άλλα που δείχνουν μικρή ή μεγάλη αδυναμία αναγέννησης (όπως αγρωστώδη, λαχανικά και πολυετή ξυλώδη φυτά). Τα φυτά αυτά ονομάζονται δύστροπα.

2. Είδος έκφυτου. Λογικά κάθε τμήμα του φυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως **έκφυτο** για *in vitro* καλλιέργεια. Όμως στη πραγματικότητα αυτό δεν συμβαίνει.

Έτσι μπορούν να γίνουν καλλιέργειες στα παρακάτω μέρη:

- Μεριστωματικά κύτταρα
- Τμήματα βλαστού (συνήθως μέρη με έναν κόμβο (οφθαλμό))
- Τμήματα φύλλου, μίσχου ή ελάσματος
- Τμήματα ρίζας
- Τμήματα ανθικών οργάνων ή ολόκληρα ανθικά μέρη (γυρεόκοκκοι, ύπεροι, πέταλα, σέπαλα, υποκοτύλια, κοτυληδόνες κλπ.



Εξωγενείς παράγοντες είναι οι παρακάτω:

1. Ασηπτικό περιβάλλον. Για την επιτυχή έκβαση των παραπάνω καλλιεργειών σημαντικός παράγοντας είναι η εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών, τόσο κατά την έναρξη των καλλιεργειών όσο και καθόλη την διάρκειά τους. Η επιφανειακή απολύμανση γίνεται με διαλύματα όπως υποχλωριώδους νατρίου, με προσοχή ώστε να αποφευχθούν νεκρώσεις στους ιστούς, με προσοχή στην τελική πλήρη απομάκρυνση καταλοίπων του απολυμαντικού. Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος γίνεται σε ειδικού κλιβάνους αποστείρωσης. Ενώ, η μεταφορά των απολυμασμένων εκφύτων στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται με προσοχή με χρήση αποστειρωμένων εργαλείων.

2. Θρεπτικό υπόστρωμα. Το θρεπτικό υπόστρωμα είναι τόσο σημαντικό όσο και η ποιότητα του φυτικού έκφυτου. Το θρεπτικό υπόστρωμα με την πλέον διαδεδομένη χρήση είναι εκείνο που προτάθηκε το 1962 από τους Murashige και Skoog. Τα συστατικά ενός θρεπτικού διαλύματος περιλαμβάνουν

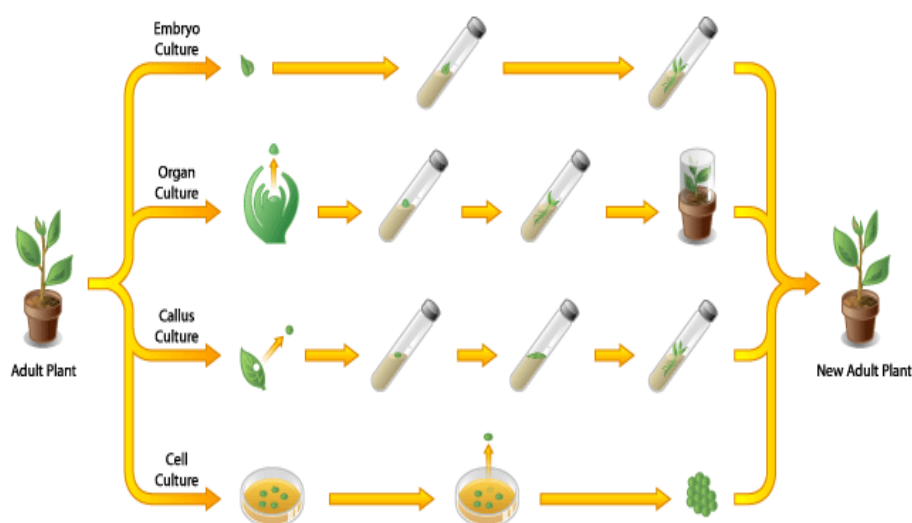
Ανόργανα στοιχεία, Βιταμίνες, Αμινοξέα, Οργανικά οξέα, πηγή άνθρακα (σακχαρόζη ή γλυκόζη), άλλα συστατικά (όπως γάλα καρύδας, χυμό πορτοκαλιού, ενδοσπέρμιο αραβοσίτου κλπ.), φυτορμόνες (αυξίνες, κυτοκινίνες, γιββελλίνες κλπ.)

3.Συνθήκες καλλιέργειας. Βασικότερη είναι η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών και οι παρακάτω περιβαλλοντικές συνθήκες:

Θερμοκρασίες 24-28° C, υψηλή σχετική υγρασία, κατάλληλη ποιότητα και ένταση φωτισμού, κατάλληλο μήκος φωτοπεριόδου (συνήθως 16/8 ώρες φως/σκοτάδι αντίστοιχα) και τιμές pH 5.5-5.8.

Η δυνατότητα των φυτών να δημιουργούν νέο φυτό από ένα τμήμα τους που εφαρμόζεται πλέον διεθνώς σε παρά πολλά φυτικά είδη που πολλαπλασιάζονται αγενώς έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως

- Ταχύτητα. Από ένα αρχικό φυτό μπορεί να παραχθούν εκατομμύρια νέα σε μικρό χρονικό διάστημα
- Έλεγχος της κατάστασης υγείας των νέων φυτών
- Πλήρης έλεγχος της γενετικής ταυτότητας των νέων φυτών
- Διάσωση του γενετικού τους υλικού
- Δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού *in vitro*
- Εν ψυχρώ συντήρηση (Κρυοσυντήρηση)



ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα υπό κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος και ασηπτικές συνθήκες ακολουθεί περίπου τους ίδιους κανόνες που εφαρμόζονται στη μικροβιολογία και είναι σε στενή σχέση με εκείνους που θα αναλυθούν στη συνέχεια και αφορούν τις καλλιέργειες ζωικών κυττάρων. Αυτό που αλλάζει είναι το είδος των αρχικών κυττάρων, το υπόστρωμα που πρέπει να είναι ανάλογο και ο τελικός στόχος.

Η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων χρησιμοποιείται για:

1. Αναγέννηση νέων φυτών από αρχικό κύτταρο
2. Δημιουργία σωματικών εμβρύων
3. Μαζική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους είναι υψηλή σημασίας φαρμακευτικές ουσίες, ή χρωστικές, αντιοξειδωτικές ουσίες ή αρωματικές υψηλής προστιθέμενης αξίας.
4. Απομόνωση πρωτοπλαστών
5. Κρυοσυντήρηση
6. Δημιουργία απλοειδών κυτταρικών σειρών
7. Χρήση κυττάρων ως ερευνητικών μοντέλων.



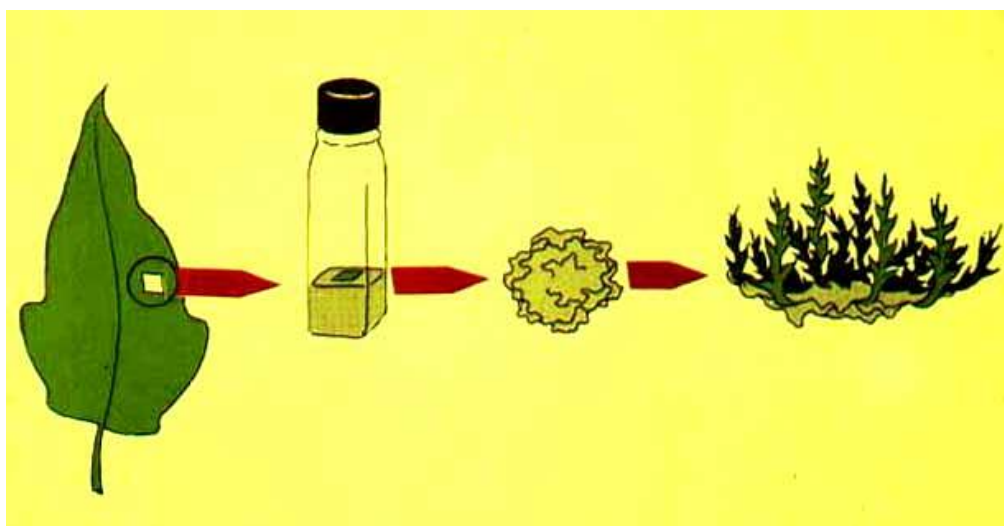
Αναγέννηση νέου φυτού *Linum usitatissimum* από αρχικό κύτταρο

Τα κύτταρα για την καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά λαμβάνουν από:

1. Από φυτικά όργανα με 2 τρόπους. α. Μηχανικά Συνήθως χρησιμοποιείται ιστός φύλλων με ελαφρό ξύσιμο. Μπορεί ακόμα να γίνει

κονιοποίηση των φύλλων καθαρισμός με διήθηση, ακολουθεί φυγοκέντριση και έτσι λαμβάνονται απλά κύτταρα συνήθως του μεσόφυλλου. **β. Με ένζυμα.** Το ένζυμο μακεροζύμη χαλαρώνει τα κυτταρικά τοιχώματα.

2. Από ιστοκαλλιέργειες_Είναι ο πλέον παραδοσιακός και διαδεδομένος τρόπος γιατί είναι και πιο εύκολος. Από τους κάλλους των ιστοκαλλιεργειών μετά από επανειλημμένες καλλιέργειες ώστε η σύνδεση των κυττάρων των κάλλων να γίνει πιο χαλαρή, λαμβάνεται ένα τμήμα και τοποθετείται σε υγρό μέσο και εφαρμόζεται ανάδευση, μ' αυτό τον τρόπο διασπώνται τα συσσωματώματα των κάλλων και διαμοιράζονται τα κύτταρα ομοιόμορφα σε όλο το υγρό περιβάλλον. Έτσι προκύπτουν οι **εναιωρηματικές καλλιέργειες** (suspension cultures).



Η εναιωρηματικές καλλιέργειες μπορεί να είναι **μαζικές** ή **συνεχείς**.

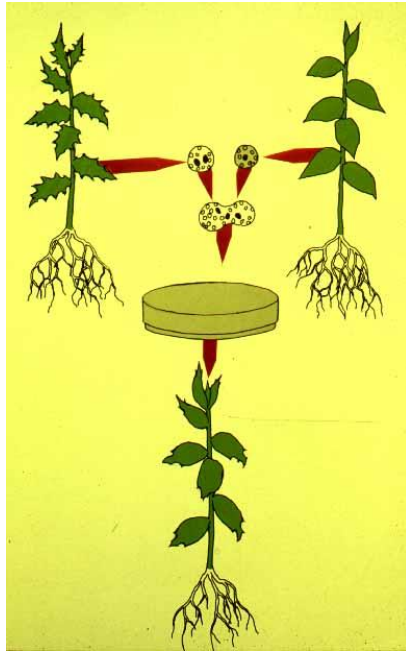
Στις **μαζικές καλλιέργειες (batch cultures)**, τα κύτταρα διαιρούνται και αυξάνονται σε μέγεθος έως ότου κάποιο συστατικό του θρεπτικού υποστρώματος μειωθεί και περιορίσει την περαιτέρω αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Επίσης η αναστολή αυτή μπορεί να βασίζεται στη συσσώρευση κάποιου τοξικού παράγοντα. Γι' αυτό, η καλλιέργεια ανανεώνεται συνεχώς, με μεταφορά μικρού όγκου του θρεπτικού υποστρώματος και των κυττάρων σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Δεν υπάρχει λοιπόν ανάπτυξη σταθερής κατάστασης κατά την οποία οι σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών των κυττάρων και των ενζύμων να είναι σταθερές.

Στις **συνεχείς καλλιέργειες**, (**continuous cultures**) υπάρχει συνεχής ανανέωση θρεπτικού μέσου και κυττάρων.

Οι συνεχείς καλλιέργειες μπορεί να είναι: **I. κλειστού τύπου**, όπου η προσθήκη νέου υλικού αντισταθμίζεται από την απομάκρυνση του παλαιού. Τα κύτταρα από το αποκρινόμενο υλικό παραλαμβάνονται μηχανικά και επανατοποθετούνται στην καλλιέργεια. Έτσι η βιομάζα συνεχίζει να μεγαλώνει ενώ συνεχίζεται η αύξηση. **II. ανοικτού τύπου**. Αντίθετα με τον προηγούμενο η προσθήκη υλικού αντισταθμίζεται με απομάκρυνση ίσου όγκου καλλιέργειας (υλικού και κυττάρων). Έτσι οι καλλιέργειες διατηρούνται επ' αόριστον σε ένα σταθερό ρυθμό ανάπτυξης. Συνήθως για τις ανοικτού τύπου συνεχείς καλλιέργειες υπάρχει περαιτέρω διάκριση σε **μειοστατικές** (chemostatic) όπου η συγκέντρωση ενός επιλεγμένου θρεπτικού παράγοντα (N,P, γλυκόση) του υποστρώματος, ρυθμίζεται έτσι ώστε να υπάρχει περιοριστικό όριο στην ανάπτυξη και σε **θολοστατικές** (turbostat). Σε αυτές η προσθήκη νέου υλικού γίνεται κατά διαστήματα και ελέγχεται ανάλογα με την θολερότητα της καλλιέργειας. Έτσι καθορίζεται μία προ-επιλεγμένη πυκνότητα βιομάζας.

ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΝΕΣΗ

Εμβρυογένεση είναι η δημιουργία εμβρύου. Αυτό γίνεται μέσω εγγενούς πολλαπλασιασμού, δηλαδή με την συνένωση αρσενικού και θηλυκού γαμέτη, οπότε και δημιουργείται το ζυγωτό έμβρυο. Στα φυτά η δημιουργία εμβρύων μπορεί να γίνει και αγενώς, δηλαδή με τη διαφοροποίηση μεμονωμένων σωματικών κυττάρων σε έμβρυα. Αυτά τα έμβρυα λέγονται σωματικά έμβρυα και η διαδικασία που τα διέπει σωματική εμβρυογένεση. Στη περίπτωση του ζυγωτού εμβρύου, αυτό περιέχει $2n$ χρωμοσώματα, με $n+n$ από κάθε γονέα, ενώ το σωματικό έμβρυο περιέχει $2n$ χρωμοσώματα, που προέρχονται από έναν γονέα.



Η σωματική εμβρυογένεση μπορεί να είναι **άμεση** (direct) ή **έμμεση** (indirect). Στη πρώτη περίπτωση, η δημιουργία σωματικών εμβρύων γίνεται απευθείας από τα κύτταρα του έκφυτου ή από εναιωρηματικές καλλιέργειες κυττάρων. Στη δεύτερη προηγείται η δημιουργία κάλλου.

Η σωματική εμβρυογένεση χρησιμοποιείται για πολλαπλασιασμό σε πολλά ετήσια φυτά, όπως στη τομάτα κ.ά. Τα σωματικά έμβρυα που αναπτύσσονται περιβάλλονται από αδρανές πολυμερές και έτσι δημιουργούνται τα τεχνητά σπέρματα. Επίσης τα σωματικά έμβρυα χρησιμοποιούνται για γενετικές τροποποιήσεις με μεταφορά γονιδίων (π.χ. με το *Agrobacterium*).

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΗΡΩΝ ΚΑΙ ΓΥΡΕΟΚΟΚΚΩΝ

Η παραγωγή απλοειδών φυτών (με n αριθμό χρωμοσωμάτων) στη φύση, συμβαίνει σε πολύ μικρή συχνότητα (0.001-0.01%). Η καλλιέργεια *in vitro* ανθέρων και μεμονωμένων γυρεοκόκκων ή ωαρίων μπορεί να θεωρηθεί ως η κυριότερη μέθοδος που εφαρμόζεται για τη δημιουργία απλοειδών φυτών.

Σκοπός αυτών των καλλιεργειών είναι η δημιουργία απλοειδών φυτών μέσω της εμβρυογένεσης από επανειλημμένες διαιρέσεις απλοειδών σπορίων, είτε μικροσποπίων είτε άωρων γυρεοκόκκων. Για την δημιουργία εμβρυοειδών ο σημαντικότερος παράγων επιτυχίας είναι το ιδιαίτερο στάδιο εξέλιξης των

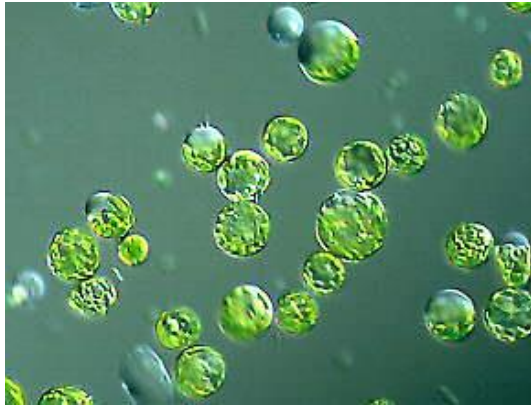
ανθήρων. Οι καλλιέργειες μικροσπορίων είναι σημαντικές επίσης στη μελέτη μεταλλάξεων.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΖΥΓΩΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η *in vitro* καλλιέργεια εμβρύων βρίσκεται ανάμεσα στα πρώτες εφαρμογές της καλλιέργειας φυτικών ιστών που ξεκίνησε πριν 50 χρόνια και εφαρμόζεται συνήθως για την ανάπτυξη σπάνιων υβριδίων. Εφαρμόστηκε για παράδειγμα στο φυτό *Melilotus officinalis* (που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε δικουμαρόλη που είναι πολύ τοξική στα βοοειδή) που διασταυρώθηκε με το *Melilotus alba* (που περιέχει χαμηλά ποσοστά κουμαρίνης). Η ίδια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε υβρίδια ρυζιού ή τομάτας (υβρίδιο ανάμεσα στο *Lycopersicum esculentum* και την άγρια ντοματιά *Lycopersicum peruvianum*). Έτσι η μέθοδος αυτή μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη φυτών από αυτά τα νέα πολύ χρήσιμα υβρίδια.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Πρωτοπλάστες (protoplasts) είναι τα φυτικά κύτταρα χωρίς τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Οι πρωτοπλάστες αποτελούν εξαιρετικό υλικό για βασική έρευνα αλλά και για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η ιστορία τους είναι μεγάλη. Ο Kruse το 1909 επιχείρησε χωρίς επιτυχία να συντήξει πρωτοπλάστες, που τους είχε αφαιρέσει με μηχανικό τρόπο τα τοιχώματα. Ακολούθησαν πολλές προσπάθειες απομόνωσης πρωτοπλάστων από τον Cocking, το 1960, που χρησιμοποίησε ένζυμα για την απομάκρυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Το 1970 ο Power πέτυχε την σύντηξη πρωτοπλάστων χωρίς παράλληλη αναγέννηση του φυτού. Αυτό το πέτυχε το 1971 ο Takebe με τους συνεργάτες του με πρωτοπλάστες καπνού. Σύντηξεις πρωτοπλάστων ακολούθησαν ανάμεσα σε γένη *Petunia* το 1976.



Οι καλλιέργειες πρωτοπλαστών είναι χρήσιμες για τους παρακάτω λόγους:

1. Μπορεί να γίνει σύντηξη δύο ή περισσότερων πρωτοπλαστών για την δημιουργία σωματικών υβριδίων φυτού.
2. Με την αφαίρεση της μεμβράνης μπορεί να «χωνευθεί» ξένη ύλη στο κυτταρόπλασμα, έτσι γίνονται πειράματα για την εισαγωγή πυρήνων, χλωροπλαστών, DNA, πλασμιδίων, μικροβίων, ιών κλπ.
3. Οι καλλιεργημένοι πρωτοπλάστες πολύ γρήγορα δημιουργούν νέο κυτταρικό-τοιχώμα κι έτσι μελετάται η διαδικασία βιοσύνθεσης και εναπόθεσης του τοιχώματος.
4. πληθυσμοί πρωτοπλαστών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή σειρών κυττάρων-μετάλλαξης καθώς και την δημιουργία κλώνων κυτταρικών πληθυσμών.
5. Για τη δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων φυτών
6. Για τη γρήγορη αξιολόγηση μιάς γενετικής τροποποίησης

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΡΙΧΩΤΩΝ ΡΙΖΩΝ

Μερικές φορές στις καλλιέργειες προκαλείται μεταμόρφωση φυτικών κυττάρων από βακτήρια. πχ. *Agrobacterium rhizogenes*, που οφείλεται στην εισαγωγή βακτηριακών πλασμιδίων στο DNA των κυττάρων. Το βακτήριο *Agrobacterium rhizogenes* άλλωστε ανήκει στους φορείς μεσολάβησης γονιδίων (vectors).



Όταν τα φυτικά αυτά κύτταρα καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υλικά που δεν περιέχουν ορμόνες, κάλλοι ριζών που έχουν υποστεί αυτή την μεταμόρφωση λαμβάνονται πλούσιες καλλιέργειες τριχωτών ριζών. Από αυτές μπορεί να αφαιρεθεί το βακτήριο, και συνεχίζεται η ανάπτυξή τους. Το πλεονέκτημα τους είναι η γρηγορότερη ανάπτυξή τους και επομένως αύξηση όγκου του υλικού με αποτέλεσμα και την αύξηση του ποσού των δευτερογενών μεταβολιτών που μπορεί να φτάσει μέχρι 60%.

ΕΝ ΨΥΧΡΩ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Εν ψυχρώ συντήρηση είναι η διατήρηση βιολογικών υλικών σε συνθήκες υπερκατάψυξης (θερμοκρασία υγρού αζώτου -196°C). Αυτή η μέθοδος συντελεί διάσωση πολύτιμων βιολογικών υλικών, όπως εμβρύων και συνέβαλλε στη δημιουργία τράπεζας γενετικού υλικού σπερμάτων. Η κρυοσυντήρηση θεωρείται επιτυχής, όταν το βιολογικό υλικό, μετά την απόψυξή του, έχει διατηρήσει τα χαρακτηριστικά του, και κυρίως την ικανότητα ανάπτυξής του. Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι φάσεις της ψύξης και της απόψυξης, όπου δεν πρέπει να δημιουργηθούν ενδοκυτταρικοί κρύσταλλοι. Για τον λόγο αυτό εφαρμόζεται κρυοπροστασία (cryoprotection), χορηγώντας ειδικές ουσίες όπως διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO), γλυκερόλη,

προλίνη, αιθανόλη κά π.χ. 5% DMSO + 5% γλυκόζη + 10% προλίνη, ή 10+ γλυκερόλη + 10% προλίνη, ή 10% προλίνη δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα. Οι κρυοπροστατευτικές (αντιψυκτικές) αυτές ουσίες μειώνουν το μέγεθος των ενδοκυττάρων παγοκρυστάλλων και την ταχύτητα σχηματισμού τους. Η ψύξη γίνεται σταδιακά -1°C μέχρι τους -35°C ή με ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο (-196°C). Η απόψυξη γίνεται με ταχύτητα $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μεταξύ -50 - -10°C . Κατά την κρυοπροστασία υπάρχει επίσης ο κίνδυνος εμφάνισης μεταλλάξεων λόγω της χρήσης των προαναφερθεισών αντιψυκτικών ουσιών. Μετά την απόψυξη γίνεται πάντοτε έλεγχος της βιολογικής κατάστασης των κυττάρων με διάφορες μεθόδους (χαρακτηριστικές χρώσεις των κυττάρων, παρατηρήσεις στο υπεριώδες φως, ΜΤΤ κλπ.).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Γενετική τροποποίηση φυτών έχει γίνει για πολλούς λόγους όπως:

1. Τροποποίηση φαινοτύπου. Π.χ αλλαγή χρώματος ανθέων (μαύρη τουλίπα)
2. Τροποποίηση χαρακτήρων παραγωγής (αύξηση περιεκτικότητας ρυζιού σε βιταμίνες, αλλαγή χαρακτήρων ωρίμανσης οπωροκηπευτικών)
3. Τροποποίηση βασικών μεταβολικών μονοπαθιών στα φυτά, με στόχο την τροποποίηση της δομής και της σύστασης βασικών αποταμιευτικών ή/και δομικών βιομορίων (μεταβολιτών) των φυτών
4. Αντιμετώπιση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Για παράδειγμα αύξηση αντοχής σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, αντοχή σε ζιζανιοκτόνα κλπ.
5. Αύξηση ενδογενούς συγκέντρωσης σε δευτερογενείς μεταβολίτες υψηλής εμπορικής αξίας (φάρμακα, χρωστικές, αρωματικές ουσίες, αντιοξειδωτικές ουσίες)
6. Παραγωγή από γενετικά τροποποιημένα φυτά μεγάλων ποσοτήτων διαφόρων βιομορίων όπως υδατανθράκων, λιπών, βιομηχανικών

ενζύμων, που το κόστος παραγωγής τους είναι μικρότερο. Τέτοια φυτά αποτελούν την απαρχή της μοριακής γεωργίας.

7. Παραγωγή φυτών με μεγάλη ικανότητα βιοαποδόμησης συστατικών διαφόρων κατηγοριών αποβλήτων .

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να έχουμε υπ' όψιν μας ότι σε όλες τις μεθόδους *in vitro* καλλιέργειας όπου τμήματος φυτικού οργανισμού ή φυτικού είδους ότι δεν υπάρχουν πρωτόκολλα καλλιέργειών, άρα είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη ότι θα πρέπει να προηγηθεί πειραματισμός έτσι ώστε να προσδιορισθούν και να συγκεκριμενοποιηθούν οι άριστες καλλιεργητικές συνθήκες κάθε φορά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altman A. (ed) Agricultural Biotechnology. M. Dekker Inc. New York 1998
2. Χαρβάλα Α., Χήνου Ι., Βασικές αρχές στη βιοτεχνολογία-Βιολογικοί έλεγχοι. Φοιτητικές σημειώσεις Φαρμακευτικού Τμήματος. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 1997
3. Präve P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D.A. Basic Biotechnology-A Student's Guide VCH 1989
4. Rehm H.J., Reed G.,(ed): Biotechnology Vol 1-8 Verlag Chemie, Weinheim 1981
5. Yamada K., Japan's most advanced industrial fermentation technology and industry. The International Technical Information Institute, Tokyo 1977

4.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ζωικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά σε βιομηχανική κλίμακα το 1962. Σήμερα πολλές βιολογικές ουσίες όπως ορμόνες, αντισώματα ιντερφερόνες παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα βιοτεχνολογικά μέσω καλλιεργειών ζωικών κυττάρων.

Η καλλιέργεια ζωικών κυττάρων έχει σαν αντικείμενο τη μελέτη της αναπαραγωγής *in vitro* τμημάτων οργάνων, ιστών ή απομονωμένων κυττάρων. Τα τελευταία 45 χρόνια πολλοί επιστήμονες δούλεψαν εντατικά για την τελειοποίηση των συνθηκών διατήρησης και πολλαπλασιασμού ζωικών κυττάρων σε καλλιέργεια. Οι τεχνικές κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν:

- α) για διαγνωστικούς σκοπούς
 - β) για την ανάλυση ογκογονιδίων
 - γ) για την εύρεση νέων κυτταροστατικών ουσιών
 - δ) για την χαρτογράφηση γονιδίων και
 - ε) για μελέτες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο.
- στ)στις διαδικασίες γήρανσης

Αν και θεωρητικά όλοι οι τύποι ζωικών κυττάρων μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro*, ετήσιες διεθνείς απαιτήσεις κάνουν απαραίτητη την χρήση 280.000.000 πειραματοζώων, μιας και σήμερα αυτά είναι η βασική πηγή πρώτων υλών γι' αυτές τις καλλιέργειες.

Εκτός της διάγνωσης και της βασικής έρευνας, τα ζωικά κύτταρα (ειδικά θηλαστικών) είναι συνεχώς αυξανόμενου ενδιαφέροντος στην παραγωγή μακρομορίων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Καταβάλλονται δε, πολλές προσπάθειες εκ μέρους Ερευνητικών Εργαστηρίων για προσφορά ζωικών κυττάρων, στην Διεθνή Παραγωγή και Αγορά. Για τον ίδιο λόγο το NSF των ΗΠΑ (National Science Foundation) έχει ιδρύσει δύο κέντρα καλλιεργειών από το 1975, το πρώτο στο Massachusetts Institute of Technology (M.I.T.) και το δεύτερο στο Πανεπιστήμιο της Alabama.

Η καλλιέργεια κυττάρων σε υψηλή τεχνολογική κλίμακα άρχισε με ΒΗΚ (Baby-Hamster-Kidney) που αναπτύχθηκαν σε εναιωρήματα το 1962 και

βιομηχανικά από το 1967 σε πολλές χώρες της Ευρώπης.(Μ.Βρετανία, Ιταλία, Γερμανία, Ισπανία, Δανία και Γαλλία) για την παραγωγή εμβολίων. Ένας μεγάλος αριθμός άλλων ουσιών όπως ορμονών, ενζύμων και αντιγόνων συγκαταλέγεται στα προϊόντα παραγωγής καλλιεργειών.Χαρακτηριστικά παραδείγματα θα αναφερθούν στο κεφάλαιο των Τεχνολογικών Χρήσεων των Ζωικών Κυτταροκαλλιεργειών.

Οι καλλιέργειες ζωϊκών κυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένες με την μελέτη κυτταρικών οργανιδίων, ιστών ή και μεμονομένων κυττάρων *in vitro*. Το σημείο εκκίνησης για τέτοιες καλλιέργειες είναι ένα εμφύτευμα (μόσχευμα-explant). Για όσο διάστημα αυτό διατηρεί την δομή και την λειτουργία του, μιλάμε για καλλιέργεια ιστού ή οργάνου (tissue or organ culture). Εάν η οργάνωση του ιστού καταστροφεί με μηχανικό, χημικό ή ενζυματικό τρόπο, τότε έχουμε μια αληθινή κυτταροκαλλιέργεια.

Κύτταρα ή ιστοί που λαμβάνονται από έναν μητρικό οργανισμό αποτελούν τις «**πρωτογενείς καλλιέργειες**» (primary culture). Ο όρος «**κυτταρική σειρά**» (cell line) αναφέρεται στις γενιές που δημιουργούνται μετά την πρώτη υποκαλλιέργεια (subculture). “**Κυτταρικό στέλεχος**”(cell strain) είναι η κυτταρική μορφή στην οποία καταλήγουμε, μετά από ειδική επιλογή ή κλωνοποίηση, με εξειδικευμένες σταθερές ικανότητες (σεσημασμένα χρωματοσώματα, σεσημασμένα ένζυμα, αντιγόνα κλπ.).Μία κυτταρική σειρά μπορεί να γίνει «**συνεχής κυτταρική σειρά**» (continuous cell-line), όταν προκύψει από κάποια μετατροπή ή εκφυλισμό.

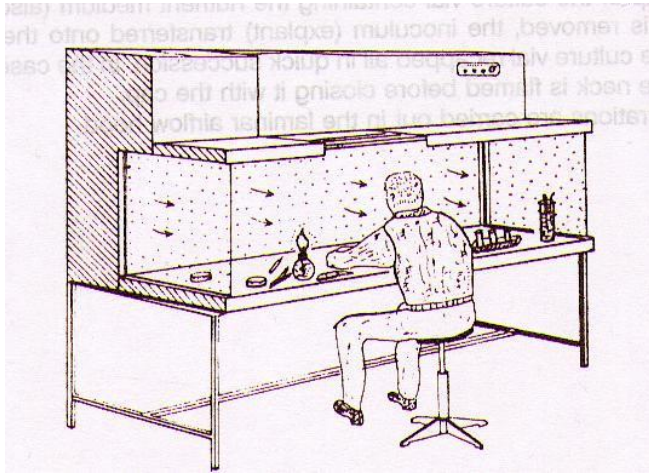
Πειραματικό μέρος καλλιεργειών ζωικών κυττάρων

Τεχνικός εξοπλισμός

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι στείροι χώροι είναι το ίδιο απαραίτητοι για τις καλλιέργειες των ζωϊκών όπως και των φυτικών κυττάρων.

Ειδικότερα τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε 37°C μιας και προέρχονται από θερμόαιμα ζώα, γι' αυτό και χρειάζεται ένας επωαστικός κλίβανος (incubator) με σταθερή παροχή 5% σε CO₂ και στους 37°C πάντοτε. Όλοι οι

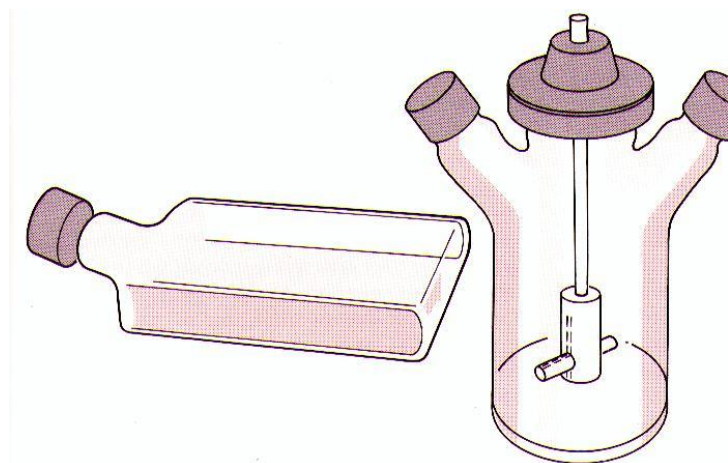
χειρισμοί γίνονται σε στείρο χώρο, όπου ο αέρας φιλτράρεται (Laminar Flow) και υπάρχουν λάμπες υπεριώδους φωτός, με μόνιμη χρήση λύχνου. Απαραίτητα σ' ένα χώρο κυτταροκαλλιέργειας είναι τα ψυγεία και οι καταψύκτες για να φυλάσσονται τα υλικά σε 4°C και -20°C. Το μικροσκόπιο για τις παρατηρήσεις είναι ειδικής κατασκευής για να τοποθετείται επάνω στην πλάκα του ολόκληρο το φιαλίδιο καλλιέργειας.



Πολλά εργαστήρια προμηθεύονται πλαστικά σκεύη μιας χρήσης από ειδικό υλικό (πολυστυρένιο), που έχουν υποστεί ειδική κατεργασία επίστρωσης με ζελατίνη για να μπορούν μονοστρωματικά κύτταρα να κολλούν πάνω σ' αυτή, εκτός αν τοποθετείται ειδικό υπόστρωμα για άλλες κατηγορίες κυττάρων όπως τα πρωτογενή ηπατικά κύτταρα που χρειάζονται επίστρωση σε κολλαγόνο. Όλα αυτά τα σκεύη είναι αποστειρωμένα με υπεριώδεις ακτινοβολίες και είναι τα πιο εύχρηστα υλικά που όμως δεν χρησιμοποιούνται ευρύτατα λόγω του υψηλού κόστους τους.

Τα γυαλικά είναι και αυτά ειδικής χρήσης για κυτταροκαλλιέργειες. Θα πρέπει όμως μετά από κάθε χρήση να μένουν 24h σε χρωμοθευικό οξύ και μετά να πλένονται με μη τοξικά απορρυπαντικά όπως πολυφωσφορικά άλατα και να αποστειρώνονται για 1/2h στους 120°C και σε πίεση 1.2 Atm. Η χρήση των γυαλικών είναι όπως φαίνεται επίπονη αλλά πιο οικονομική λύση. Η επιλογή σκευών εξαρτάται από 1) τον τρόπο αύξησης των κυττάρων 2) το διεξαγόμενο πείραμα και 3) την ποσότητα κυττάρων που απαιτούνται. Έτσι όπως φαίνεται

στο σχήμα για μονοστρωματικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται οι φιάλες σχήματος T (T-Flasks),για τις κλασσικές εναιωρηματικές καλλιέργειες οι φιάλες συνεχούς ανάδευσης (Spinner-Bottles).



Τροφικά μέσα

Τα τροφικά υλικά στα οποία αυξάνονται τα κύτταρα είναι διαφορετικών συστάσεων ανάλογα με τα είδη των καλλιεργούμενων κυττάρων και των τροφικών τους αναγκών. Όλα αυτά διατίθενται ευρύτερα στο εμπόριο και σε ειδικές περιπτώσεις ο ίδιος ο επιστήμονας μπορεί από βασικές πρώτες ύλες να φτιάξει το υλικό που χρειάζεται.

Τα κριτήρια για ένα σωστό τροφικό μέσο για καλλιέργεια ζωικών κυττάρων είναι:

1. Το μέσο να καλύπτει όλες τις τροφικές ανάγκες των κυττάρων
2. Να έχει σταθερή τιμή Ph 7.0- 7.3
3. Να είναι ισότονο με το κυτταρικό κυτταρόπλασμα
4. Το μέσον να είναι στείρο

Βασικά κάθε τροφικό μέσο αποτελείται από α) ένα ισότονο διάλυμα αλάτων για να ρυθμίζεται η ωσμωτική πίεση των κυττάρων, β) μία εξόζη ως πηγή ενέργειας (γλυκόζη ή γαλακτόζη) σαν υπόστρωμα για την κυτταρική αναπνοή, γ) διάλυμα των 13 απαραίτητων αμινοξέων, δ) 7-8 βιταμίνες της σειράς Β και χολίνη και ε) χημικά άλατα για την ρύθμιση του Ph. Τα θρεπτικά αυτά υλικά είναι τα λεγόμενα διεθνώς «minimal media” (ελάχιστα μέσα).

Σ' αυτά τα τροφικά μέσα προστίθεται πολλές φορές HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) Pk 7.3 σε 37°C ,μαζί με 850 mg NaHCO₃/L για την σταθερότητα του Ph. Τα περισσότερα υλικά έχουν ως δείκτη για την σωστή ρύθμιση του Ph το ερυθρό της φαινόλης που έχει πορτοκαλοκίτρινο χρώμα σε Ph= 7.2 ενώ σε μικρές αλλαγές Ph, έχουμε μετάπτωση σε κόκκινο χρώμα για όξινα διαλύματα και κίτρινο για βασικά. Η χρήση αντιβιοτικών είναι απαραίτητη σ'αυτά τα θρεπτικά υλικά με την πρόσθεση 20-200 units πενικιλίνης/ ml ή 10-100 mg στρεπτομυκίνης/ ml για να αποφεύγονται μολύνσεις από βακτήρια. Όλα αυτά τα υλικά είναι αποστειρωμένα σε αυτόκαυστο 15min στους 120°C και σε πίεση 1.2 Atm και έχουν υποστεί διήθηση από φίλτρα πόρων 0.2μm.

Στο παραπάνω τροφικό υλικό πρέπει να προστεθεί ορρός για να μπορέσουν να αυξηθούν τα κύτταρα, σε ποσότητα 5-30% ανάλογα με τον τύπο των καλλιεργούμενων κυττάρων.

Ο ορρός είναι ως φυσικό πρόσθετο, πολυσύνθετο μίγμα από παράγοντες αύξησης και άλλα φυσικά βιομόρια (ορμόνες-βιταμίνες κλπ) που δεν συντίθενται αλλά απομονώνονται στο αίμα μοσχαριών κυρίως, αλόγων ή άλλων ζώων νεογέννητων ή ώριμων. Ο ορρός προσφέρει στα κύτταρα α)πρωτεΐνες, πεπτιδορμόνες, μεταλλικά άλατα, λιπίδια και άλλα βιομόρια , β) ορμονικά σήματα πολλαπλασιασμού και αύξησης, γ)παράγοντες σύνδεσης και αποσύνδεσης κυττάρων. Τα κύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν αν δεν έχουν στο θρεπτικό τους υλικό ορρό.

Ο συνήθως χρησιμοποιούμενος ορρός που αναμιγνύεται με τα "minimal media" βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε αυξητικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα έχουν ανιχνευθεί α- και β- σφαιρίνες.

Υπάρχουν όμως τα τελευταία χρόνια στο εμπόριο και "Fully- defined media" που είναι ιδιαίτερα ακριβά γιατί έχουν εμπλουτιστεί σε αυξητικούς παράγοντες (FGF fibroblast growth factor, EGF epidermal growth factor; NGF nerve growth factor κτλ.) καθώς και ορμόνες (γλυκαγόνο, υδροκορτιζόνη,οιστραδιόλη, προσταγλανδίνες κλπ.).

Αρχή Κυτταροκαλλιιεργειών

Το 1925, μετά από πρόταση του Ογκολογικού Συμβουλίου και του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου γνωστότερου ως NCI (National Cancer Institute) δημιουργήθηκε μια τράπεζα κυττάρων στις Ηνωμένες Πολιτείες γνωστή διεθνώς ως American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland (η ένωση αυτή, εκδίδει καταλόγους με λίστες κυτταρικών σειρών). Συγκεκριμένα το 1979, η λίστα περιείχε 400 σειρές κυττάρων, περιλαμβανομένων περίπου 200 ανθρώπινων σειρών ινοβλαστών με ειδικά γενετικά χαρακτηριστικά. Σε κάθε σειρά περιγράφονται οι πηγές παραγωγής τους, οι τροφικές συνθήκες, οι ρυθμοί ανάπτυξης, ο χρόνος επιβίωσης, η μορφολογία των κυττάρων.

Από το 1977 η ESACT (European Society of Animal Cell Technology) ερευνά την δημιουργία μιας ανάλογης τράπεζας πληροφοριών (Cell Bank) στην Ευρώπη. Το 1980 δημιουργήθηκε ο φορέας EFCVC (European Federation of Cell and Virus Collections), ο οποίος προσδοκεί να εγκαθιδρύσει μια Ευρωπαϊκή Βάση πληροφοριών για όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται σε Ευρωπαϊκά Εργαστήρια.

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα περισσότερα Εργαστήρια προμηθεύονται μεγάλες ποικιλίες πρωτογενών και μη κυττάρων, κυτταρικών σειρών και κυτταρικών στελεχών από μεγάλες Εταιρείες της Ευρώπης, είτε από άλλες που ανήκουν στην ATCC (όπως Flow Lab., Deutche Bio- Merieux κ.α.). Αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται ως μονοστρωματική καλλιέργεια και πρέπει να επωαστούν στους 37°C για 24h πριν τον επαναενοφθαλμισμό. Η μεταφορά τους γίνεται σε παγωμένες αμπούλες και πρέπει ταχύτατα να έλθουν στην θερμοκρασία των 37°C. Στη συνέχεια χρειάζεται υπερφυγοκέντριση και μεταφορά σε φιάλες με φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Για την αρχή μιας νέας πρωτογενούς σειράς κυττάρων υπάρχουν πολλές μέθοδοι που βασίζονται σε ανακοινώσεις και μονογραφίες σ' αυτό το θέμα. Οι βασικές διαδικασίες χωρίζονται σε τρία μέρη που συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό.

- Μηχανικός τεμαχισμός ιστού
- Χημική επέμβαση, με επίδραση χηλικών ουσιών (EDTA)

- Κατεργασία με ένζυμα

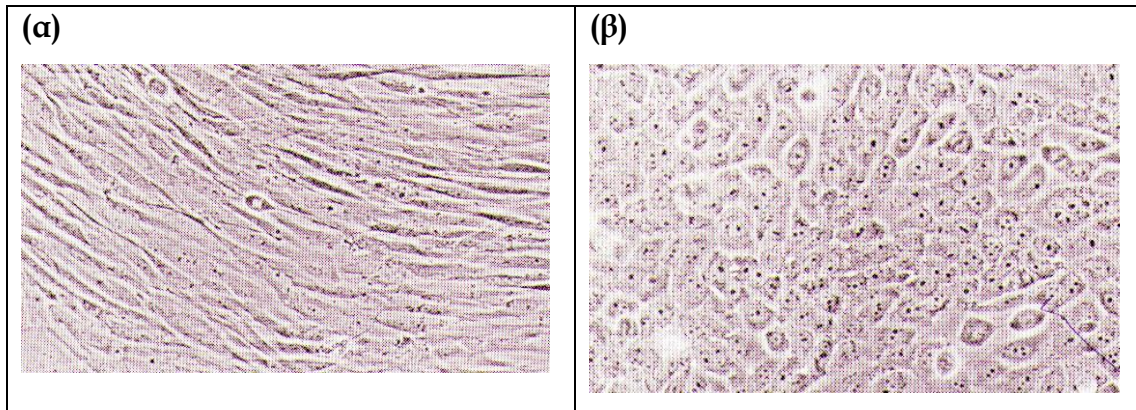
Έτσι ιστοί οργάνων με μικρές δυνάμεις συνοχής ανάμεσά τους (ήπαρ-νεφροί) μπορούν να κατεργαστούν με ένζυμα ή χηλικές ουσίες (EDTA) και να χρησιμοποιηθούν αμέσως σε καλλιεργητικά υλικά.

Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν μηχανικά μέσα με συνεχείς τομές ιστών και οργάνων σε ανάλογες φιάλες καλλιέργειας.

Μετά από αυτές τις κατεργασίες τα κύτταρα αυξάνονται σε γυάλινα ή πλαστικά σκεύη και κατά την διάρκεια της αύξησής τους ενδείκνυται η αλλαγή υλικού κάθε 2 ημέρες σε μονοστρωματικές καλλιέργειες ή προσθήκη νέου υλικού σε εναιωρηματικές καλλιέργειες. Οι εναιωρηματικές καλλιέργειες πρέπει να διατηρούν ορισμένη ποσότητα κυττάρων /ml για να μπορούν να αυξάνονται. Τα δε κύτταρα παραλαμβάνονται με απλή φυγοκέντρηση. Οι μονοστρωματικές καλλιέργειες αυξάνονται μέσα στο σκεύος μέχρις ότου καταλάβουν όλον τον χώρο(επιφάνεια σκεύους) που διατίθεται, αν χρειαζόμαστε περισσότερα κύτταρα θα πρέπει τα υπάρχοντα να ξεκολλήσουν από το σκεύος και να απλωθούν σε περισσότερα. Η συγκεκριμένη διαδικασία απαιτεί μια επώαση 5min με αραιό διάλυμα τρυψίνης και είναι γνωστή ως **τρυψινοποίηση**. Το ένζυμο σπάει τους δεσμούς μεταξύ των μουκοπρωτεϊνών των κυττάρων και του υποστρώματος, διατηρώντας τα κύτταρα σε εναιώρημα. Επειδή τα περισσότερα κύτταρα για την σύνδεσή τους με το υπόστρωμα χρειάζονται διοσθενή ιόντα Ca^{++} και Mg^{++} η προσθήκη αλάτων όπως EDTA που δεσμεύει διοσθενή ιόντα επιταχύνει την διαδικασία της τρυψινοποίησης κατά περίπτωση. Σε καλλιέργειες όπως κολλαγενάση, προνάση και υαλουρονιδάση, τελευταία δε προτάθηκε και η χρήση της διοπάσης, μιας βακτηριακής πρωτεάσης, με ειδικά προτερήματα. Με τις παραπάνω κατεργασίες και αφού τα κύτταρα πλυθούν με ισοτόνο διάλυμα φωσφορικών αλάτων μπορούν να επανακαλλιεργηθούν ή να χρησιμοποιηθούν σε πείραμα.

Μετά από κάποιο χρόνο εφησυχασμού τα κύτταρα αρχίζουν εκ νέου τις μιτωτικές διαιρέσεις. Μια καλλιέργεια αυτού του τύπου, που ξεκινάει από διαφοροποιημένο ιστό, είναι γνωστή ως πρωτογενής καλλιέργεια. Συνήθως

πρωτογενείς καλλιέργειες παρασκευάζονται από μάζες ιστών μεγάλου μήκους και περιέχουν μια ποικιλία διαφοροποιημένων κυττάρων όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα κ.ά. Από αυτά, τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται καλύτερα σε καλλιέργειες είναι ατρακτοειδούς σχήματος, έχουν ρυθμό ανάπτυξης συνδετικού ιστού και ονομάζονται ινοβλάστες (όπως φαίνεται στο σχήμα **(α)**).



Αξιοσημείωτο είναι ότι, από τα υπόλοιπα διαφοροποιημένα κύτταρα, τα επιθηλιακά περιέχουν το ένζυμο οξειδάση του D-αμινοξέος αντίθετα προς τους ινοβλάστες και έτσι είναι δυνατή η εκλεκτική ανάπτυξη από έναν κατεργασμένο ιστό, μόνο επιθηλιακών κυττάρων στην καλλιέργεια, με την προσθήκη D-valine. Τα επιθηλιακά κύτταρα (όπως φαίνεται στο σχήμα **(β)**) είναι πολυγωνικά, αν και το σχήμα δεν είναι σταθερό μορφολογικό γνώρισμα μιάς και ελέγχεται από τα τροφικά μέσα και άλλους παράγοντες. Τα κύτταρα πρωτογενών καλλιεργειών μπορούν να ληφθούν και πάλι με τρυψινοποίηση ή με προσθήκη EDTA και μεταφερόμενα σε νέα σκεύη, με νέες ποσότητες τροφικών μέσων να δώσουν δευτερογενείς καλλιέργειες. Τα κύτταρα που καθορίζονται από έναν ορισμένο αριθμό διαιρέσεων, αποτελούν ένα **κυτταρικό στέλεχος**. Τα κυτταρικά στελέχη ανθρώπινης προέλευσης περνούν από 50-100 διαιρέσεις πριν φθάσουν στον θάνατο.

Τα περισσότερα κύτταρα καλλιεργειών ποντικίσιας προέλευσης πεθαίνουν μετά από 30-50 διαιρέσεις αλλά συμβαίνει ορισμένα κύτταρα να μεταμορφώνονται, να αλλάζουν μορφολογία, να αναπτύσσονται ταχύτερα και να αποκτούν την ικανότητα να αρχίζουν μια καλλιέργεια από μικρότερο

αριθμό κυττάρων. Τέτοια ξεχωριστά κύτταρα έχουν απεριόριστη ζωή αντίθετα από τα κυτταρικά στελέχη και αποτελούν τις **κυτταρικές σειρές**. Σήμερα σ' αυτές προσδίδεται η δυνατότητα για χωρίς όρια ανάπτυξη *in vitro* και το πιο γενικό χαρακτηριστικό είναι το πέρασμα από 70 το λιγότερο υποκαλλιέργειες σε διάστημα 3 ημερών.

Κατά την διάρκεια της χρήσης κυτταρικών σειρών συμβαίνουν πολλές φορές αλλαγές στις καλλιέργειες, για παράδειγμα τα κύτταρα αντί να σχηματίζουν μονοστρωματικές σειρές να αναπτύσσονται σε συσσωματώματα κυττάρων (συστάδες). Τέτοιες μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές είναι συνήθως νεοπλασματικές και δημιουργούν καρκίνους αν εμφυτευθούν σε πειραματόζωα. Μπορούν να δημιουργηθούν από φυσιολογικά πρωτογενή κύτταρα καλλιεργειών ή από κυτταρικά στελέχη που έχουν μολυνθεί από ογκογόνους ιούς ή που τους έχουν προστεθεί καρκινογόνες χημικές ουσίες.

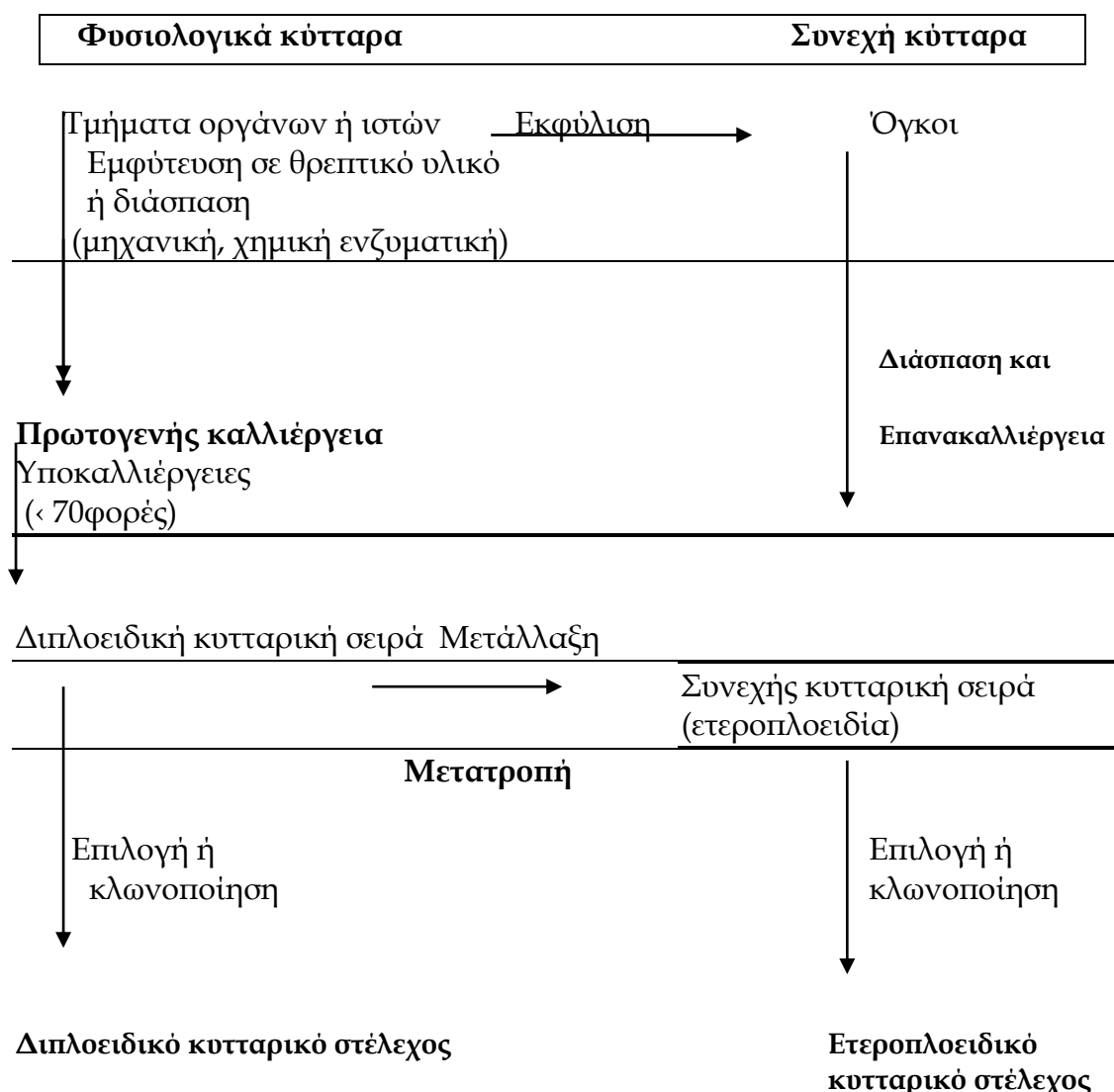
Στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί φαίνονται οι σχέσεις τύπων ιστών και τύπων κυττάρων σε φυσιολογικά και σε συνεχή κύτταρα. Εκεί φαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται άμεσα από εκφύλιση (μετατροπή) φυσιολογικών κυττάρων, σε συνεχή κυτταρική σειρά. Τα δε, διπλοειδή φυσιολογικά κύτταρα, περνούν πρώτα από ένα στάδιο πολλαπλών ενεργών διαιρέσεων απ' όπου κάποιες αποικίες εκφυλίζονται εξαιτίας εξειδίκευσης, μετάλλαξης ή μετατροπής. Συνήθως μια τέτοια εναλλακτική καλλιέργεια συνδέεται και με χρωμοσωμικές παρεκκλίσεις (πολυπλοειδία, ετεροπλοειδία, ανευπλοειδία). Φυσικά υπάρχουν και συνεχείς κυτταρικές σειρές με δικούς τους πρωτότυπους μηχανισμούς. Στον **Πίνακα 2** αναφέρονται τα χαρακτηριστικά των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών.

Πριν αναφερθούμε όμως στην τεχνολογική χρήση αυτών των καλλιεργειών ή πριν περάσουμε σε οποιονδήποτε χειρισμό τους θα πρέπει να γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό ζωντανών κυττάρων που έχουμε μετά από ανακαλλιέργεια.

Χρησιμοποιώντας την ειδική πλάκα του μικροσκοπίου (New Bauer ή malassez) χωρισμένη σε τετράγωνα σταθερής επιφάνειας και έχοντας σ' αυτήν ένα αραιό διάλυμα κυττάρων μπορούμε να μετρήσουμε την συγκέντρωση των κυττάρων και ανάγοντάς την στον συνολικό όγκο να ξέρουμε τον ακριβή

αριθμό τους. Εάν στα μετρούμενα κύτταρα έχει γίνει αρχική επώαση με ειδική χρωστική, μπορούμε να προσδιορίσουμε και την βιωσιμότητα των κυττάρων. Το trypan blue είναι μια χρωστική που βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα μπλέ γιατί μπορεί να διαπερνά τις μεμβράνες τους. Τα ζωντανά κύτταρα μένουν άχρωμα. Άλλη χρώση είναι με MTT (άλατα τετραζολίου) όπου με τα ζωντανά κύτταρα παρουσία προπανόλης εμφανίζονται ιώδεις κρύσταλλοι φορμαζανίου, ως προϊόν της αντίδρασης της δεϋδρογενάσης των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων με το MTT. Τα νεκρά κύτταρα δίνουν κίτρινο χρώμα, οι δε μετρήσεις γίνονται σε φασματοφωτόμετρο Elisa. Φυσικά υπάρχουν και άλλες μέθοδοι όπως μετρώντας επισημασμένη με ^{51}Cr Πρωτεΐνη μετά από κυτταρική λύση ή μετρώντας ραδιενεργά νουκλεοτίδια ^3H θυμιδίνη, ^{25}I ιωδοδεοξυουρίνη. Οι μέθοδοι αυτές είναι αυτοματοποιημένες αλλά λόγω της παρουσίας ραδιενεργών στοιχείων δεν χρησιμοποιούνται σε μετρήσεις ρουτίνας όπως οι προαναφερθείσες χρωματομετρικές μέθοδοι. Τέλος υπάρχει και η ηλεκτρονική μέθοδος μέτρηση κυττάρων μέσω φωτοκυττάρου και χρησιμοποιείται για μεγάλους όγκους καλλιέργειών και κυρίως εναιωρηματικές.

Πίνακας 1 Σχέσεις μεταξύ διαφόρων τύπων ιστών και τύπων κυττάρων



Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών

Κυτταρική Σειρά	Είδη προέλευσης	Είδος ιστού	Μορφολογία
3T3	Επίμυες	Συνδετικός	Ινοβλαστικό
L	Επίμυες	Συνδετικός	Ινοβλαστικό
CHO	Hamster Κίνας	Ωοθήκη	Επιθηλιακό
BHK21	Hamster Συρίας	Νεφροί	Ινοβλαστικό
Hela	Ανθρώπινος	Αυχενικό Καρκίνωμα	Επιθηλιακό
WISH	Ανθρώπινος	Αμνιακό	Επιθηλιακό
Hep-2	Ανθρώπινος	Καρκίνωμα λάρυγγα	Επιθηλιακό
KB	Ανθρώπινος	Ρινοφαρυγγικό Καρκίνωμα	Επιθηλιακό

Ανανέωση καλλιιεργειών

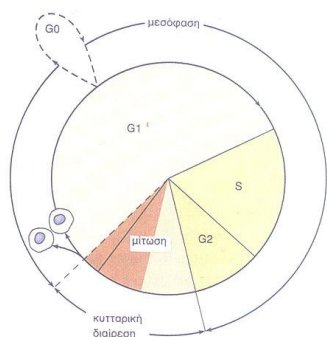
Τα αναπαραγόμενα κύτταρα δεν είναι δυνατόν να μένουν συνεχώς στην καλλιέργεια γιατί εκφυλίζονται και τελικά δεν υφίσταται ο αρχικός κλώνος αλλά ένας άλλος, παραγόμενος. Γι' αυτό και προτείνεται οι καλλιέργειες να ανανεώνονται τουλάχιστον κάθε τρίμηνο από αποθεματικά κύτταρα. Κάθε φορά λοιπόν που ξεκινά μια καλλιέργεια, ένα μέρος από τα κύτταρα φυλάσσεται παγωμένο (κρυοπροστασία) για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανανέωσή της. Τα κύτταρα παγώνονται σε υλικό με μεγάλη ποσότητα ορρού (έως 50%) στο οποίο περιέχεται κρυοπροστατευτικός (αντιψυκτικός παράγοντας). Ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας μπορεί να είναι γλυκερίνη ή dimethyl-sulfoxide (DMSO).

Ο ρόλος αυτών των κρυοπροστατευτικών είναι εξαιρετικά σημαντικός μιας και χωρίς αυτούς δημιουργούνται ενδοκυττάριοι κρύσταλλοι πάγου και ωσμωτικά φαινόμενα που καταστρέφουν τα κύτταρα. Η θερμοκρασία ψύξης είναι συνήθως του υγρού αζώτου (-196°C) σε ειδικά δοχεία Dewar (με σταδιακή ψύξη $4^{\circ}, -20^{\circ}, -75^{\circ}, -196^{\circ}\text{C}$). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ψυγεία στους -75°C αλλά είναι προτιμότερο να αποφεύγονται, γιατί οι αλλαγές στις θερμοκρασίες που μπορεί να συμβούν σε ψυγεία, μπορούν να καταστρέψουν τα κύτταρα. Το ξεπάγωμα γίνεται άμεσα στους 37°C .

Κατανομή των κυττάρων σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Στο σχήμα 3 διαγραμματικά ο κυτταρικός κύκλος και οι φάσεις που τον απαρτίζουν. Σε μια ιδανική κατάσταση όλα τα κύτταρα μιας καλλιέργειας εφ' όσον όλα μαζί ξεκινούν και αναπτύσσονται και οι χρόνοι διάρκειας κάθε φάσης είναι οι ίδιοι, κάθε χρονική στιγμή θα έπρεπε όλα να βρίσκονται στην ίδια φάση του κύκλου. Στις συνήθεις όμως καλλιέργειες δεν συμβαίνει ποτέ αυτό, μιας και οι χρόνοι διπλασιασμού των κυττάρων ποικίλλουν και σε κάθε χρονική στιγμή, στην καλλιέργεια βρίσκονται κύτταρα σε κάθε φάση, με μεγαλύτερη ποσότητα κατανομής στην G_1 φάση. Αυτό το είδος της καλλιέργειας ονομάζεται **ασύγχρονη** και είναι μια φυσική μορφή που

συναντάται ευρύτατα. Η θεωρητική καλλιέργεια, στην οποία όλα τα κύτταρα ξεκινούν και πολλαπλασιάζονται μαζί και βρίσκονται κάθε χρονική στιγμή στην ίδια φάση του κύκλου είναι μια **σύγχρονη** καλλιέργεια.



Πολλές φορές όταν μελετάμε πειράματα που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, χρειαζόμαστε συγχρονισμένες καλλιέργειες, γι' αυτόν τον λόγο υπάρχουν μέθοδοι για να συγχρονίζονται τα κύτταρα σε μια ή δυο το πολύ φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταπίπτουν εκ νέου σε ασύγχρονες μορφές. Έτσι λοιπόν τις ακόλουθες δυνατότητες για την δημιουργία συγχρονισμένων καλλιεργειών: α) να σταματήσουμε την κυτταρική αύξηση επιλεκτικά σε μια φάση του κύκλου, με παράγοντα που δρα σ' αυτήν ακριβώς την φάση. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι πιθανές αλλαγές στο φυσιολογικό προφίλ των κυττάρων όταν ο παράγοντας σταματήσει να υφίσταται και τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Έτσι έλλειψη ισολευκίνης σταματά τα κύτταρα στην φάση G_1 , έλλειψη θυμιδίνης τα σταματά πριν την S φάση, ενώ έλλειψη ορρού τοποθετεί το μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων στην φάση εφησυχασμού G_0 έξω από τον κυτταρικό κύκλο. Στις μονοστρωματικές καλλιέργειες, όπου τα κύτταρα δημιουργήσουν ένα μόνο στρώμα στον χώρο που τους προσφέρεται σταματούν να πολλαπλασιάζονται και παραμένουν στην φάση G_0 , β) Η δεύτερη δυνατότητα που υπάρχει είναι να γίνει επιλογή των κυττάρων σε ένα στάδιο κύκλου και αυτό αφορά κάποιες ιδιότητες φυσικές κυρίως που διέπουν τα κύτταρα σε κάθε στάδιο π.χ. τα κύτταρα στη φάση μίτωσης χάνουν την ισχυρή τους σύνδεση και το DNA επίσης αποκτά διαφορετική μορφολογία και μέγεθος σε κάθε φάση. Το είδος της μεθόδου που θα επιλεγεί για τον

συγχρονισμό αφορά το είδος του πειράματος και τον τύπο της καλλιέργειας των κυττάρων.

Χρήση ραδιοϊσοτόπων σε κυτταροκαλλιέργειες

Η χρήση ραδιοϊσοτόπων είναι μια μεγάλη κατάκτηση για τον ερευνητή μιας και σε ειδικές μελέτες μπορεί να ελέγχει ανά πάσα στιγμή βιομόρια στο σώμα των πειραματοζώων. Επίσης με επισήμανση κάποιων στοιχείων με ραδιοϊσότοπα υπάρχει η δυνατότητα ενδοκυτταρικής εντόπισής τους: έτσι για παράδειγμα μπορούμε με επισημασμένη μεθειονίνη να ελέγχουμε τις αποικοδομήσεις κάποιων πρωτεϊνών, είτε με χρήση ραδιενεργού θυμιδίνης να ελέγχουμε τον ρυθμό σύνδεσης DNA. Είναι δυνατόν επίσης με επισημασμένη δεξαμεθαζόνη - συνθετικό ανάλογο κορτιζόνης- να εντοπίσουμε σε ποιο ακριβώς κυτταρικό τμήμα βρίσκεται ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών.

Γενετική Μηχανική

Ο όρος «**Γενετική Μηχανική**» περιλαμβάνει τις διαδικασίες τεχνητής αλλαγής της σύστασης των γονιδίων με στόχο τον σχεδιασμό βιολογικών κυττάρων ή και οργανισμών με επιθυμητά χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Η αλλαγή αυτή μπορεί να προέλθει με μεταφορά γονιδίων από τα κύτταρα που περιέχονται σε άλλο ή σαν αποτέλεσμα μετατροπής της σειράς (αλληλουχίας) των βάσεων ενός γονιδίου με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθεί ένα νέο διαφορετικό γονίδιο. Οι μηχανικές αυτές διαδικασίες γίνονται εντός και εκτός του κυττάρου.

Ο όρος «**ανασυνδυασμένο DNA**» περιλαμβάνει τις διαδικασίες στο γενετικό υλικό μικροβιακών, ζωικών ή φυτικών κυττάρων τμήματος DNA διαφορετικού από εκείνο του DNA των ίδιων των κυττάρων.

Ενώ τέλος με τον όρο «**κλωνοποίηση**» εννοούμε την διαδικασία δημιουργίας κλώνου. Πληθυσμού δηλαδή κυττάρων μέσω ασεξουαλικού πολλαπλασιασμού με την ίδια γενετική σύσταση και την δυνατότητα και ίδιων χαρακτηριστικών ή ιδιοτήτων.

Εργαλεία της Γενετικής Μηχανικής

Τα σημαντικότερα εργαλεία της Γενετικής Μηχανικής είναι τα παρακάτω

Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά εξωχρωμοσωματικά τμήματα DNA. Το μέγεθός τους είναι από 2.000-200,000 βάσεις και βρίσκονται συνήθως σε βακτήρια ή μύκητες. Αναπαράγονται αυτόνομα μέσα στο κύτταρο και κληρονομούνται στις θυγατρικές γενιές. Τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται σαν οχήματα μεταφοράς γενετικών πληροφοριών μέσω τμημάτων DNA από ένα κύτταρο σε άλλο.

Άλλα ένζυμα

Η Γενετική Μηχανική χρησιμοποιεί και άλλα ένζυμα ως εργαλεία όπως:

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ένζυμα που διασπούν όλο το DNA που σταματά έτσι να είναι μεθυλιωμένο.

DNA πολυμεράσες για την αντιγραφή DNA,

RNA πολυμεράσες, που μεταγράφουν το δίκλωνο DNA σε μονόκλωνο RNA,

Αντίστροφες μεταγραφάσες που μετατρέπουν το μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA

DNA λιγάσες. Ένζυμα που χρησιμοποιούνται για το κλείσιμο με ομοιοπολικό δεσμό των κενών μεταξύ των τμημάτων των αλυσίδων του DNA που δημιουργούνται από τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Βιβλιογραφία

1. Κυριακίδη Δ. Βιοτεχνολογία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη (2000).
2. Κλώνη Ι. Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο (1997).
3. Rifkin J. Ο αιώνας της Βιοτεχνολογίας, Νέα Σύνορα Εκδ. Οργαν. Λιβάνη, Αθήνα (1998).
4. Acton R.t.,and Lynn J.D., Cell Culture and its application Academic Press, New York (1977).
5. Adams M.R. & Moss M.O. Food Microbiology, Royal Society of Chemistry (1995).
6. Bailey J.& Ollis F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd edition, McGraw-Hill, Singapore (1986).
7. Barnum S. Biotechnology - An introduction, Wadsworth Publishing Company, New York (1997).
8. Bains W. Biotechnology from A to Z, Oxford University Press (1998).

9. Batzing, B. L. *Microbiology: an introduction*, Brooks/Cole, Thomson Learning Inc., USA (2002).
10. Bickerstaff G. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press (1997).
11. Blanch H.W. & Clark D.S. *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker Inc. New York(1996).
12. Demain A. & Davies J. *Manual of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2nd Edition, ASM Press, Washington D.C. (1999).
13. Eisenthal R. & Danson M.J. *Enzyme Assays: A Practical Approach*, 3rd reprint, IRL Press at Oxford University Press (1993).
14. Godfrey T. & West S. *Industrial Enzymology*, MacMillan Press, London (1996).
15. Krist H.A., Yeh W-K., Zmijewski M.J. *Enzyme Technologies for Pharmaceutical and Biotechnological Applications*, Marcel Dekker Inc., New York (2001).
16. Ratledge C. & Kristiansen B. *Basic Biotechnology*, 2nd edition, Cambridge University Press (2001).
17. Rehm, H-J. Reed G., Puhler, H-J., Stadler, P. *Biotechnology*, Vol. 5a Editors A. Mountain, U.M. Ney and D. Schomburg), Willey-VCH, Weinheim (1999).
18. Roberts S.M., Turner N.J., Willetts A., Turner M.K. *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*, Cambridge University Press, New York (1995).
19. Schaper T. *Advances in Biochemical Engineering - Biotechnology*, Vol 58, Springer, Berlin (1997).
20. Segel I. H. *Biochemical Calculations*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., New York (1976).
21. Shuler M. & Kargi F. *Bioprocess Engineering*, Prentice Hall PTR, New Jersey (1992).
22. Silverman R. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, San Diego (2002).
23. Smith J. E. *Biotechnology*, 3rd edition, Cambridge University Press, UK (1996).

5.ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τεχνολογικές χρήσεις καλλιεργειών ζωικών κυττάρων

Εισαγωγή

Οι επιστήμονες που ασχολούνται με την βιοχημεία και την βιοφυσική όσον αφορά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, έχουν κάνει εκτεταμένη χρήση καλλιεργειών ζωικών κυττάρων. Η αξία των καλλιεργειών ζωικών κυττάρων ολοένα γίνεται σημαντικότερη εξαιτίας της χρήσης τους στην παραγωγή προϊόντων μεγάλου εμπορικού ενδιαφέροντος, όπως ανοσορυθμιστών, αντισωμάτων, πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων, ενζύμων και ορμονών. Ήδη βέβαια χρησιμοποιούνται ευρύτατα οι ζωϊκές κυτταροκαλλιέργειες για την παραγωγή ιντερφερόνης-α (για την αντιμετώπιση του καρκίνου) ,μονοκλωνικών αντισωμάτων, ειδικών αντιγόνων όγκων (για διάγνωση) και για κυτταροτοξικότητας (για την εύρεση νέων κυτταροτοξικών φαρμάκων).

Άλλες οδοί προς τις οποίες στρέφονται οι καλλιέργειες είναι για παράδειγμα η ανάπτυξη ινοβλαστών από ασθενείς με εγκαύματα. Αυτά τα καλλιεργούμενα κύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αναδομημένο δέρμα για την θεραπεία εγκαυμάτων. Άλλη εφαρμογή είναι επίσης η χρήση καλλιεργειών για την μελέτη και έρευνα νέων φαρμάκων με κινδύνους υψηλής τοξικότητας.

Παραγωγή αντιϊκών εμβολίων

Η παλαιότερη εμπορική εφαρμογή των ζωϊκών καλλιεργειών είναι η παραγωγή αντιϊκών εμβολίων και με μόνη εξαίρεση τα αντιβιοτικά, η παραγωγή τους αποφέρει το μεγαλύτερο κέρδος από κάθε άλλο φαρμακευτικό σκεύασμα. Για παράδειγμα το απλό εμβόλιο της ευλογιάς, εξαφάνισε για πάντα από την υδρόγειο τον ιό.

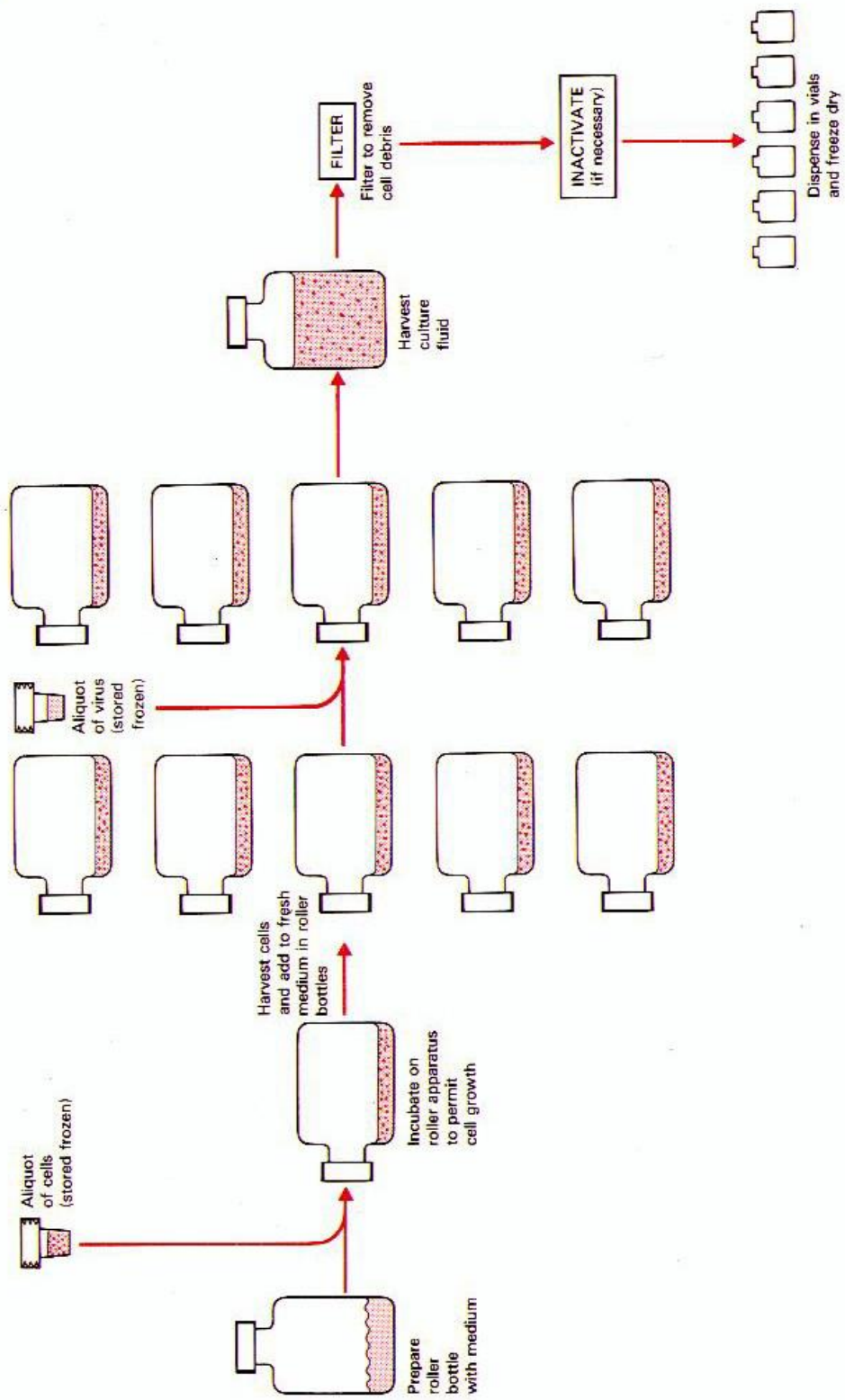
Επειδή οι ιοί είναι υπεύθυνοι για ενδοκυτταρικά παράσιτα, τα σημερινά αντιϊκά εμβόλια κατά της ευλογιάς και της λύσσας έγιναν σε ζώα όπως κουνέλια, πρόβατα και βόδια. Σήμερα ως ξενιστές ιών χρησιμοποιούνται

έμβρυα κότας για τα εμβόλια κατά της γρίπης και του κίτρινου πυρετού. Όλα τα άλλα εμβόλια παράγονται με ανάπτυξη του ιού σε καλλιέργειες ζωικών κυττάρων.

Στον **πίνακα**, φαίνεται η πλειονότητα των αντικών εμβολίων για ανθρώπους και ζώα και οι κυτταροκαλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους.

Πίνακας : Μερικά αντιικά εμβόλια για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση

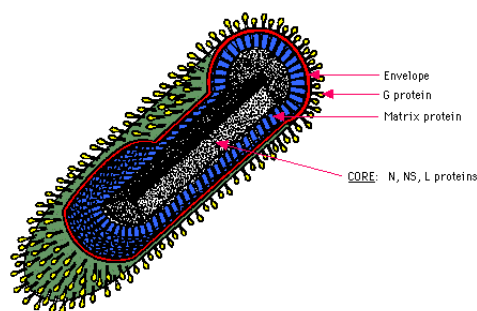
Ανθρώπινη χρήση		Κτηνιατρική χρήση	
Ιός	Κυτταροκαλλιέργεια	Ιός	Κυτταροκαλλιέργεια
Ιλαράς	Ινοβλάστες εμβρύου κότας	Ηπατίτιδας κουνών	Κύτταρα νεφρών κουνών
Λύσσας	Ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα		
Ερυθράς	Νεφροί κουνελιού, εμβρύου πάπιας ή ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα	Πανώλης γάτας	Κύτταρα νεφρών από γάτες
Πολυομυελίτιδας	Ήπαρ πιθήκου	Στοματικών ιώσεων	Κύτταρα νεφρών βοοειδών
Λύσσας	Έμβρυα πάπιας ή κότας	.	



Τα αντιϊκά εμβόλια είναι δύο τύπων:

A) Αυτά που παράγονται από ζωντανούς ιούς και προσφέρουν για όλη την υπόλοιπη ζωή του εμβολιαζόμενου ανοσία (προστασία). Τα εμβόλια αυτά διατρέχουν πολλούς κινδύνους να μολυνθούν από δευτερογενή προϊόντα που παράγουν οι ιοί (εφ' όσον είναι ζωντανοί) γι' αυτό και χρειάζονται συνεχείς μικροβιολογικούς ελέγχους και **B)** αυτά που παράγονται από νεκρούς ιστούς, τα οποία βέβαια έχουν λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα γιατί ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται στον ξενιστή και χρειάζονται επαναληπτικά εμβόλια. Τα μόνα ανενεργά (όπως λέγονται τα εμβόλια από νεκρούς ιούς) εμβόλια για ανθρώπινη χρήση είναι το κατά της λύσσας και σε μερικές περιπτώσεις και το εμβόλιο κατά της πολυομυελίτιδας.

Ιός Λύσσας



Θεωρητικά, η παραγωγή αντιϊκών εμβολίων είναι απλή. Οι πρωτίστως, χρησιμοποιούμενες κυτταροκαλλιέργειες γι' αυτά είναι από κύτταρα νεφρών πιθήκων, από έμβρυα πάπιας και συχνά επίσης χρησιμοποιούνται διπλοειδή ανθρώπινα κύτταρα. Όλα αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστρωματικές καλλιέργειες και ότι χρειάζεται για την παρασκευή των εμβολίων είναι η μόλυνση της καλλιέργειας με τον συγκεκριμένο ιό και στη συνέχεια η συγκομιδή του υγρού καλλιέργειας μετά την επίτευξη του πολλαπλασιασμού του ιού. Το καλλιεργητικό υγρό που περιέχει τον ιό καθαρίζεται και διηθείται. Στην περίπτωση εμβολίων από νεκρούς ιούς, υπάρχει το στάδιο ανενεργοποίησης του ιού και συμπύκνωσης του καλλιεργητικού υγρού. Όταν οι ιοί είναι ζωντανοί υπάρχει και το στάδιο πρόσμιξης του κεκαθαρμένου υγρού με ουσίες σταθεροποιητές για να

εμποδίζουν την απώλεια ενέργειας τους και φυσικά πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Πρακτικά, η παραγωγή αντικών εμβολίων είναι πολύ πιο σύνθετο έργο, όχι μόνο επειδή έχουμε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες κυττάρων αλλά εξ αιτίας των συνεχών ποιοτικών ελέγχων και ελέγχων ασφαλείας. Για παράδειγμα όλες οι καλλιέργειες ιστών που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα, ελέγχονται συνεχώς για να αποφευχθεί μόλυνση από λοιμώδεις παράγοντες που προέρχονται από το ζώο που χρησιμοποιήθηκε, είτε στην περίπτωση ανθρώπινων διπλοειδών κυττάρων για να αποκλεισθεί η ύπαρξη μη φυσιολογικών κυτταρικών χαρακτηριστικών. Οι ιστοί που προέρχονται από πιθήκους ελέγχονται εξονυχιστικά για την ύπαρξη ιών Herpes B, για μυκόπλασμα και βάκιλλο της φυματίωσης. Τα ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα ελέγχονται ως προς τον καρυότυπό τους για τον αποκλεισμό του ενδεχόμενου ύπαρξης μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών με κακοήθειες.

Μια άλλη επίπονη διαδικασία είναι ο έλεγχος ασφαλείας του τελικού προϊόντος (του εμβολίου). Για εμβόλια με νεκρό ιό ο κίνδυνος της μη πλήρους ενεργοποίησης του είναι πολύ σοβαρός και πιστεύεται ότι σ' αυτόν τον λόγο οφείλεται η υψηλή έξαρση μολύνσεων στόματος και πελμάτων (mouth and foot diseases) στην Ευρώπη. Στα εμβόλια που περιέχουν ζωντανούς τους ιούς, ο έλεγχος είναι το ίδιο ή και περισσότερο αυστηρός για την δραστικότητά τους, γιατί συμβαίνει να δίνονται εμβόλια με διασταύρωση του τύπου του ιού σε μορφή που χορηγούμενη με το εμβόλιο να προκαλεί την ίωση, γι' αυτό και γίνονται δοκιμές τους σε ζώα πριν χρησιμοποιηθούν στους ανθρώπους.

Εντομοκτόνα από καλλιέργειες ιών

Οι Pollard και Khosroni (1978) πρότειναν την καλλιέργεια ιών που είναι παθογόνοι για έντομα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ελέγχους ανθεκτικότητάς τους. Με υπόστρωμα μία συνεχή κυτταρική σειρά του εντόμου *Tricoplusca ni* σε εναιωρηματική καλλιέργεια, βρέθηκε ότι η οδός αυτή για την εύρεση νέων εντομοκτόνων -λιγότερο τοξικών- αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω, από τεχνολογική και οικονομική άποψη.

Μελέτη και έλεγχοι κυτταροτοξικότητας

Μια από τις σημαντικές εφαρμογές των καλλιεργειών ζωικών κυττάρων με πολλές χρήσεις στον Ιατροφαρμακευτικό χώρο είναι η μελέτη και οι έλεγχοι κυτταροτοξικότητας (τα tests κυτταροτοξικότητας).

Έτσι ξεκινώντας λίγο φιλολογικά, θα λέγαμε ότι η χειρουργική επέμβαση (όταν είναι δυνατή), η ραδιοθεραπεία και η χημειοθεραπεία είναι οι μόνες δυνατότητες αντιμετώπισης σήμερα του καρκίνου. Η αλήθεια είναι, ότι η δράση όλων των παραπάνω θεραπευτικών σχημάτων, ιδίως σε στερεούς όγκους (solid tumors), δεν είναι η πιο αποτελεσματική. Άρα η μόνη ελπίδα είναι τα νέα κυτταροτοξικά φάρμακα με ευρύτερο και διαφορετικό φάσμα δράσης. Το να βρεθούν τέτοια φάρμακα, μπορεί να γίνει είτε έμμεσα, με σχεδιασμό των μορίων ανάλογα με τις ήδη υπάρχουσες δομές κυτταροτοξικών, είτε με μελέτες (screenings) νέων χημικών δομών σε συγκεκριμένες καρκινικές σειρές κυττάρων. Με τα αποτελέσματα που προκύπτουν, γίνονται προτάσεις για την βελτίωση της δομής των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων από άποψη εκλεκτικότητας και ελάττωση παρενεργειών και τοξικότητας. Σήμερα όλες οι ενέργειες για τα tests κυτταροτοξικότητας κατευθύνονται από το NCI (National Cancer Institute) στα πλαίσια των Αναπτυξιακών Θεραπευτικών Προγραμμάτων για την Ίαση του καρκίνου στις Η.Π.Α. με αρκετά από εκεί και πέρα εργαστήρια στην Ευρώπη που εργάζονται σε ανάλογα προγράμματα. Ιστορικά τα tests εμφανίστηκαν στον ευρύτερο ερευνητικό χώρο με ανάλογες μορφές αυτών που γνωρίζουμε σήμερα, στην δεκαετία του '50. Το 1955 συγκεκριμένα μελετήθηκαν >600.000 φυσικά και συνθετικά προϊόντα από το NCI και >1.000 ήταν πολύ δραστικά. Τελικά μόνο 50 έφθασαν σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Για να έχουμε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα θα πρέπει: 1) τα tests να είναι υψηλής ευαισθησίας, για να είμαστε σίγουροι ότι τα προϊόντα θα δείξουν την δράση τους, εφ' όσον έχουν και 2) θα πρέπει να γίνονται με τρόπο που αναπαράγει την ανθρώπινη πραγματικότητα. Οι έλεγχοι

κυτταροτοξικότητας σήμερα χωρίζονται σε *in vitro* και *in vivo*. Τα *in vitro* tests γίνονται ευκολότερα και με χαμηλότερο κόστος και ενδείκνυται για ελέγχους ρουτίνας λόγω της βραχυχρόνιου λήψης αποτελεσμάτων (συνήθως 48 ώρες). Μειονεκτήματά τους είναι ότι δεν μπορούν να αποφανθούν για την δράση ουσιών που η δραστική τους μορφή είναι ένα μεταβολικά ενεργό προϊόν και επίσης είναι εντελώς τεχνητός ο τρόπος παραγωγής τους. Είναι σειρές καρκινικών κυττάρων από χημικώς παραγόμενες κακοήθειες σε πειραματόζωα και γι' αυτό πολλές φορές δίνουν ψευδώς (\pm) αποτελέσματα στις μελέτες.

Τα *in vivo* tests είναι καλύτερης πιστότητας και εγγύτερα στην ανθρώπινη πραγματικότητα, με βασικό μειονέκτημα το μεγάλο κόστος εγκατάστασης ενός εργαστηρίου για *in vivo* χειρισμούς και της χρονοβόρου λήψης αποτελεσμάτων των (3-60 ημέρες). Οι *in vivo* έλεγχοι γίνονται σε χημικά επαγόμενους όγκους που εμφυτεύονται ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοδερμικά σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (που τους έχει αφαιρεθεί ο θύμος αδένας- *nude mice*). Σε *in vivo* πειράματα η δράση μετράται με τα ζώα μάρτυρες, σε σχέση με την επιβίωση των ζώων που τους χορηγείται ως θεραπεία η προς μελέτη ουσία. Κατά το NCI μια ουσία για να χαρακτηριστεί ως κυτταροτοξική ή κυτταροστατική θα πρέπει να εμφανίσει δράση σε 3-4 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μερικές από τις γνωστότερες κυτταρικές καρκινικές σειρές που χρησιμοποιούνται, φαίνονται παρακάτω, με τα βασικά χαρακτηριστικά και τους κωδικούς που τις διακρίνουν.

1. P-388 (3PS31) και L-1210: είναι σειρές ενδοπεριτοναϊκών εμεμφυτευθεισών λεμφοκυτταρικών λευχαιμιών. Εμφανίσθηκαν το 1955 βάφοντας το δέρμα DLA/2 ποντικών με τον καρκινογόνο παράγοντα MCA (methyl-cholanthrene). Το λαμβανόμενο ασκитικό υγρό των ζώων, είναι το υλικό για *in vitro* tests, ενώ με *i.p* χορήγησή του σε άλλα *nude* ποντίκια μετά από 9 ημέρες μπορεί να αρχίσουν *in vivo* πειράματα. Τα πρώτα αποτελέσματα λαμβάνονται μετά από 20 ημέρες, ενώ αν υπάρχουν επιζώντα ζώα φθάνουν στις 30 ημέρες.

2. Μελάνωμα B16 (3B131): Ο όγκος εμφανίστηκε στην βάση του αυτιού C57BL/6 ποντικών το 1954 και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε και *in vitro* και *in vivo* με *i.p.* μεταφορά του σε πειραματόζωα (σε *in vivo* καλλιέργεια αποτελέσματα σε 60 ημέρες).
3. KB (9KB5): σειρά που προέρχεται από ανθρώπινο επιδερμικό ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1950 (*in vivo* τα πρώτα αποτελέσματα την 3^η ημέρα).
4. Colon 38 (3C872): σειρά που παράγεται με χορήγηση 1,2 dimethylhydrazine στο κόλον πειραματοζώων, όπου μετά την ανάπτυξη χρησιμοποιείται για *in vitro* καλλιέργεια, ή χορηγείται ενδοδερμικά σε άλλα πειραματόζωα για *in vivo* tests. (*in vivo*-τα πρώτα αποτελέσματα μετά 20 ημέρες).
5. F1026 (ινοσάρκωμα-fibrosarcoma): πειραματικά σταθερό ογκογόνο σύστημα, μη μεταστατικό καρκίνου, παραγόμενου με βαφή του δέρματος των πειραματοζώων με MCA, και η ανάπτυξη του χαρακτηρίζεται από τον χρόνο διπλασιασμού του.

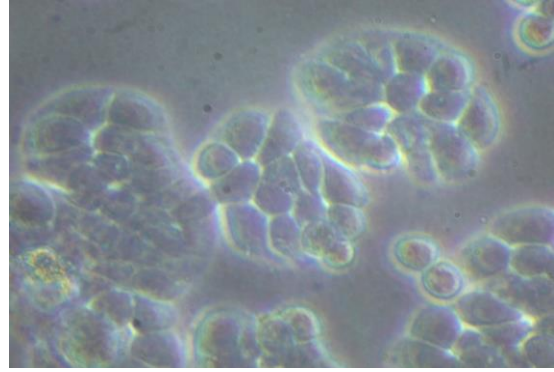
Αξιζει να αναφερθεί ότι οι σειρές KB και colon 38. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα γιατί είναι από τους πιο σταθερούς τύπους συμπαγών όγκων (solid tumors). Όλες οι παραπάνω σειρές που προκαλούνται από χημικές ουσίες, είναι ποντικίσιας προέλευσης και απέχουν από την ανθρώπινη πραγματικότητα. Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια οι καρκινικές αυτές σειρές να αντικατασταθούν με άλλες, ανθρώπινης προέλευσης (extended screening -*in vitro* phase II studies). Οι σειρές αυτές δημιουργούνται με λήψη κυττάρων από καρκινοπαθείς ασθενείς, μεταφορά τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (nude mice) και στην συνέχεια καλλιέργειά τους κατά τις γνωστές μεθόδους. Με τις καλλιέργειες αυτές γίνονται μελέτες **α)** της κινητικής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, **β)** της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρουν οι ελεγχόμενες ουσίες, **γ)** της τοξικότητάς τους, **δ)** της εκλεκτικότητάς τους, **ε)** της ύπαρξης ή όχι βιολογικών στόχων τους, **στ)** των μεταβολικών τους προϊόντων και της δραστηότητάς τους και **ζ)** της φυσικοχημικής τους

σχέσης με το υπόστρωμα (διαλυτότητα -σύνδεση με πρωτεΐνες- διαπερατότητα μεμβρανών κλπ.).

nude ποντίκια



Μικροσκοπική εικόνα κυττάρων συμπαγούς όγκου



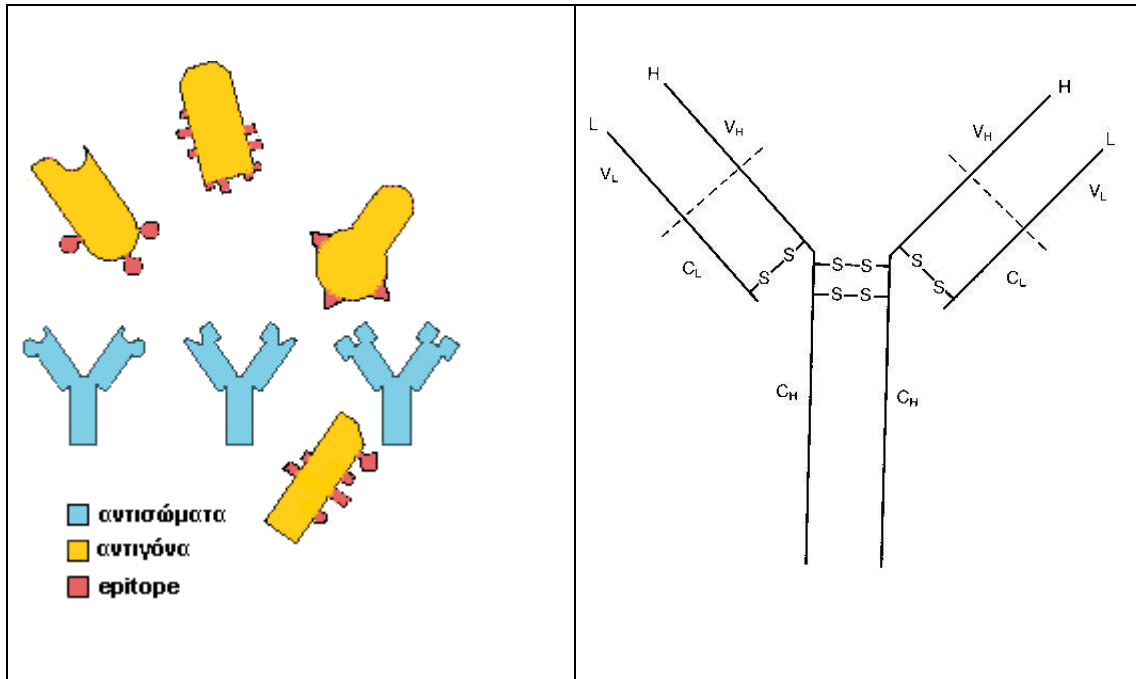
Ο έλεγχος της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία δρα μια κυτταροτοξική ουσία, είναι ένα σημαντικό κεφάλαιο στην επιστήμη. Γενικά οι διάφορες κυτταροτοξικές ουσίες χωρίζονται σε C.C.S.S. (cell, cycle specific substances) ουσίες δηλαδή εξειδικευμένης δράσης σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου όπως τα αλκαλοειδή της *Vinca* και οι αντιμεταβολίτες και σε C.C.N.S. (cell cycle nonspecific substances) ουσίες δηλαδή μη εξειδικευμένης δράσης σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου. Με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής (δεκαετία του '70), ένα δαπανηρό και αρκετά πολύπλοκο μηχάνημα, γίνεται δυνατή η εντόπιση της φάσης του κυτταρικού κύκλου, στην οποία δρα μια ελεγχόμενη νέας δομής κυτταροτοξική ουσία. Η γνώση αυτή είναι πολύ σημαντική, αφ' ενός στην έρευνα του καρκίνου, αφ' ετέρου δε στην πρακτική ανεύρεσης νέων χημειοθεραπευτικών σχημάτων βασισμένων σε συνδυασμό C.C.S.S. και C.C.N.S. φαρμάκων και εξατομικευμένων ανάλογα με τον ασθενή. Μετά δηλαδή την αφαίρεση καρκινικών κυττάρων από συγκεκριμένη νεοπλασία του ασθενούς, εμφύτευσή τους σε πειραματόζωο και έλεγχο της ευαισθησίας της νεοπλασίας στο χημειοθεραπευτικό σχήμα που χορηγείται.

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Εισαγωγή

Όταν ένα ξένο μακρομόριο-αντιγόνο μπει στην κυκλοφορία σπονδυλωτού, διαγείρονται ειδικά λεμφοκύτταρα (-B) στην παραγωγή αντισωμάτων που συνδυάζονται με τα αντιγόνα και διευκολύνουν την καταστροφή και απομάκρυνσή τους. Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικής δομής και ονομάζονται ανοσοσφαιρίνες. Όλα τα μόρια των αντισωμάτων έχουν την ίδια βασική δομή αποτελούμενη από δυο βαρείες και δυο ελαφρές αλυσίδες, που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S) Heavy and Light Chains **σχήμα**. Υπάρχουν περιοχές στην δομή των αντισωμάτων όπου διαφέρει η διάταξη των αμινοξέων από αντίσωμα σε αντίσωμα και ονομάζονται variant regions (μεταβλητές περιοχές) και περιοχές όπου σε κάθε αντίσωμα είναι οι ίδιες, οι σταθερές περιοχές resistant regions.

Όταν το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ζώου αντιμετωπίζει την είσοδο ενός μακρομορίου, αποκρίνεται με την παραγωγή αντισωμάτων που αντιστοιχούν σε τμήμα μόνο της επιφάνειας του αντιγόνου το epitope. Ένα αντιγόνο μπορεί να έχει πολλά epitopes και ο οργανισμός μπορεί να συνθέσει πολλά αντισώματα διαφορετικά, για το ίδιο αντιγόνο. Έτσι κατά την μόλυνση ενός οργανισμού από κάποιο, για παράδειγμα βακτήριο, θα συντεθούν πολλά διαφορετικά αντισώματα όπου κάθε ένα θα αντιστοιχεί σε ξεχωριστό epitope του. Με την εισαγωγή ενός αντιγόνου σε ζώο, μπορούμε να πάρουμε ορρό του όπου θα περιέχονται όχι μόνο αντισώματα για το συγκεκριμένο αντιγόνο αλλά όλων των παλαιότερων που κατά καιρούς είχαν μολύνει τον οργανισμό. Αυτά τα πολυκλωνικά αντισώματα (αντισώματα πολλών ειδών) χρησιμοποιήθηκαν ιδιαίτερα στην βιολογία, αλλά πολλά είδη κυρίως εμπορικών εφαρμογών απαιτούν την χρήση ενός μόνου είδους αντισωμάτων. Τότε μιλάμε για **μονοκλωνικά αντισώματα** που παράγονται με την τεχνική του υβριδώματος.



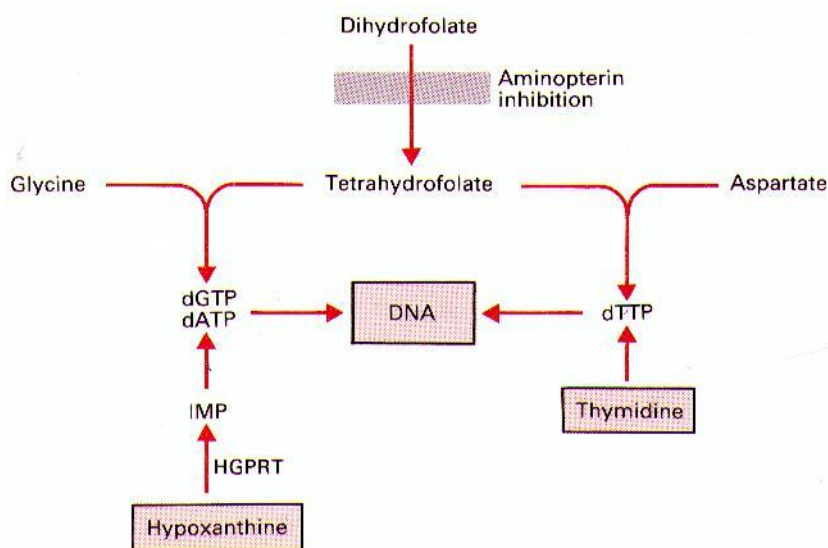
Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα αντισώματα παράγονται από μία τάξη λεμφοκυττάρων γνωστών ως Β-κυττάρων ή κυττάρων πλάσματος. Η παραγωγή ενός μονοκλωνικού αντισώματος (ΜΑΣ) από ένα ευαισθητοποιημένο ζώο θεωρητικά θα αναγόταν στην απλή διαδικασία της απομόνωσης Β-λεμφοκυττάρων, της *in vitro* καλλιέργειάς τους και της κλωνοποίησης εκείνων που παράγουν το αντίσωμα που μας ενδιαφέρει. Σ' αυτή τη θεωρία υπάρχουν δυο βασικά προβλήματα: 1) μικρά ποσοστά επιτυχίας στην *in vitro* καλλιέργεια Β-λεμφοκυττάρων με τις τεχνικές που μέχρι σήμερα γνωρίζουμε και 2) χρειάζεται μία αθάνατη κυτταρική σειρά παραγωγής αντισωμάτων.

Είναι αξιοθαύμαστο ότι τέτοια αθάνατη σειρά παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων υπάρχει στη φύση, συγκεκριμένα στην ασθένεια πολλαπλούν μυέλωμα που είναι ουσιαστικά καρκίνος Β-λεμφοκυττάρων. Οι μελέτες των George Kohler και Cesar Milstein του 1975 σε ΜΑΣ τους έδωσε λίγο αργότερα το βραβείο Nobel.

Σε κυτταροκαλλιέργειες ζωϊκών κυττάρων είναι γνωστό ότι κύτταρα συντήκονται αυτόματα και η συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου αυξάνεται με την προσθήκη παραγόντων σύντηξης όπως η αιθυλενογλυκόλη. Αυτό που οι Kohler και Milstein έκαναν, ήταν σύντηξη

φυσιολογικών λεμφοκυττάρων ποντικών που παράγουν αντισώματα με ποντικίσια κυτταρική σειρά μυελώματος, σ' ένα υβριδώμα. Όσο κι αν φαινόταν απλή αυτή η θεωρία, στην πράξη εμφανίστηκαν πολλά προβλήματα που έπρεπε να αντιμετωπιστούν. Έτσι η κυτταρική σειρά του μυελώματος δεν έπρεπε να παράγει αντισώματα γιατί διαφορετικά θα εμφανιζόταν μίγμα αντισωμάτων με αυτά που παράγουν τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Γι' αυτό αν και στο πολλαπλό μύελωμα έχουμε υπερπαραγωγή συγκεκριμένης ανοσοφαιρίνης, υπάρχουν συνθήκες για υπερπαραγωγή λεμφοκυττάρων χωρίς όμως ταυτόχρονη παραγωγή αντισωμάτων. Επίσης αυτά είναι κύτταρα που τους λείπει το ένζυμο HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase). Όταν αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται σε τροφικό μέσο HAT (Σχ.6) (hypoxanthine aminopterin thymidine) τα κύτταρα λόγω της έλλειψης HPRT θα πεθάνουν. Τα φυσιολογικά κύτταρα χρησιμοποιούν την θυμιδίνη και HPRT για την σύνθεση DNA. Μετά την σύντηξη λεμφοκυττάρων και κυττάρων μυελώματος, τα λεμφοκύτταρα επιβιώνουν μερικές ημέρες πριν πεθάνουν όπως τα φυσιολογικά, λόγω έλλειψης HPRT. Τα κύτταρα του υβριδώματος έχουν την ιδιότητα των κυττάρων, μυελώματος για *in vitro* αέναη ανάπτυξη και των φυσιολογικών κυττάρων να περιέχουν HPRT. Έτσι τα κύτταρα υβριδώματος επιζούν σε τροφικό μέσο HAT.

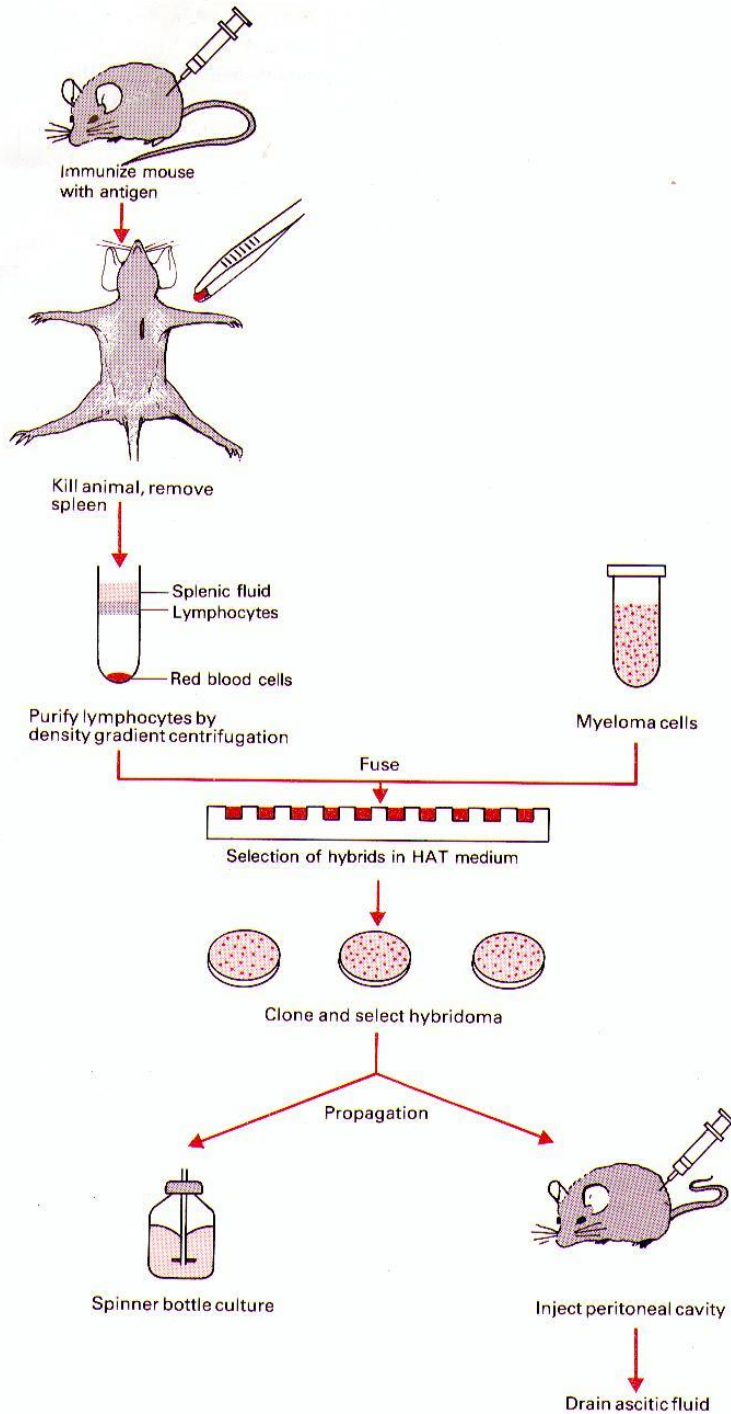


Δημιουργία υβριδώματος

Το σημείο εκκίνησης για την δημιουργία υβριδώματος που θα παράγει το επιθυμητό ΜΑΣ, είναι να ευαισθητοποιηθεί το ζώο Σχ.7 πχ. ποντικός με το κατάλληλο αντιγόνο. Συνήθως το αντιγόνο ενίεται ενδοδερμικά ή ενδοπεριτοναϊκά αρκετές φορές ώστε να ευαισθητοποιηθεί αρκετά το ζώο, έτσι ώστε να υπερδιεγερθούν τα Β-λεμφοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την υποδοχή του αντιγόνου. Η τελική δόση του αντιγόνου δίνεται ενδοφλέβια 3 ημέρες πριν την θανάτωση του ζώου. Μετά την ευαισθητοποίηση το ζώο θανατώνεται και ο σπλήνας του απομονώνεται ασηπτικά, διαρρηγνύεται και λαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα μαζί με το σπληνικό υγρό και ερυθρά αιμοσφαίρια. Σε φυγόκεντρο, διαχωρίζονται τα επί μέρους συστατικά και παραλαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα, όπου μετά από πλύση τους αναμιγνύονται με κυτταρική σειρά μυελώματος που της λείπει το ένζυμο HPRT. Στο μίγμα αυτό προστίθεται πολυαιθυλενογλυκόλη (ως παράγοντας σύντηξης) για λίγα μόνο λεπτά της ώρας, γιατί ενοχοποιείται τα τελευταία χρόνια ως κυτταροτοξική ουσία. Μετά το πέρας της υβριδοποίησης στο αρχικό μίγμα θα υπάρχουν κύτταρα του υβριδώματος και μη συντηχθέντα κύτταρα μυελώματος και λεμφοκύτταρα. Αυτά θα διαχωριστούν μεταξύ τους παρουσία τροφικού μέσου HAT, μέσα στο οποίο τα κύτταρα του υβριδώματος θα έχουν δυνατότητα ανάπτυξης, ενώ τα υπόλοιπα θα οδηγηθούν στον θάνατο. Μετά από έκπλυση τα κύτταρα του υβριδώματος θα χωριστούν σε μικρές ποσότητες, που περιέχουν θεωρητικά μόνο ένα κύτταρο, γιατί διαφορετικά θα παράγονται πολυκλωνικά αντισώματα. Στη συνέχεια είναι έτοιμα για ανάπτυξη με την προσθήκη νέας ποσότητας φρέσκου τροφικού μέσου. Τέλος γίνεται έλεγχος, αν όντως ήταν επιτυχημένη η διεργασία παραγωγής του ΜΑΣ και τα % ποσοστά της επιτυχίας.

Προβλήματα στη χρήση ΜΑΣ

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι τα κύτταρα των θηλαστικών (στα οποία ανήκουν όλα σχεδόν τα πειραματόζωα) στα χρωματοσώματά τους περιέχουν γενικές πληροφορίες που έχουν σχέση με



ρετροϊούς. Έτσι τα στελέχη που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο και οι περισσότερες κυτταρικές σειρές ποντικίσιας προέλευσης απελευθερώνουν ιούς. Γι' αυτό και οι κίνδυνοι ιώσεων είναι μεγάλοι και ως εκ τούτου και η χρήση ΜΑΣ σε ασθενείς δεν μπορεί να προχωρήσει πριν ελεγχθούν αυτά πλήρως για απουσία ιών. Ιώσεις που μπορούν να προκληθούν από χρήση ΜΑΣ είναι: αδενοϊώσεις, εγκεφαλομυελίτιδες, εγκεφαλομυοκαρδίτιδες, ηπατίτιδες, κυτταρομεγαλοϊώσεις κτλ.

Εφαρμογές ΜΑΣ

Για πολλά χρόνια η χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων από ευαισθητοποιημένα ζώα χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για διαγνωστικούς σκοπούς, ειδικά στην κλινική μικροβιολογία και στην πειραματική βιολογία. Τα μονοκλωνικά αντισώματα εξ αιτίας της υψηλής καθαρότητας και εξειδίκευσής τους χρησιμοποιούνται περισσότερο σε χώρους ποικίλους όπως για θεραπεία διαφόρων παθήσεων και εμπορικά για καθαρισμό πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια βιομηχανίες που ασχολούνται με βιοτεχνολογικά προϊόντα αύξησαν εξαιρετικά τα ετήσια έσοδά τους από πωλήσεις ΜΑΣ. Στον πίνακα 4 φαίνονται λεπτομερικά όλες οι χρήσεις ΜΑΣ. Απ' αυτές θα εξηγηθούν ως παραδείγματα αναλυτικά μερικές από τις πλέον ενδιαφέρουσες εφαρμογές (I,II,III,IV).

Πίνακας : Εφαρμογές των ΜΑΣ

Θεραπεία

Θεραπεία καρκίνου (άμεσα ή με χρήση ανοσοτοξινών ως κυτταροτοξικών).

Έλεγχος μεταστατικών όγκων

Ελάττωση κινδύνων απόρριψης σε μεταμοσχεύσεις μυελού οστών

Θεραπεία υπερβολικής δόσης φαρμάκων

Διάγνωση

Σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων

Καρκίνου

Εξειδίκευση σε νέες ανοσομεθόδους και νέες μεθόδους για:

Οιστρογόνα

Αντιγόνα

Ιντερλευκίνες

Ανθρώπινη αυξητική

Ισοσυμβατότητας

Ιντερφερόνες

Ορμόνη

Αντιγόνα αίματος

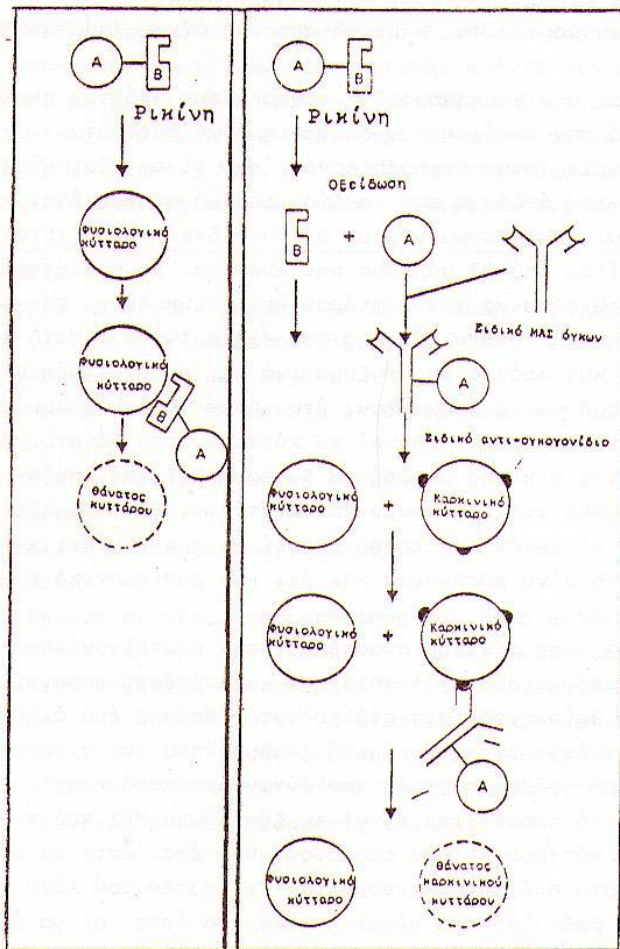
Προγεστερόνη

Αντιγόνα σπέρματος

Γαστρίνη

Ανοσοτοξίνες ως θεραπευτικοί παράγοντες

Πολλά καρκινικά κύτταρα έχουν ειδικά αντιγόνα στην επιφάνειά τους που τα κάνουν να ξεχωρίζουν συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά από τα οποία προέρχονται. Εάν τα ΜΑΣ -των αντιγόνων- των καρκινικών κυττάρων απομονωθούν, θα ήταν δυνατόν να δημιουργηθούν ένα ή περισσότερα εντελώς εξειδικευμένα ΜΑΣ που θα αναγνωρίζουν μόνο αυτούς τους όγκους. Αυτά τα αντισώματα μπορούν να αποτελέσουν την βάση νέων μορφών της χημειοθεραπείας όγκων (πχ. Ανοσοτοξικολογίας). Η Ρικίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη προερχόμενη από τον πλακούντα που μένει μετά την εκπίεση των αποφλοιωμένων σπερμάτων του φυτού *Ricinus communis* (οικ. Euphorbiaceae) και είναι εξαιρετικά δηλητηριώδης για τον άνθρωπο και τα ζώα. Δομικά αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες με δισουλφιδικό δεσμό. Η αλυσίδα Β- αποτελείται από 23 σάκχαρα και ενώνεται με γαλακτοσιδικά παράγωγα της επιφάνειας των κυττάρων και διευκολύνει την είσοδο της Α- αλυσίδας αποτελούμενης από 493 αμινοξέα. Μετά την εισαγωγή της στο κυτταρόπλασμα, ενζυματικά και μη αναστρέψιμα μεταβάλλει την δομή των ριβοσωμάτων, έτσι ώστε να μην μπορούν πλέον να λειτουργήσουν. Αυτό οδηγεί τα κύτταρα στο θάνατο. Η τοξική αλυσίδα Α της ρικίνης μπορεί να διαχωριστεί από την Β- και να ενωθεί με ένα ΜΑΣ ειδικό καρκινικών κυττάρων. Η νεοδομηθείσα αυτή ανοσοτοξίνη μ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να προσεγγίζει και να οδηγεί στον θάνατο μόνο καρκινικά και όχι και φυσιολογικά κύτταρα. Η Α- αλυσίδα της ρικίνης αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και όχι την κυτταροδιαίρεση γι' αυτό και καταστρέφει καρκινικά κύτταρα όταν δεν βρίσκονται στο στάδιο αυτό. Επίσης ένα άλλο πρόβλημα που μελετάται είναι η χημική σταθερότητα των ανοσοτοξινών στον οργανισμό (φόβος τοξικών προϊόντων αποικοδόμησης)



Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι το ζευγάρι ΜΑΣ που πλησιάζει καρκινικά κύτταρα με ένα ραδιοϊσότοπο, έτσι ώστε να σκοτώνονται μόνο αυτά από την ακτινοβολία. Γι' αυτό το λόγο τα χρησιμοποιούμενα ραδιοϊσότοπα είναι επιλεγμένα ώστε α) να έχουν υψηλή ενέργεια (για να σκοτώνονται τα κύτταρα στόχοι), β) χαμηλή διαπερατότητα (για αποφυγή καταστροφών γειτονικών ιστών), γ) μικρό διάστημα ημίσειας ζωής (έτσι ώστε να αποβάλλονται γρήγορα και να μην μετατρέπουν τον ασθενή, στον οποίο χορηγούνται - κινούμενο κίνδυνο- λόγω της ακτινοβολίας), και δ) τα συγκεκριμένα ισότοπα να είναι αδρανή.

Ένα ισότοπο που είναι κατάλληλο για το παραπάνω ζευγάρι είναι η αστατή με χρόνο ημίσειας ζωής 13h. Δυστυχώς όμως έχει και την ιδιότητα της συσσώρευσης της στα οστά, γεγονός που δυσχεραίνει την

χρήση της. Μία άλλη λύση αποτελεί το ύτριο-90 που δεν συγκεντρώνεται στα οστά, έχει χρόνο ημίσειας ζωής 64h, αλλά η β-ακτινοβολία που εκπέμπει έχει μεγαλύτερη διαπερατότητα από την α-ακτινοβολία που εκπέμπει η αστατίνη.

Βελτίωση διαγνωστικών αντιδραστηρίων

Οι αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα για προϊόντα όπως ορμόνες, αντιβιοτικά και βιολογικά ενεργά προϊόντα όπως οι ιντερφερόνες. Επίσης η ικανότητα των αντισωμάτων για συγκόλληση και καθίζηση κυττάρων χρησιμοποιείται στην μικροβιολογία και στην αιματολογία. Η μέχρι σήμερα χρήση ΜΑΣ πολυκλωνικού ορρού παρουσιάζει μεγάλο αριθμό μειονεκτημάτων. Για παράδειγμα η χρήση ορρού διαφορετικών ζώων της ίδιας οικογένειας ή διαφορετικών, ή και του ίδιου ζώου διαφορετικές ώρες την ημέρα, παρουσιάζει άλλη περιεκτικότητα σε αντισώματα και συνήθως αυτά δεν εμφανίζουν εξειδικευμένη αντίδραση. Αυτές οι διαφορές δεν υπάρχουν στα ΜΑΣ μιας και παράγονται από συγκεκριμένη αρχική κυτταρική σειρά υβριδώματος. Άλλο πρόβλημα ήταν ότι ο πολυκλωνικός ορρός περιείχε μικρή ποσότητα του αντισώματος που ενδιέφερε ανά περίπτωση. Έτσι ο χρόνος αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος που αποτελεί συνάρτηση της ποσότητας του αντισώματος ήταν ιδιαίτερα μεγάλος. Η ομοιογένεια και καθαρότητα του ΜΑΣ ελαχιστοποιεί τους χρόνους αντίδρασης χωρίς προβλήματα διασταυρούμενων αντιδράσεων, που εμφανίζονται πριν. Η συνέπεια, εξειδίκευση και ταχύτητα της χρήσης τους έχει συντελέσει στην εμφάνιση μίας μεγάλης σειράς αιματολογικών κυρίως kits στην αγορά, βασισμένων σε ΜΑΣ.

Καθαρισμός πρωτεϊνών

Ο καθαρισμός τους γίνεται με το πέρασμα του υπό κάθαρση μίγματος των πρωτεϊνών από στήλες που το υλικό πλήρωσής τους παρασκευάζεται από ένα σύμπλεγμα ΜΑΣ (αντίστοιχο της πρωτεΐνης που θέλουμε να καθαρίσουμε) με ενεργοποιημένο κυανογόνο βρωμίδιο σε χρωματογραφικό υλικό όπως πχ. Sepharose. Κατά το πέρασμα του μίγματος των πρωτεϊνών, εκείνη που αντιδρά με το ΜΑΣ της κατακρατάται, και στην συνέχεια με έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικά διαλύματα, απομακρύνονται οι διάφορες προσμίξεις και σε συγκεκριμένο pH, ιδιαίτερο για κάθε σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (πχ. 2.0 για την ιντερφερόνη), εμφανίζεται καθαρή πλέον η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Η μέθοδος αυτή είναι μοναδικής ακρίβειας λόγω της εξειδίκευσης του ΜΑΣ σε συγκεκριμένη πρωτεΐνη, τα ποσοστά επιτυχίας του καθαρισμού είναι πάντοτε σταθερά μιάς και η ικανότητα αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος είναι πάντα αμετάβλητη.

Μεταμόσχευση μυελού, οστών και οργάνων

Υπάρχει μεγάλος αριθμός ασθενών, όπου η μεταμόσχευση μυελού οστών από υγιή δότη προσφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην υγεία τους. Τέτοιες ασθένειες είναι ποικιλία απλασιών μυελού οστών, όπου σταματά η κυτταρική διαίρεση ερυθροκυττάρων οδηγώντας σε βαρύτερες αναιμίες. Αυτές οι απλασίες μπορούν να έχουν μία ικανοποιητική εξέλιξη, εάν έγκαιρα αντικατασταθούν τα νοσούντα κύτταρα με φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Διαταραχές επίσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων έχουν ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ανθεκτικότητας του οργανισμού σε μολύνσεις (ανοσοκαταστολή) όπως πχ. μικρόβια.

Τα βασικά προβλήματα κατά την μεταμόσχευση μυελού είναι δύο:

A) το πρώτο είναι η απόρριψη των κυττάρων του δότη, από τον ξενιστή. Θεωρητικά σ' αυτές τις μεταμοσχεύσεις ακολουθείται αγωγή με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, μεγάλο διάστημα μετά την επέμβαση, για να μην απορροφηθεί το μόσχευμα. Μ' αυτή την αγωγή υπάρχει πάντοτε ο κίνδυνος, λόγω της ανοσοκαταστολής, της θνησιμότητας των ασθενών από σηψαιμία (ιδίως μετά από μόλυνση από Gram(-) βακτήρια.)

Ταυτόχρονα με τα ανοσοκατασταλτικά χορηγούνται και αντιβιοτικά με ικανοποιητικά αποτελέσματα στην μάχη κατά των βακτηρίων, αν και οι παραμένουσες ενδοτοξίνες τους μπορούν παρά τα αντιβιοτικά, να προκαλέσουν ακόμη και θάνατο. Πριν μερικά χρόνια είχε δημιουργηθεί και χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα αντι- ενδοτοξίνης. Τελευταία έχει παραχθεί ανθρώπινο ΜΑΣ κατά της ενδοτοξίνης του *E. coli*, που προστατεύει εξαιρετικά -σε ερευνητικό προς το παρόν επίπεδο- τα ποντίκια κατά θανατηφόρων σηψαιμιών από Gram (-) βακτήρια. Τα αποτελέσματα αυτά ευελπιστούν οι ερευνητές, ότι θα δώσουν λύση και στο πρόβλημα των σηψαιμιών.

Επειδή δε τα ΜΑΣ είναι υψηλής καθαρότητας θα ελαττώσουν το πρόβλημα των μολύνσεων από ιούς (ηπατίτιδας, κυτταρομεγαλοϊού και AIDS) που περιέχονταν συνήθως σε ανθρώπινους πολυκλωνικούς αντιορούς.

B) Το δεύτερο πρόβλημα σε μεταμοσχεύσεις είναι, το γεγονός ότι ο μυελός που μεταμοσχεύεται περιέχει T-λεμφοκύτταρα του δότη (κύτταρα που αναγνωρίζουν ως αντιγόνο κάθε ξένη ουσία που εισέρχεται στον οργανισμό και ενεργοποιούν τα B-κύτταρα στην παραγωγή αντισωμάτων για την εξόντωσή τους). Έτσι λοιπόν αναγνωρίζουν τα κύτταρα του νέου ξενιστή ως αντιγόνα και ξεκινούν διαδικασίες καταστροφής τους. Αυτό είναι το σύνδρομο GVH (Graft- Versus -Host disease) που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε θάνατο, αν και ελέγχεται με τα χορηγούμενα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Η δημιουργία λοιπόν ενός ΜΑΣ αντι-T-κυττάρων (Anti T-cell MAB) είναι χρήσιμο στην δέσμευση των T-κυττάρων του δότη και στην ελάττωση της εμφάνισης του συνδρόμου

GVH. Αυτό το ΜΑΣ είναι χρήσιμο και σε μεταμοσχεύσεις άλλων οργάνων όπως καρδιάς, νεφρών, ήπατος για προστασία από την απόρριψη των μεταμοσχευμάτων. Με την χορήγηση του αντι-T-κυττάρων ΜΑΣ τα T-λεμφοκύτταρα βγαίνουν από την κυκλοφορία και ο οργανισμός γίνεται ανοσολογικά ανίκανος να αναγνωρίσει τα μοσχεύματα ως ξένα σώματα (αντιγόνα) και να ενεργοποιήσει τα Β-κύτταρα, ώστε να δημιουργήσουν αντισώματα για να τα απορρίψουν.

Βιβλιογραφία

1. Bankert R.B.,:Development and use of monoclonal antibodies in the treatment of cancer. *Cancer Drug Delivery* 1, 251-67 (1984)
5. Benjamin R.J., Waldmann H.,: Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 320, 450-51 (1986).
6. Cantell K.,Hirvonen S., "Preparation of human leukocyte interferon for clinical use" *Tex.Rep.Biol.Med.* 35, 138-144 (1977)
7. Hayflick L., " Cell Biology of Aging" *Fed.Proc. Fed.Am.Soc.Exp. Biol.* 38,1847-1850 (1979)
8. Ritz J., Sclossmann S.F., "Utilization of monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma " *Blood* 59, 1-11 (1982)
9. Sikora K., Smetley H.M., "Monoclonal Antibodies" Blackwell Scientific Publications,Oxford (1984)